

Bruselj, 25. februar 2019  
(OR. en)

6800/19  
ADD 1

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

#### SPREMNI DOPIS

---

Pošiljatelj:	Evropska komisija
Datum prejema:	22. februar 2019
Prejemnik:	generalni sekretariat Sveta

---

Zadeva:	PRILOGA K UREDBI KOMISIJE (EU) .../... z dne XXX o spremembi Priloge k Uredbi (ES) št. 440/2008 o določitvi testnih metod v skladu z Uredbo (ES) št. 1907/2006 Evropskega parlamenta in Sveta o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH) zaradi njene prilagoditve tehničnemu napredku
---------	--

---

Delegacije prejmejo priloženi dokument Annex to D060575/02.

---

Priloga: Annex to D060575/02

## SL

## PRILOGA

Priloga k Uredbi (ES) št. 440/2008 se spremeni:

(1) Poglavje B.4 dela B se nadomesti z naslednjim:

**„B.4 AKUTNO DRAŽENJE KOŽE/JEDKOST ZA KOŽO****UVOD**

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 404 (2015). Smernice OECD za preskušanje kemikalij se redno preverjajo, s čimer se zagotovi, da izražajo najboljša razpoložljiva znanstvena spoznanja. Pri preverjanju Smernice OECD za preskušanje 404 je bila posebna pozornost namenjena možnim izboljšavam v zvezi s pomisleki glede dobrobiti živali in ocenjevanju vseh obstoječih podatkov o preskusni kemikaliji, da bi se izognili nepotrebnim testiranjem na laboratorijskih živalih. Posodobljena različica Smernice OECD za preskušanje 404 (prvotno sprejeta leta 1981, revidirana v letih 1992, 2002 in 2015) vključuje sklic na dokument s smernicami za celostne pristope k testiranju in ocenjevanju (Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA)) v zvezi z draženjem kože/jedkostjo za kožo (1), pri čemer je predlagan modularen pristop k preskušanju draženja kože in jedkosti za kožo. S pristopi IATA se opisuje več modulov, v katerih so zbrani viri informacij in orodja za analizo, ter zagotavljajo smernice o tem, (i) kako obstoječe podatke, pridobljene s preskušanjem, in podatke, ki ne temeljijo na preskušanju, združiti in uporabiti pri ocenjevanju potenciala kemikalij za draženje kože in jedkost za kožo, poleg tega je (ii) predlagan pristop, kadar je potrebno dodatno preskušanje (1). Poleg tega je v navedeni smernici, kjer je to potrebno, namesto sočasne priporočena zaporedna namestitvev treh preskusnih obližev na žival v začetnem preskusu *in vivo*.
2. Opredelitvi pojmov draženje kože in jedkost za kožo sta navedeni v dodatku k tej preskusni metodi.

**ZAČETNI PREUDARKI**

3. Za znanstveno zanesljivost in dobrobit živali je koristno, da se preskusi *in vivo* začnejo izvajati šele, ko se z analizo, ki temelji na zanesljivosti dokazov, kot je predstavljena v dokumentu s smernicami za celostne pristope k testiranju in ocenjevanju v zvezi z draženjem kože in jedkostjo za kožo, tj. v vseh treh delih teh smernic in njihovih ustreznih

modulih (1), ocenijo vsi razpoložljivi podatki, ki se nanašajo na potencial preskusne kemikalije za draženje kože/jedkost za kožo. Na kratko, v prvem delu se obstoječi podatki obravnavajo na podlagi sedmih modulov, ki zajemajo podatke za ljudi, podatke *in vivo*, podatke *in vitro*, podatke o fizikalno-kemijskih lastnostih (npr. vrednost pH, zlasti močna kislost ali alkalnost) in nepreskusne metode. V drugem delu se opravi analiza, ki temelji na zanesljivosti dokazov. Če ta analiza še vedno ni prepričljiva, je treba tretji del izvesti z dodatnim preskušanjem, pri čemer se začne z metodami *in vitro*, preskušanje *in vivo* pa se uporabi kot zadnja možnost. S to analizo bi se morala torej zmanjšati potreba po *in vivo* preskušanju jedkosti za kožo/draženja kože v zvezi s preskusnimi kemikalijami, za katere je glede navedenih dveh končnih točk na voljo že dovolj dokazov iz drugih študij.

### **NAČELO PRESKUSA *IN VIVO***

4. Preskusna kemikalija, ki jo je treba preskusiti, se nanese na kožo preskusne živali v enkratnem odmerku; netretirane površine kože preskusne živali služijo za kontrolo. Stopnja dražilnosti/jedkosti se odčita in evidentira v določenih intervalih in nadalje opiše, da se vsi učinki celovito ocenijo. Študija mora trajati dovolj dolgo, da se oceni popravljivost ali nepopravljivost opaženih učinkov.
5. Živali, ki v kateri koli fazi preskusa kažejo trajne znake hudega trpljenja in/ali bolečine, je treba humano usmrtiti, preskusno kemikalijo pa oceniti skladno s tem. Merila za sprejetje odločitve o humani usmrtitvi umirajočih in hudo trpečih živali so navedena v ločenem dokumentu s smernicami (2).

### **PRIPRAVA ZA PRESKUS *IN VIVO***

#### **Izbira živalskih vrst**

6. Kunec beličnik je najbolj zaželena laboratorijska žival; uporabljajo se zdravi mladi odrasli kunci. Uporabo drugih vrst je treba obrazložiti.

#### **Priprava živali**

7. Približno 24 ur pred začetkom preskusa je treba živalim skrbno ostriči dlako s hrbtnege dela trupa. Paziti je treba, da se koža ne odrgne, in uporabiti le živali z zdravo, nepoškodovano kožo.
8. Nekateri kunčji sevi imajo goste zaplate dlak, ki so bolj izrazite v nekaterih obdobjih med letom. Takšni predeli goste rasti dlak se ne smejo uporabiti kot preskusni predeli.

#### **Pogoji nastanitve in hranjenja**

9. Živali morajo biti nastanjene posamično. Temperatura v prostoru s poskusnimi živalmi mora biti za kunce 20 °C ( $\pm 3$  °C). Čeprav mora biti relativna vlažnost vsaj 30-odstotna in po možnosti ne sme presegati 70 %, razen med čiščenjem prostora, si je treba prizadevati

za 50–60-odstotno vlažnost. Osvetlitev mora biti umetna, pri čemer je zaporedje 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporabi običajna predpisana laboratorijska prehrana z neomejeno količino pitne vode.

## **PRESKUSNI POSTOPEK**

### **Nanašanje preskusne kemikalije**

10. Preskusno kemikalijo je treba nanesti na del površine kože (približno 6 cm<sup>2</sup>) in pokriti z obližem iz gaze, ki se pritrdi z nedražilnim trakom. Kadar neposredna aplikacija ni mogoča (npr. tekoče snovi ali nekatere kašnate zmesi), je treba preskusno kemikalijo najprej nanesti na obliž iz gaze, ki se nato uporabi na koži. Obliž mora biti v ohlapnem stiku s kožo, pritrjen z ustrezno napol zapiralno obvezo med trajanjem izpostavitve. Če se preskusna kemikalija nanese na obliž, jo je treba pritrditi na kožo tako, da je stik dober in preskusna kemikalija enakomerno razporejena po koži. Živali je treba preprečiti dostop do obliža in zaužitje ali vdihavanje preskusne kemikalije.
11. Tekoče preskusne kemikalije se običajno uporabljajo nerazredčene. Kadar se preskušajo trdne snovi (ki jih je mogoče zdrobiti, če je to po presoji potrebno), je treba preskusno kemikalijo navlažiti z zelo majhno količino vode (ali, kadar je potrebno, z drugim ustreznim vehiklom), ki zadostuje za zagotavljanje dobrega stika s kožo. Kadar se uporabljajo drugi vehikli, ne voda, mora biti možen vpliv vehikla na dražilnost kože zaradi preskusne kemikalije minimalen, če sploh obstaja.
12. Na koncu obdobja izpostavljenosti, ki traja običajno 4 ure, je treba z uporabo vode ali ustreznega topila odstraniti preostalo preskusno kemikalijo, kjer je to izvedljivo, ne da bi se spremenil obstoječi odziv ali integriteta epidermisa.

### **Velikost odmerka**

13. Na preskusni predel se nanese odmerek 0,5 ml tekoče snovi ali 0,5 g trdne snovi ali kašnate zmesi.

### **Začetni preskus (*in vivo* preskus draženja kože/jedkosti za kožo z uporabo ene živali)**

14. Kadar se presodi, da je preskusna kemikalija jedka, dražilna ali nerazvrščena, na podlagi analiz, ki temeljijo na zanesljivosti dokazov, ali predhodnega preskušanja *in vitro*, običajno ni potrebno dodatno preskušanje *in vivo*. Kadar se kljub temu zdi potrebno zagotoviti dodatne podatke, se izvede preskus *in vivo* z uporabo ene živali in na podlagi naslednjega pristopa. Na žival se zaporedoma nanesejo do trije preskusni obliži. Prvi obliž se odstrani po treh minutah. Če ni opažena nobena resna reakcija kože, se na drug predel nanese drugi obliž in se odstrani po eni uri. Če opazovanja v tej fazi pokažejo, da se lahko humano dopusti podaljšanje izpostavljenosti na štiri ure, se nanese še tretji obliž in se odstrani po štirih urah, odziv pa se razvrsti po stopnjah.

15. Če se opazi jedek učinek po kateri koli izmed teh treh zaporednih izpostavitvev, se preskus nemudoma zaključi. Če se jedek učinek ne opazi po tem, ko se odstrani zadnji obliž, se žival opazuje 14 dni, razen če se jedkost razvije prej.
16. Kadar se ne pričakuje, da bo preskusna kemikalija povzročila jedkost, vendar bi lahko bila dražilna, je treba nanesti le en obliž na eno žival za štiri ure.

#### **Potrditveni preskus (*in vivo* preskus draženja kože z dodatnimi živalmi)**

17. Če se jedek učinek v začetnem preskusu ne opazi, je treba dražilni ali negativni odziv potrditi z uporabo do dveh dodatnih živali, s po enim obližem za vsako, v obdobju izpostavitve štirih ur. Če se v začetnem preskusu opazi dražilen učinek, se potrditveni preskus lahko izvede zaporedoma ali s sočasno izpostavitvijo dveh dodatnih živali. Izjemoma, ko se začetni preskus ne izvede, se lahko dve ali tri živali tretirajo le z enim obližem, ki se odstrani po štirih urah. Kadar se uporabljata dve živali, ni potrebno dodatno preskušanje, če obe kažeta enak odziv. V nasprotnem primeru se preskusi tudi tretja žival. Dvoumne odzive je morda treba oceniti z uporabo dodatnih živali.

#### **Obdobje opazovanja**

18. Obdobje opazovanja mora biti dovolj dolgo, da se lahko v celoti ovrednoti popravljivost opaženih učinkov. Preskus je treba zaključiti, kadar koli žival pokaže znake hude bolečine ali trpljenja. Za določitev povračljivosti učinkov je treba živali opazovati 14 dni po odstranitvi obližev. Če se povračljivost opazi pred 14. dnem, je treba preskus zaključiti takrat.

#### **Klinična opazovanja in razvrščanje kožnih reakcij v stopnje**

19. Pri vseh živalih je treba preveriti znake rdečine in edemov ter odzive evidentirati po 60 minutah ter nato po 24, 48 in 72 urah po odstranitvi obliža. Pri začetnih preskusih na eni živali se preskusni predel preveri tudi takoj po odstranitvi obliža. Kožne reakcije se razvrstijo v stopnje in evidentirajo v skladu s stopnjami iz spodnje tabele. Če po 72 urah nastane poškodba kože, ki je ni mogoče opredeliti kot dražilnost ali jedkost, so morda potrebna opazovanja do 14. dne, da se opredeli povračljivost učinkov. Poleg opazovanja dražilnosti je treba v celoti opisati in evidentirati vse lokalne toksične učinke, npr. tanjšanje kože, in vse sistemske nasprotno učinke (npr. učinke na klinične znake toksičnosti in telesno težo). Za razjasnitev dvoumnih odzivov je morda treba opraviti histopatološki pregled.
20. Razvrščanje kožnih odzivov je nujno subjektivno. Da bi se izboljšala usklajenost pri določanju stopnje kožnega odziva ter bi se preskuševalnim laboratorijem in vsem sodelujočim pomagalo pri oblikovanju in razlagi rezultatov opazovanj, mora biti osebje, ki izvaja ta opazovanja, ustrezno usposobljeno za uporabo sistema določanja stopnje (glej

tabelo spodaj). Pri tem bi lahko bil v pomoč ilustriran priročnik za določanje stopnje dražilnosti kože in drugih lezij (3).

## PODATKI IN POROČANJE

21. Rezultate študije je treba v obliki preglednice povzeti v končnem poročilu o preskusu, zajemati pa morajo vse postavke s seznama v odstavku 24.

### Vrednotenje rezultatov

22. Rezultate draženja kože je treba vrednotiti v povezavi z vrsto in resnostjo lezij ter njihovo povračljivostjo ali nepovračljivostjo. Posamezni rezultati ne pomenijo absolutnega standarda za dražilne lastnosti materiala, ker se ocenjujejo tudi drugi učinki preskusnega materiala. Pač pa je treba posamezne rezultate obravnavati kot referenčne vrednosti, ki jih je treba vrednotiti v povezavi z vsemi drugimi opažanji iz študije.
23. Pri oceni dražilnih odzivov je treba upoštevati povračljivost kožnih lezij. Kadar so odzivi, npr. alopecija (omejen predel), hiperkeratoza, hiperplazija in luščenje, vidni do konca 14-dnevnega obdobja opazovanja, je treba preskusno kemikalijo obravnavati kot dražilno.

### Poročilo o preskusu

24. Poročilo o preskusu mora vsebovati informacije, navedene v nadaljevanju.

#### *Utemeljitev preskusa in vivo:*

- analiza, ki temelji na zanesljivosti dokazov in se nanaša na obstoječe preskusne podatke, vključno z rezultati strategije zaporednega preskušanja;
- opis pomembnih podatkov, ki so na voljo iz prejšnjih preskušanj;
- podatki, pridobljeni v vsaki fazi strategije preskušanja;
- opis izvedenih preskusov *in vitro*, vključno s podrobnimi podatki o postopkih, rezultati, dobljenimi s preskusnimi/referenčnimi snovmi;
- analiza, ki temelji na zanesljivosti dokazov, za izvedbo študije *in vivo*.

#### *Preskusna kemikalija:*

- snov iz ene sestavine: kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- snov z več sestavinami, zmes in snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali (UVCB): čim obsežnejša opredelitev lastnosti s

kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin;

- fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;
- vir, številka serije, če je na voljo;
- obdelava preskusnih/kontrolnih kemikalij pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, drobljenje);
- stabilnost preskusne kemikalije, rok uporabe ali datum za ponovno analizo, če je znan;
- pogoji skladiščenja.

*Vehikel:*

- identifikacija, koncentracija (kjer je ustrezno), uporabljena količina;
- utemeljitev izbire vehikla.

*Preskusne živali:*

- uporabljena vrsta/sev, obrazložitev za uporabo živali, če to ni kunec beličnik;
- število živali po spolu;
- teža posamezne živali ob začetku in zaključku preskusa;
- starost na začetku študije;
- izvor živali, nastanitvene razmere, prehrana itd.

*Preskusni pogoji:*

- tehnika priprave območja nanosa obliža;
- podrobnosti o uporabljenih materialih ter tehniki priprave in nanosa obliža,
- podrobnosti o pripravi, nanosu in odstranitvi preskusne kemikalije.

*Rezultati:*

- preglednica doseženih rezultatov odziva na dražilnost/jedkost za vsako žival na vseh izmerjenih časovnih točkah;
- opis vseh opaženih lezij;
- podroben opis vrste in stopnje opažene dražilnosti ali jedkosti in morebitne histopatološke ugotovitve;
- opis drugih neželenih lokalnih (npr. tanjšanje kože) in sistemskih učinkov poleg dražilnosti kože ali jedkosti za kožo.

*Obravnava rezultatov*

*Sklepne ugotovitve*

## VIRI

- (1) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 203), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (2) OECD (1998). Usklajen celostni sistem razvrstitve kemijskih snovi glede na nevarnosti za zdravje ljudi in vplive na okolje, kot sta ga novembra 1998 na 28. skupnem zasedanju potrdila Odbor za kemikalije in Delovna skupine za kemikalije.
- (3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 19), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

**PREGLEDNICA: RAZVRŠČANJE KOŽNIH REAKCIJ V STOPNJE****Nastanek rdečine in krast**

Rdečine ni.....	0
Neznatna rdečina (komajda opazna).....	1
Zelo razločna rdečina.....	2
Zmerna do resna rdečina.....	3
Resna rdečina (goveja rdečina) in nastanek krast, ki ovira razvrstitev rdečine...	4
Najvišja možna stopnja: 4	

**Tvorba kožnih edemov**

Kožnih edemov ni.....	0
Neznaten kožni edem (komajda opazen).....	1
Rahel edem (robovi predela dobro vidni, ker so izbočeni).....	2
Zmeren kožni edem (izbočen približno 1 mm).....	3
Resen kožni edem (izbočen več kakor 1 mm in razširjen zunaj predela izpostavitve)....	4
Najvišja možna stopnja: 4	

Za razjasnitev dvoumnih odzivov se lahko opravi histopatološki pregled.

## Dodatek

### **OPREDELITVE POJMOV**

Kemikalija je snov ali zmes.

Draženje kože je nastanek povračljive poškodbe kože po nanosu preskusne kemikalije za največ 4 ure.

Jedkost za kožo je nastanek nepovračljivih poškodb kože, zlasti vidnega odmiranja prek povrhnjice v usnjico po nanosu preskusne kemikalije za največ 4 ure. Za reakcije jedkosti so značilne razjede, krvavitve, krvave hraste in do konca 14-dnevnega opazovanja izguba barve zaradi beljenja kože, celi predeli alopecije in brazgotine. Dvoumne lezije je morda treba preiskati histopatološko.

Preskusna kemikalija je vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.“

(2) Poglavje B.17 dela B se nadomesti z naslednjim:

**„B.17 *IN VITRO* PRESKUSI GENSKIH MUTACIJ V CELICAH SESALCEV Z UPORABO GENOV HPRT IN XPRT**

**UVOD**

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje 476 (2016). Preskusne metode se redno preverjajo ob upoštevanju znanstvenega napredka, spreminjajočih se regulativnih zahtev in dobrobiti živali. V tej revidirani različici preskusne metode B.17 se upoštevajo skoraj tridesetletne izkušnje s tem preskusom, pa tudi rezultati razvijanja ločene nove metode za *in vitro* preskuse genskih mutacij v celicah sesalcev z uporabo gena za timidin kinazo. Preskusna metoda B.17 je del sklopa preskusnih metod v zvezi z genetsko toksikologijo. OECD je pripravila dokument z jedrnatimi informacijami o preskušanju v zvezi z genetsko toksikologijo in pregledom nedavnih sprememb smernic OECD za preskušanje v zvezi z genetsko toksikologijo (1).
2. Namen *in vitro* preskusa genskih mutacij v celicah sesalcev je zaznati genske mutacije, katerih nastanek povzročajo kemikalije. S celičnimi linijami, uporabljenimi pri teh preskusih, se merijo napredne mutacije na poročevalskih genih, natančneje endogenem genu za hipoksantin-gvanin-fosforibozil-transferazo (Hprt v celicah glodavcev, HPRT v človeških celicah; pri tej preskusni metodi v nadaljnjem besedilu skupaj: gen Hprt in preskus HPRT) in transgenu za ksantin-gvanin-fosforibozil-transferazo (gpt) (v nadaljnjem besedilu: preskus XPRT). S preskusi mutacij HPRT in XPRT se zaznajo različne vrste genskih pojavov. Poleg mutacijskih pojavov, zaznanih s preskusom HPRT (npr. substitucije baznih parov, premiki bralnega okvira, majhne delecije in insercije), lahko lokacija transgena gpt na avtosomih omogoči zaznavo mutacij, ki so posledica obsežnih delecij, in morebitne mitotične rekombinacije, ki se ne zazna s preskusom HPRT, ker je gen Hprt na kromosomu X (2) (3) (4) (5) (6) (7). Preskus XPRT se za regulativne namene trenutno uporablja manj pogosto kot preskus HPRT.
3. Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

**ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE**

4. Pri preskusih, izvedenih *in vitro*, je običajno treba uporabiti zunanji vir presnovne aktivacije. Zunanji sistem presnovne aktivacije ne posnema pogojev *in vivo* v celoti.
5. Paziti je treba, da se izogibamo pogojem, ki bi vodili do lažno pozitivnih rezultatov (tj. morebitnemu medsebojnemu delovanju s preskusnim sistemom), ki jih ne bi povzročilo neposredno medsebojno delovanje preskusnih kemikalij in genetskega materiala celice; med take pogoje spadajo spremembe vrednosti pH ali osmolarnosti (8) (9) (10), medsebojno delovanje s sestavinami gojišča (11) (12) ali previsoke ravni

citotoksičnosti (13). Za citotoksičnost, ki presega priporočene najvišje ravni citotoksičnosti, kot so opredeljene v odstavku 19, se šteje, da je prevelika za preskus HPRT.

6. Preden se preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni.

## NAČELO PRESKUSA

7. Mutirane celice brez aktivnosti encima Hprt pri preskusu HPRT ali aktivnosti encima xpRT pri preskusu XPRT so odporne proti citostatskim učinkom analoga purina 6-tiogvanina (TG). Celice s Hprt (pri preskusu HPRT) ali gpt (pri preskusu XPRT) so občutljive za TG, ki zavira celično presnovo in ustavi celično delitev. Mutirane celice so tako sposobne množitve v navzočnosti TG, medtem ko normalne celice, ki vsebujejo encim Hprt (pri preskusu HPRT) ali gpt (pri preskusu XPRT), niso.
8. Celice v suspenziji ali enoplastni kulturi se za ustrezno obdobje (3–6 ur) izpostavijo preskusni kemikaliji, in sicer z zunanjim virom presnovne aktivacije (glej odstavek 14) in brez njega, nato pa se kultivirajo na novem gojišču, da se določi citotoksičnost in omogoči izražanje fenotipa pred selekcijo mutant (14) (15) (16) (17). Citotoksičnost se določi glede na relativno preživetje, tj. učinkovitost tvorbe klonov, izmerjeno takoj po tretiranju in prilagojeno glede na morebitno izgubo celic med tretiranjem v primerjavi z negativno kontrolo (odstavek 18 in Dodatek 2). Tretirane kulture se vzdržujejo v gojišču dovolj dolgo obdobje, ki je značilno za vsako vrsto celic, da se omogoči skoraj optimalno izražanje fenotipa induciranih mutacij (običajno najmanj 7–9 dni). Po izražanju fenotipa se pogostnost mutant določi z nasaditvijo znanega števila celic v gojišče s selektivno snovjo, da se zaznajo mutirane kolonije, in v gojišče brez selektivne snovi, da se določi učinkovitost tvorbe klonov (viabilnost). Po ustrezno dolgi inkubaciji se preštejejo kolonije. Pogostnost mutant se izračuna iz števila mutiranih kolonij, korigiranega z učinkovitostjo tvorbe klonov ob selekciji mutant.

## OPIS METODE

### Pripravki

#### *Celice*

9. Vrste celic, uporabljene pri preskusih HPRT in XPRT, morajo imeti dokazano občutljivost za kemične mutagene, veliko učinkovitost tvorbe klonov, stabilen kariotip in stabilno pogostnost spontanega mutant. Med najpogosteje uporabljenimi celicami za preskus HPRT so linije celic kitajskega hrčka CHO, CHL in V79, celice limfoma miši L5178Y in

človeške limfoblastoidne celice TK6 (18) (19). Pri preskusu XPRT se uporabljajo celice AS52, pridobljene iz CHO, ki vsebujejo transgen gpt (in v katerih je izbrisan gen Hprt) (20) (21); preskusa HPRT ni mogoče izvesti s celicami AS52, ker je bil gen hprt izbrisan. Uporaba drugih celičnih linij mora biti utemeljena in validirana.

10. Redno je treba preverjati, ali je modalno kromosomsko število v celičnih linijah stabilno in ali te linije niso okužene z mikoplazmo (22) (23); celice se ne smejo uporabljati, če so okužene ali če se je spremenilo modalno kromosomsko število. Določiti je treba običajno trajanje celičnega cikla, uporabljenega v preskuševalnem laboratoriju, ki mora biti skladno z objavljenimi lastnostmi celic. Preveriti je treba tudi pogostnost spontanih mutant v zalogi matičnih celic, pri čemer se zaloga ne sme uporabiti, če pogostnost mutant ni sprejemljiva.
11. Pred uporabo pri tem preskusu je iz kultur morda treba odstraniti že obstoječe mutirane celice, npr. z gojenjem v gojišču HAT za preskus HPRT in MPA za preskus XPRT (5) (24) (glej Dodatek 1). Očiščene celice se lahko shranijo z zamrzovanjem in nato odtalijo, da se uporabijo kot delovne zaloge. Novoodtaljena delovna zaloga se lahko uporabi za preskus, ko so doseženi običajni podvojitveni časi. Pri izvajanju preskusa XPRT je treba pri rutinskem gojenju celic AS52 uporabiti pogoje, ki zagotavljajo vzdrževanje transgena gpt (20).

### **Gojišča in pogoji kultiviranja**

12. Za vzdrževanje kultur je treba uporabiti ustrezno gojišče in pogoje inkubacije (posode za gojenje, vlažno ozračje s 5 % CO<sub>2</sub> in temperatura inkubacije 37 °C). Celične kulture je treba vedno vzdrževati v pogojih, ki zagotavljajo njihovo rast v logaritemski fazi. Posebno pomembno je, da se izberejo takšna gojišča in pogoji kultiviranja, ki zagotavljajo optimalno rast celic v času izražanja in optimalno učinkovitost tvorbe klonov mutiranih, pa tudi nemutiranih celic.

### **Priprava kultur**

13. Celične linije se namnožijo iz osnovnih kultur ter nasadijo v gojišče tako na gosto, da celice v suspenzijah ali monosloju med obdobji tretiranja in izražanja še naprej eksponentno rastejo (npr. pri celicah, ki rastejo v monosloju, se je treba izogibati konfluenci).

### **Presnovna aktivacija**

14. Pri uporabi celic, ki nimajo ustrezne notranje sposobnosti presnavljanja, je treba uporabiti zunanje presnovne sisteme. Najpogosteje uporabljeni sistem, ki je priporočen kot privzet, razen če ni drugače utemeljeno, je s kofaktorjem dopolnjena postmitohondrijska frakcija (S9), pripravljena iz jeter glodavcev (običajno podgan), ki so bila obdelana s sredstvi za encimsko indukcijo, kot je Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28), ali z mešanico fenobarbitala in  $\beta$ -naftoflavona (29) (30) (31) (32). Zadnjenavedena mešanica ni v nasprotju s

Stockholmsko konvencijo o obstojnih organskih onesnaževalih (33) ter se je v primerjavi s sredstvom Aroclor 1254 izkazala kot enako učinkovita za povzročanje oksidaz z mešano funkcijo (29) (31). Frakcija S9 se v končnem preskusnem gojišču običajno uporablja v koncentracijah, ki se gibljejo v razponu od 1 do 2 vol. %, lahko pa se poveča na 10 vol. %. Na izbiro vrste in koncentracije zunanega sistema presnovne aktivacije ali sredstva za indukcijo presnove lahko vpliva razred snovi, ki se preskušajo (34) (35) (36).

### **Priprava preskusne kemikalije**

15. Trdne preskusne kemikalije je treba pred tretiranjem celic pripraviti v ustreznih topilih in razredčiti, če je to ustrezno (glej odstavek 16). Tekoče preskusne kemikalije se lahko dodajo neposredno v preskusni sistem in/ali razredčijo pred tretiranjem preskusnega sistema. Plinaste ali hlapne preskusne kemikalije je treba preskusiti z ustrezno prilagojenimi standardnimi protokoli, kot je tretiranje v zatesnjenih posodah za gojenje (37) (38). Preskusne kemikalije je treba pripraviti tik pred tretiranjem, razen če podatki o stabilnosti kažejo, da je shranjevanje sprejemljivo.

## **PRESKUSNI POGOJI**

### **Topila**

16. Izbrati je treba tako topilo, ki optimira topnost preskusne kemikalije in ne vpliva negativno na izvedbo preskusa, npr. ne spremeni rasti celic, ne vpliva na celovitost preskusne kemikalije, ne reagira s posodami za gojenje, ne ovira sistema presnovne aktivacije. Priporočljivo je, da se, kadar koli je to mogoče, najprej razmisli o uporabi vodnega topila (ali gojišča). Zelo uveljavljeni topili sta na primer voda ali dimetil sulfoksid. Organska topila v končnem obdelovalnem gojišču v splošnem ne smejo presežati 1 vol. %, vodna topila (fiziološka raztopina ali voda) pa ne 10 vol. %. Če uporabljena topila niso uveljavljena (npr. etanol ali aceton), je treba njihovo uporabo podpreti s podatki, ki dokazujejo njihovo združljivost s preskusnimi kemikalijami in preskusnim sistemom ter neobstoje genotoksičnosti pri uporabljeni koncentraciji. Če takšnih podpornih podatkov ni, je treba dodati netretirane kontrole (glej Dodatek 1), ki dokazujejo, da izbrano topilo ne povzroča škodljivih ali mutagenih učinkov.

### **Merjenje citotoksičnosti in izbiranje koncentracij izpostavljenosti**

17. Pri določanju najvišje koncentracije preskusne kemikalije se je treba izogibati koncentracijam, pri katerih se lahko pojavijo lažni pozitivni odzivi, kot so tisti, ki povzročajo preveliko citotoksičnost (glej odstavek 20), obarjanje v gojiščih (glej odstavek 21) ali znatne spremembe vrednosti pH ali osmolarnosti (glej odstavek 5). Če preskusna kemikalija ob dodajanju povzroči znatno spremembo vrednosti pH v gojišču, se lahko vrednost pH prilagodi z dodajanjem pufru v končno obdelovalno gojišče, da se preprečijo lažno pozitivni rezultati in vzdržujejo ustrezni pogoji kultiviranja.

18. Izbira koncentracije temelji na citotoksičnosti in drugih preudarkih (glej odstavke 20–22). Čeprav je lahko koristno, da se zaradi boljšega določanja koncentracij, ki jih je treba uporabiti v glavnem preskusu, citotoksičnost oceni v začetnem preskusu, ta preskus ni obvezen. Tudi če se izvede začetna ocena citotoksičnosti, je treba pri glavnem preskusu še vedno izmeriti citotoksičnost vsake kulture. Oceniti jo je treba na podlagi relativnega preživetja, tj. učinkovitosti tvorbe klonov celic, nasajenih na ploščo takoj po tretiranju, prilagojeni z morebitno izgubo celic med tretiranjem na podlagi štetja celic, v primerjavi s prilagojeno učinkovitostjo tvorbe klonov pri negativnih kontrolah (ki se jim pripiše 100-odstotno preživetje) (za formulo glej Dodatek 2).
19. Oceniti je treba vsaj štiri preskusne koncentracije (v kar niso vključeni topilo in pozitivne kontrole), ki izpolnjujejo merila za sprejemljivost (ustrezna citotoksičnost, število celic itd.). Čeprav je priporočljiva uporaba podvojenih kultur, se lahko pri vsaki preskušeni koncentraciji uporabi ponovljeni vzorec kulture ali le ena sama tretirana kultura. Rezultate, pridobljene pri neodvisnih ponovljenih vzorcih kultur za zadevno koncentracijo, je treba navesti ločeno, vendar se lahko za podatkovno analizo združijo (17). Za preskusne kemikalije, ki kažejo malo ali nič citotoksičnosti, so ustrezni približno 2- do 3-kratni intervali med koncentracijami. V primeru citotoksičnosti morajo izbrane preskusne koncentracije zajemati območje od koncentracije, ki povzroča citotoksičnosti, do koncentracij, pri katerih je citotoksičnost zmerna oziroma majhna ali je ni. Pri številnih preskusnih kemikalijah so vidne strme krivulje odziva na koncentracijo, zato je za zajem celotnega območja citotoksičnosti ali podrobno preučitev razmerja med koncentracijo in odzivom morda treba uporabiti večje število koncentracij, ki so tesno skupaj, in več kot štiri koncentracije, zlasti kadar je treba poskus ponoviti (glej odstavek 43). Uporaba več kot štirih koncentracij je lahko še zlasti pomembna, če se uporabi ena sama kultura.
20. Če največja koncentracija temelji na citotoksičnosti, si je treba pri najvišji koncentraciji prizadevati za od 20- do 10-odstotno relativno preživetje. Pazljivost je potrebna pri razlagi pozitivnih rezultatov, dobljenih samo pri 10-odstotnem ali manjšem relativnem preživetju (odstavek 43).
21. Pri slabo topnih preskusnih kemikalijah, ki pri koncentracijah, nižjih od najnižje netopne koncentracije, niso citotoksične, mora najvišja analizirana koncentracija ob koncu tretiranja s preskusno kemikalijo povzročiti nastanek motnosti ali oborine, ki je vidna s prostim očesom ali pod invertnim mikroskopom. Tudi če se citotoksičnost pojavi nad najnižjo netopno koncentracijo, je priporočljivo, da se preskusi le pri eni koncentraciji, ki povzroči nastanek motnosti ali vidne oborine, saj lahko oborina povzroči lažne učinke. Pri koncentraciji, ki povzroči nastanek oborine, je treba paziti, da oborina ne vpliva na izvedbo preskusa. Koristno je lahko, če se pred preskusom določi topnost v gojišču.
22. Če oborina ni vidna ali ni opažene mejne citotoksičnosti, mora najvišja preskusna koncentracija ustrezati 10 mM, 2 mg/ml ali 2 µl/ml, pri čemer se upošteva najnižja od teh

koncentracij (39) (40). Če preskusna kemikalija nima določene sestave, kot so snovi z neznanom ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali (tj. kemijske snovi z neznanom ali spremenljivo sestavo (UVCB)) (41), okoljski ekstrakti itd., je v primeru odsotnosti ustrezne citotoksičnosti morda treba povečati najvišjo koncentracijo (npr. 5 mg/ml), da bi se povečala koncentracija vsake posamezne sestavine. Vendar je treba opozoriti, da se lahko pri zdravilih za uporabo v humani medicini te zahteve razlikujejo (42).

## Kontrole

23. Za vsak preskusni pogoj je treba vključiti sočasne negativne kontrole (glej odstavek 16), sestavljene le iz topila v obdelovalnem gojišču in obdelane enako kot kulture za tretiranje.
24. Sočasne pozitivne kontrole so potrebne, da se dokažeta zmožnost laboratorija, da odkrije mutagene pod pogoji uporabljenega preskusnega protokola, in učinkovitost zunanjega sistema presnovne aktivacije, če je ustrezno. Primeri pozitivnih kontrol so navedeni v preglednici 1. Za pozitivno kontrolo se lahko uporabijo tudi druge snovi, če je to utemeljeno. Ker so *in vitro* preskusi genotoksičnosti za celice sesalcev dovolj standardizirani, se lahko preskusi, pri katerih se uporablja tretiranje z zunanjim sistemom presnovne aktivacije in brez njega, izvedejo tudi samo s pozitivno kontrolo, pri kateri je potrebna presnovna aktivacija. V tem primeru en sam odziv pri pozitivni kontroli dokaže tako dejavnost sistema presnovne aktivacije kot tudi odzivnost preskusnega sistema. Vsako pozitivno kontrolo je treba uporabiti pri eni ali več koncentracijah, pri katerih se pričakuje obnovljivo in zaznavno povečanje glede na ozadje, da se dokaže občutljivost preskusnega sistema, odziva pa ne sme ogroziti citotoksičnost, ki bi presegla meje, določene za to preskusno metodo (glej odstavek 20).

**Preglednica 1:** Referenčne snovi, ki se priporočajo za ocenjevanje usposobljenosti laboratorija in izbor pozitivne kontrole

Stanje presnovne aktivacije	Lokus	Snov in št. CAS
Ni zunanje presnovne aktivacije	<i>Hprt</i>	Etilmetansulfonat [št. CAS 62-50-0] Etilnitrozourea [št. CAS 759-73-9] 4-nitrokvinolin 1-oksidi [št. CAS 56-57-5]
	<i>Xprt</i>	Streptonigrin [št. CAS 3930-19-6] Mitomicin C [št. CAS 50-07-7]
Zunanja presnovna aktivacija	<i>Hprt</i>	3-metilkolantren [št. CAS 56-49-5] 7,12-dimetilbenzantracen [št. CAS 57-97-6] Benzo[a]piren [št. CAS 50-32-8]
	<i>Xprt</i>	Benzo[a]piren [št. CAS 50-32-8]

## POSTOPEK

### Tretiranje s preskusno kemikalijo

25. Množeče se celice se tretirajo s preskusno kemikalijo v prisotnosti in odsotnosti sistema presnovne aktivacije. Čas izpostavljenosti naj bo ustrezno dolg (navadno je ustrezno 3–6 ur).
26. Najmanjše število celic, ki se za vsako preskusno kulturo (kontrolno in tretirano) uporabijo v vsaki fazi preskusa, mora temeljiti na pogostnosti spontanega mutant. Splošno vodilo je, da se tretira in pasajira dovolj celic, da se v vseh fazah preskusa v vsaki kulturi vzdržuje 10 spontanega mutant (17). Pogostnost spontanega mutant običajno znaša med  $5$  in  $20 \times 10^{-6}$ . Za pogostnost spontanega mutant  $5 \times 10^{-6}$  in vzdrževanje zadostnega števila spontanega mutant (10 ali več) tudi za kulture, tretirane pri koncentracijah, ki povzročijo 90-odstotno citotoksičnost med tretiranjem (10-odstotno relativno preživetje), bi bilo treba tretirati vsaj  $20 \times 10^{-6}$  celic. Poleg tega je treba v obdobju izražanja kultivirati in nasaditi na ploščo zadostno število celic (vendar nikoli manj kot 2 milijona) za selekcijo mutant (17).

### Čas izražanja fenotipa in merjenje pogostnosti mutant

27. Po obdobju tretiranja se celice kultivirajo, da se omogoči izražanje fenotipa mutant. Najmanj 7–9 dni običajno zadostuje za skoraj optimalno izražanje fenotipa na novo induciranih mutant Hprt in xprt (43) (44). V tem obdobju se celice redno kultivirajo v novem gojišču, da se vzdržujejo v fazi eksponentne rasti. Po izražanju fenotipa se celice znova nasadijo v gojišče s selektivno snovjo (6-tiogvanin) in gojišče brez take snovi, da se določita število mutant oziroma učinkovitost tvorbe klonov ob selekciji. Za to nasaditev se lahko uporabijo posode za monoslojne kulture ali mikrotitrne plošče za celice v suspenziji. Za selekcijo mutant je treba celice nasaditi tako na gosto, da se zagotovi optimalna pridobitev mutant (tj. da se prepreči metabolično sodelovanje) (17). Plošče se inkubirajo primerno dolgo za optimalno rast kolonije (npr. 7–12 dni), kolonije pa se preštejejo. Pogostnost mutant se izračuna iz števila mutiranih kolonij, korigiranega z učinkovitostjo tvorbe klonov ob selekciji mutant (za formule glej Dodatek 2).

### Usposobljenost laboratorija

28. Preden se začne laboratorij uporabljati za rutinsko preskušanje, mora izvesti sklop preskusov z referenčnimi pozitivnimi snovmi, ki delujejo z različnimi mehanizmi (vsaj ena aktivna s presnovno aktivacijo in ena aktivna brez nje, pri čemer sta snovi izbrani med snovmi s seznama v preglednici 1) in različnimi negativnimi kontrolami (z uporabo različnih topil/vehiklov), s čimer dokaže, da ima zadostne izkušnje s preskusom. Ti odzivi pozitivnih in negativnih kontrol morajo biti skladni z viri. To ne velja za laboratorije, ki imajo izkušnje, tj. ki imajo na voljo zbirko podatkov iz preteklih preskusov, kot je opredeljena v odstavkih od 30 do 33.

29. Izbor snovi za pozitivno kontrolo (glej preglednico 1 v odstavku 25) je treba preiskati brez presnovne aktivacije in ob presnovni aktivaciji, da se dokažejo usposobljenost za zaznavanje mutagenih kemikalij in določanje učinkovitosti sistema presnovne aktivacije, ustreznost pogojev za rast celic med tretiranjem, izražanjem fenotipa in selekcijo mutant ter ustreznost postopkov štetja. Izbrati je treba območje koncentracij izbranih snovi, kar omogoča ponovljiva in s koncentracijo povezana povečanja glede na ozadje, da se pokažeta občutljivost in dinamično območje preskusnega sistema.

### **Podatki o kontrolah iz preteklih preskusov**

30. Laboratorij mora določiti:

- območje in porazdelitev pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov ter
- območje in porazdelitev negativnih kontrol (netretirane, topilo) iz preteklih preskusov.

31. Ko se podatki za porazdelitev negativnih kontrol iz preteklih preskusov pridobivajo prvič, morajo biti sočasne negativne kontrole skladne z objavljenimi podatki o kontrolah (22). Ko se k porazdelitvi kontrol dodaja več podatkov o preskusu, sočasne negativne kontrole po možnosti ne smejo presežati 95-odstotne kontrolne meje za navedeno porazdelitev (17) (45) (46).

32. Zbirka podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov mora sprva temeljiti na vsaj 10 preskusih, po možnosti pa mora biti sestavljena iz vsaj 20 preskusov, izvedenih v primerljivih preskusnih pogojih. Laboratoriji morajo uporabljati metode nadzora kakovosti, kot so kontrolne karte (npr. c-karte ali karte ‚X-črta‘ (47)), da opredelijo, kako variabilni so njihovi podatki o pozitivnih in negativnih kontrolah, ter pokažejo, da je metodologija v njihovem laboratoriju ‚pod nadzorom‘ (46). Nadaljnja priporočila o načinu oblikovanja in uporabe podatkov iz preteklih preskusov (npr. merila za vključitev podatkov med podatke iz preteklih preskusov in njihovo izključitev iz teh podatkov ter merila za sprejemljivost za zadevni poskus) so navedena v virih (45).

33. V podatke o negativnih kontrolah je treba vključiti pogostnost mutant iz ene kulture ali po možnosti ponovljenih vzorcev kulture, kot je opisano v odstavku 23. Sočasne negativne kontrole po možnosti ne smejo presežati 95-odstotne kontrolne meje porazdelitve iz zbirke podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (17) (45) (46). Kadar podatki o sočasni negativni kontroli presežejo 95-odstotno kontrolno mejo, jih je sprejemljivo vključiti v porazdelitev kontrol iz preteklih preskusov, če ti podatki niso izjemni osamelci ter če obstaja dokaz, da je preskusni sistem ‚pod nadzorom‘ (glej zgoraj), in dokaz o odsotnosti tehničnih ali človeških napak.

34. Vsako spremembo v protokolu preskusa je treba preučiti glede na skladnost z obstoječimi zbirkami podatkov laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov. Če se pojavijo večje neskladnosti, je treba ustvariti novo zbirko podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov.

## PODATKI IN POROČANJE

### Predstavitev rezultatov

35. V predstavitev rezultatov je treba vključiti vse podatke, potrebne za izračun citotoksičnosti (izražene kot relativno preživetje). Podatki za tretirane in kontrolne kulture morajo vključevati število celic ob koncu tretiranja, število celic, nasajenih na ploščo takoj po tretiranju, in število kolonij (ali število jamic brez kolonij pri metodi z mikrotitrsko ploščo). Relativno preživetje za vsako kulturo je treba izraziti kot delež glede na hkratno kontrolo s topilom (za opredelitve pojmov glej Dodatek 1).
36. V predstavitev rezultatov je treba vključiti tudi vse podatke, potrebne za izračun pogostnosti mutant. Podatki za tretirane in kontrolne kulture morajo vključevati: (1) število celic, nasajenih na ploščo s selektivno snovjo in brez take snovi (ob nasaditvi celic na ploščo za selekcijo mutant), ter (2) število prešteti kolonij (ali število jamic brez kolonij pri metodi z mikrotitrsko ploščo) na ploščah s selektivno snovjo in brez take snovi. Pogostnost mutant se izračuna iz števila mutiranih kolonij (na ploščah s selektivno snovjo), korigiranega z učinkovitostjo tvorbe klonov (s plošč brez selektivne snovi). Pogostnost mutant je treba izraziti kot število mutiranih celic na milijon viabilnih celic (za opredelitve pojmov glej Dodatek 1).
37. Navesti je treba podatke za posamezne kulture. Poleg tega je treba vse podatke povzeti v obliki preglednice.

### Merila za sprejemljivost

38. Sprejemljivost preskusa temelji na merilih, navedenih v nadaljevanju.
- Šteje se, da je sočasna negativna kontrola sprejemljiva za vključitev v zbirko podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov, kot je opisano v odstavku 33.
  - Sočasne pozitivne kontrole (glej odstavek 24) morajo povzročiti odzive, skladne z odzivi iz zbirke podatkov o pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov, in statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo.
  - Preskušena sta bila dva preskusna pogoja (tj. s presnovno aktivacijo in brez nje), razen če so pri enem nastali pozitivni rezultati (glej odstavek 25).
  - Analizirati je mogoče ustrezno število celic in koncentracij (odstavki 25, 26 in 19).
  - Merila za izbor najvišje koncentracije so skladna z merili, opisanimi v odstavkih 20, 21 in 22.

### Vrednotenje in razlaga rezultatov

39. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje kot jasno pozitivna, če se v katerem koli od preučevanih preskusnih pogojev:

- pri vsaj eni od preskusnih koncentracij pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;
- pojavi povečanje, povezano s koncentracijo, kadar se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom;
- pojavijo rezultati zunaj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi; glej odstavek 33).

Ko so izpolnjena vsa ta merila, se nato šteje, da lahko preskusna kemikalija povzroči nastanek genskih mutacij v kultiviranih celicah sesalcev v tem preskusnem sistemu. Priporočila glede najustreznejših statističnih metod so navedena v virih (46) (48).

40. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno negativno, če se v katerem koli od preučevanih preskusnih pogojev:

- pri nobeni od preskusnih koncentracij ne pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;
- ne pojavi povečanje, povezano s koncentracijo, kadar se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom;
- vsi rezultati nahajajo znotraj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi; glej odstavek 33).

Nato se šteje, da preskusna kemikalija ne more povzročiti nastanka genskih mutacij v kultiviranih celicah sesalcev v tem preskusnem sistemu.

41. Preverjanje jasno pozitivnega ali jasno negativnega odziva ni potrebno.

42. Če odziv ni niti jasno negativen niti jasno pozitiven, kot je opisano zgoraj, ali za podporo pri ugotavljanju biološke pomembnosti rezultatov je treba podatke oceniti s strokovno presojo in/ali nadaljnjimi preiskavami. Izvedba ponovitve poskusa je lahko koristna, po možnosti z uporabo spremenjenih preskusnih pogojev (npr. razmik med koncentracijami, drugi pogoji za presnovno aktivacijo (tj. koncentracija ali izvor S9)).

43. Zbirka podatkov v redkih primerih celo po izvedbi nadaljnjih preiskav onemogoča sprejetje sklepa o pozitivnih ali negativnih rezultatih. Zato je treba zaključiti, da je odziv na preskusno kemikalijo dvoumen (kar pomeni, da je enako verjetno pozitiven ali negativen).

### **Poročilo o preskusu**

44. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

*Preskusna kemikalija:*

- vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;
- stabilnost preskusne kemikalije, če je znana;
- topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu, če sta znani;
- meritve vrednosti pH, osmolarnosti in oborine v gojišču, ki mu je bila dodana preskusna kemikalija, če je ustrezno.

## snov iz ene sestavine:

- fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;
- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

## Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

- čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

*Topilo:*

- utemeljitev izbire topila;
- delež topila v končnem gojišču.

*Celice:*

## za laboratorijske izvirne kulture:

- vrsta, izvor celičnih linij;
- število pasajž, če je na voljo, in pretekli rezultati v laboratoriju;
- lastnosti kariotipa in/ali modalno število kromosomov;
- metode vzdrževanja celičnih kultur;
- odsotnost mikoplazem;
- podvojitveni čas celic.

*Preskusni pogoji:*

- razlogi za izbiro koncentracij in števila kultur, vključno z npr. podatki o citotoksičnosti in mejami topnosti;
- sestava gojišču, koncentracija CO<sub>2</sub>, stopnja vlažnosti;

- koncentracija preskusne kemikalije, izražena kot končna koncentracija v gojišču (npr. v  $\mu\text{g}$  ali  $\text{mg/ml}$  ali  $\text{mM}$  gojišča);
- koncentracija (in/ali količina) topila in preskusne kemikalije, ki se dodata v gojišče;
- temperatura inkubacije;
- čas inkubacije;
- trajanje tretiranja;
- gostota celic med tretiranjem;
- vrsta in sestava sistema presnovne aktivacije (vir S9, način priprave zmesi S9, koncentracija ali količina zmesi S9 in S9 v končnem gojišču, nadzor kakovosti S9);
- snovi pozitivne in negativne kontrole, končne koncentracije za vsak pogoj tretiranja;
- dolžina časa izražanja (skupaj s številom nasajenih celic ter programom kultiviranja na novem gojišču in dodajanja hranil, če je to primerno);
- identiteta selektivne snovi in njena koncentracija;
- merila za sprejemljivost preskusov;
- uporabljene metode za določanje števila viabilnih in mutiranih celic;
- uporabljene metode za merjenje citotoksičnosti;
- vsi dodatni podatki, pomembni za citotoksičnost in uporabljeno metodo;
- trajanje inkubacije po nasaditvi na ploščo;
- merila za obravnavanje študij kot pozitivnih, negativnih ali dvoumnih;
- uporabljene metode za določitev vrednosti pH, osmolarnosti in obarjanja.

*Rezultati:*

- število tretiranih celic in število celic, kultiviranih na novem gojišču, za vsako kulturo;
- meritve citotoksičnosti in morebitna druga opažanja;
- znaki obarjanja in čas odkritja;
- število celic, nasajenih v selektivno in neselektivno gojišče;
- število kolonij v neselektivnem gojišču in število odpornih kolonij v selektivnem gojišču ter s tem povezani pogostnosti mutant;
- razmerje med koncentracijo in odzivom, kadar je mogoče;
- podatki o sočasnih negativnih (s topilom) in pozitivnih kontrolah (koncentracije in topila);

- podatki o negativnih (s topilom) in pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov, razponi, srednje vrednosti in standardni odkloni ter interval zaupanja (npr. 95 %), pa tudi število podatkov;
- statistične analize (za posamezne kulture in združene ponovljene vzorce, če je ustrezno) in p-vrednosti, če obstajajo.

*Razprava o rezultatih*

*Sklepna ugotovitev*

## VIRI

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, št. 234, OECD, Pariz.
- (2) Moore, M. M., DeMarini, D. M., DeSerres, F. J., in Tindall, K. R. (ur.). (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- (3) Chu, E. H. Y., in Malling, H. V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., ZDA, 61, 1306–1312.
- (4) Moore, M. M., Harrington-Brock, K., Doerr, C. L., in Dearfield, K. L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagen. Res., 4, 394–403.
- (5) Aaron, C. S., in Stankowski, L. F., Jr. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res., 223, 121–128.
- (6) Aaron, C. S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H. R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, L., Theiss, J., in Thompson, E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res., 312, 235–239.
- (7) Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H., in Wasson, J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program. Mutation Res., 196, 17–36.
- (8) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J., in Myhr, B. C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A Report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147–204.
- (9) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I., in Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268, 297–305.
- (10) Brusick, D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations, Environ. Mutagen., 8, 789–886.

- (11) Nessler, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I., in Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrotriacetic Acid. *Environ. Mol. Mutation Res.*, 49, 439–452.
- (12) Long, L. H., Kirkland, D., Whitwell, J., in Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, *Mutation Res.*, 634, 177–183.
- (13) Kirkland, D., Aardema, M., Henderson, L., in Müller, L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. *Mutation Res.*, 584 1–256.
- (14) Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., O'Neill, J. P., Riddle, J. C., Stankowski, L. F., Jr., in Yang, L. L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. *Mutation Res.*, 189, 135–141.
- (15) Liber, H. L., Yandell, D. W., in Little, J. B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. *Mutation Res.*, 216, 9–17.
- (16) Stankowski, L. F., Jr., Tindall, K. R., in Hsie, A. W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. *Mutation Res.*, 160, 133–147.
- (17) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B., in Asquith, J. C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. V: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D. J. (ur.). Cambridge University Press, str. 66–101.
- (18) Hsie, A. W., Casciano, D. A., Couch, D. B., Krahn, D. F., O'Neill, J. P., in Whitfield, B. L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 86, 193–214.
- (19) Li, A. P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, *Mutation Res.*, 85, 165–175.
- (20) Tindall, K. R., Stankowski, L. F., Jr., Machanoff, R., in Hsie, A. W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2gpt-Transformed Cells, *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1411–1415.

- (21) Hsie, A. W., Recio, L., Katz, D. S., Lee, C. Q., Wagner, M., in Schenley, R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. *Proc Natl Acad Sci.*, 83(24): 9616–9620.
- (22) Lorge, E., Moore, M., Clements, J., Donovan, M. O., Honma, M., Kohara, A., Van Benthem, J., Galloway, S., Armstrong, M. J., Thybaud, V., Gollapudi, B., Aardema, M., Kim, J., Sutter, A., in Kirkland, D. J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Rokopis v pripravi).
- (23) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, O. W., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G., in Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, 33, 261–287.
- (24) Rosen, M. P., San, R. H. C., in Stich, H. F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, *Can. Lett.* 8, 299–305.
- (25) Natarajan, A. T., Tate, A. D., Van Buul, P. P. W., Meijers, M., in de Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation Res.*, 37, 83–90.
- (26) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N., in Mazzaccaro, A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. *Mutation Res.*, 46, 365–373.
- (27) Ames, B. N., McCann, J., in Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, 347–364.
- (28) Maron, D. M., in Ames, B. N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, 173, 215.
- (29) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M., in Wolf, R. C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagen.* 7, 175–177.
- (30) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K., in Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. V: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. De Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R., in Philpot, R. M. (ur.). Elsevier, North-Holland, str. 85–88.

- (31) Ong, T.-m., Mukhtar, M., Wolf, C. R., in Zeiger, E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4, 55–65.
- (32) Johnson, T. E., Umbenhauer, D. R., in Galloway, S. M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 51–59.
- (33) UNEP. (2001). Stockholmska konvencija o obstojnih organskih onesnaževalih, Program Združenih narodov za okolje (UNEP). Na voljo na spletišču: [<http://www.pops.int.html>].
- (34) Tan, E.-L., in Hsie, A. W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina  $\gamma$  Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT System. *Mutation Res.*, 84, 147–156.
- (35) O'Neill, J. P., Machanoff, R., San Sebastian, J. R., in Hsie, A. W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Cammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. *Environ. Mol. Mutation.*, 4, 7–18.
- (36) Li, A. P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. *Environ. Mol. Mutation*, 4, 7–18.
- (37) Krahn, D. F., Barsky, F. C., in McCooey, K. T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. V: Tice, R. R., Costa, D. L., in Schaich, K. M. (ur.). *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, str. 91–103.
- (38) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P., in Brooks, A. L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environ. Mutagen.*, 5, 795–801.
- (39) OECD (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (smernice za preskušanje 473, 476 in 487). Na voljo na zahtevo pri Organizaciji za gospodarsko sodelovanje in razvoj.
- (40) Brookmire, L., Chen, J. J., in Levy, D. D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, *Environ. Mol. Mutation*, 54, 36–43.

- (41) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances,
- (42) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Na voljo na spletišču: [<https://federalregister.gov/a/2012-13774>].
- (43) O'Neill, J. P., in 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., in Au, W. W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. *Mutation, Res.*, 1335(2):121–8.
- (45) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J., in Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, *Mutation, Res.*, 723, 87–90.
- (46) OECD (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 199), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (47) Richardson, C., Williams, D. A., Allen, J. A., Amphlett, G., Chanter, D. O., in Phillips, B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. V: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D. J. (ur.). Cambridge University Press, Cambridge, str. 141–154.
- (48) Fleiss, J. L., Levin, B., in Paik, M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, 3. izdaja, New York: John Wiley & Sons.

## Dodatek 1

### OPREDELITVE POJMOV

Mutageni substitucije baznih parov: kemikalije, ki povzročijo zamenjavo baznih parov v DNK.

Kemikalija: snov ali zmes.

Učinkovitost tvorbe klonov: delež celic, nasajenih na ploščo pri nizki gostoti in sposobnih zrasti v kolonijo, ki jo je mogoče prešteti.

Koncentracije: se nanašajo na končne koncentracije preskusne kemikalije v gojišču.

Citotoksičnost: za poskuse, zajete v to preskusno metodo, je citotoksičnost opredeljena kot zmanjšanje relativnega preživetja tretiranih celic v primerjavi z negativnimi kontrolami (glej zadevni odstavek).

Napredna mutacija: genska mutacija starševskega tipa mutirane oblike, ki povzroči spremembo ali izgubo encimskega delovanja ali funkcije kodiranega proteina.

Mutageni premika bralnega okvira: kemikalije, ki povzročijo adicijo ali delecijo enega ali več baznih parov v molekuli DNK.

Genotoksično: splošni izraz, ki zajema vse poškodbe DNK ali kromosomov, vključno s prelomi DNK, prerazporeditvijo aduktov, mutacijami, aberacijami kromosomov in aneuploidijo. Vsi genotoksični učinki ne vplivajo na nastanek mutacij ali trajnih kromosomskih poškodb.

Gojišče HAT: gojišče, ki vsebuje hipoksantin, aminopterin in timidin ter se uporablja za čiščenje mutant Hprt.

Mitotična rekombinacija: med mitozo rekombinacija med homolognimi kromatidi, ki lahko povzroči indukcijo prelomov dvojne vijačnice DNK ali izgubo heterozigotnosti.

Gojišče MPA: gojišče, ki vsebuje ksantin, adenin, timidin, aminopterin in mikofenolno kislino ter se uporablja za čiščenje mutant Xprt.

Mutageno: povzroča dedno spremembo zaporedij baznih parov DNK v genih ali strukture kromosomov (kromosomske aberacije).

Pogostnost mutant: število opaženih mutiranih kolonij, deljeno s številom celic, nasajenih na ploščah v selektivnem gojišču, korigirano z učinkovitostjo tvorbe klonov (ali viabilnostjo) ob selekciji.

Čas izražanja fenotipa: čas po tretiranju, v katerem je gensko spreminjanje fiksirano znotraj genoma, vsi morebitni predhodno obstoječi genski produkti pa so odstranjeni, tako da se

spremeni fenotipska lastnost.

Relativno preživetje: relativno preživetje se uporablja kot merilo za citotoksičnost, povezano s tretiranjem. Pomeni učinkovitost tvorbe klonov celic, nasajenih na ploščo takoj po tretiranju, prilagojeno z morebitno izgubo celic med tretiranjem, v primerjavi z učinkovitostjo tvorbe klonov pri negativnih kontrolah (ki se jim pripiše 100-odstotno preživetje).

Frakcije S9, pripravljene iz jeter: supernatant iz homogenata jeter po centrifugiranju pri 9 000 g, tj. izvleček surovih jeter.

Mešanica S9: mešanica frakcije S9, pripravljene iz jeter, in kofaktorjev, potrebnih za dejavnosti presnovnih encimov.

Kontrola s topilom: splošni pojem za opredelitev kontrolnih kultur, ki prejmejo samo topilo, uporabljeno za raztopitev preskusne kemikalije.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

Netretirana kontrola: kulture, ki se ne tretirajo (tj. niti s preskusno kemikalijo niti s topilom), temveč se sočasno obdelujejo enako kot kulture, v katere se doda preskusna kemikalija.

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti in biološki materiali.

**Dodatek 2****FORMULE ZA OCENO CITOTOKSIČNOSTI IN POGOSTNOSTI MUTANT**

Citotoksičnost se oceni z relativnim preživetjem, tj. učinkovitostjo tvorbe klonov (CE) celic, nasajenih na ploščo takoj po tretiranju, prilagojeno z morebitno izgubo celic med tretiranjem, v primerjavi s prilagojeno učinkovitostjo tvorbe klonov pri negativnih kontrolah (ki se jim pripiše 100-odstotno preživetje) (glej formulo za relativno preživetje (RS) v nadaljevanju).

Prilagojena učinkovitost tvorbe klonov za kulturo, tretirano s preskusno kemikalijo, se izračuna kot:

$$\text{prilagojena CE} = \frac{\text{število celic na koncu tretiranja}}{\text{število celic na začetku tretiranja}}$$

Relativno preživetje za kulturo, tretirano s preskusno kemikalijo, se izračuna kot:

$$\text{RS} = \frac{\text{prilagojena CE za tretirano kulturo}}{\text{prilagojena CE za kontrolo s topilom}} \times 100$$

Pogostnost mutant je učinkovitost tvorbe klonov v mutiranih kolonijah v selektivnem gojišču, deljena z učinkovitostjo tvorbe klonov v neselektivnem gojišču, ob selekciji izmerjeno za isto kulturo.

$$\text{pogostnost mutant} = \frac{\text{učinkovitost tvorbe klonov v mutiranih kolonijah v selektivnem gojišču}}{\text{učinkovitost tvorbe klonov v neselektivnem gojišču}}$$

Kadar se za učinkovitost tvorbe klonov uporabljajo plošče:

učinkovitost tvorbe klonov = število kolonij/število celic, nasajenih na ploščo.

Kadar se za učinkovitost tvorbe klonov uporabljajo mikrotitrne plošče:

število kolonij na vsako jamico na mikrotitrskih ploščah sledi Poissonovi porazdelitvi.

Učinkovitost tvorbe klonov =  $-\text{LnP}(0)$ /število celic, nasajenih na ploščo, na jamico

Kjer je  $-\text{LnP}(0)$  verjetno število praznih jamic med nasajenimi celicami, opisano z naslednjo formulo

$\text{LnP}(0) = -\text{Ln}(\text{število praznih jamic}/\text{število nasajenih jamic})$

(3) Poglavje B.22 dela B se nadomesti z naslednjim:

## **„B.22 PRESKUS DOMINANTNE SMRTNOSTI NA GLODAVCIH**

### **UVOD**

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 478 (2016). Preskusne metode se redno preverjajo ob upoštevanju znanstvenega napredka, spreminjajočih se regulativnih zahtev in preudarkov v zvezi z dobrobitjo živali. Pri tej spremenjeni različici preskusne metode se upoštevajo več kot tridesetletne izkušnje s tem preskusom ter možnosti za združevanje ali kombiniranje tega preskusa z drugimi preskusi toksičnosti, kot sta razvojna in reprodukтивna toksičnost, ali študijami genotoksičnosti; vendar ta preskus zaradi svojih omejitev in uporabe velikega števila živali ni namenjen temu, da bi se uporabljal kot glavna metoda, temveč kot dopolnilna preskusna metoda, ki se lahko uporabi samo, kadar ni druge možnosti glede na regulativne zahteve. S kombiniranjem preskušanja toksičnosti bi bilo mogoče velikemu številu živali prizanesti z uporabo v preskusih toksičnosti. OECD je pripravila dokument z jedrnatimi informacijami o preskušanju v zvezi z genetsko toksikologijo in pregledom nedavnih sprememb smernic OECD za preskušanje v zvezi z genetsko toksikologijo (1).
2. Namen preskusa dominantne smrtnosti je raziskati, ali kemikalije povzročajo mutacije, ki so posledica kromosomskih aberacij v zarodnih celicah. Poleg tega je preskus dominantne smrtnosti primeren za ocenjevanje genotoksičnosti, saj so pri tem aktivni dejavniki metabolizma *in vivo*, farmakokinetike in popravljanja DNK, ki prispevajo k odzivu, čeprav se lahko med posameznimi vrstami razlikujejo. Indukcija dominantne smrtne mutacije po izpostavljenosti preskusni kemikaliji kaže, da kemikalija deluje na zarodno tkivo preskusne živali.
3. Dominantne smrtne mutacije povzročajo embrionalno ali fetalno smrt. Indukcija dominantne smrtne mutacije po izpostavljenosti preskusni kemikaliji kaže, da je kemikalija vplivala na zarodne celice preskusne živali.
4. Poskus dominantne smrtnosti je koristen za potrditev pozitivnih rezultatov preskusov s somatskimi končnimi točkami *in vivo* ter je ustrezna končna točka za napoved nevarnosti za ljudi in tveganje genskih bolezni, ki se prenašajo prek zarodne linije. Vendar je za ta preskus potrebnih veliko živali in je delovno intenziven; posledično je njegova izvedba zelo draga in zamudna. Ker je spontana pogostnost dominantnih smrtnih mutacij precej visoka, je občutljivost preskusa za zaznavo majhnih povečanj pogostnosti mutacij na splošno omejena.
5. Opredelitve ključnih pojmov so navedene v Dodatku 1.

## ZAČETNI PREUDARKI

6. Preskus se najpogosteje izvaja na miših (2) (3) (4), vendar so lahko v nekaterih primerih primerne tudi druge vrste, kot so podgane (5) (6) (7) (8), če je to znanstveno utemeljeno. Dominantne smrtnosti so običajno posledica velikih kromosomskih aberacij (strukturne in numerične anomalije) (9) (10) (11), vendar genskih mutacij ni mogoče izključiti. Dominantna smrtna mutacija je mutacija, ki nastane v sami zarodni celici ali se po oploditvi fiksira v zgodnjem zarodku in ne povzroči nepravilnega delovanja gamete, vendar je smrtonosna za oplojeno jajčece ali razvijajoči se zarodek.
7. Posamezni samci se v ustreznih časovnih presledkih zaporedno pari s samicami, ki se še niso parile. Število parjenj po tretiranju je odvisno od glavnega namena študije dominantne smrtnosti (odstavek 23) in mora zagotavljati, da se za dominantne smrtnosti ocenijo vse faze zorenja moške zarodne celice (12).
8. Če obstajajo dokazi, da preskusna kemikalija ali njeni metaboliti ne bodo dosegli moda, ta preskus ni primeren.

## NAČELO PRESKUSA

9. Na splošno se samci izpostavijo preskusni kemikaliji z ustreznim načinom izpostavljenosti in pari s netretiranimi samicami, ki se še niso parile. Z zaporednimi intervali parjenja se lahko preskušajo različne vrste zarodnih celic. Po parjenju se samice po ustreznem času evtanazirajo, njihove maternice pa se pregledajo, da se določi število ugnezditev ter živih in mrtvih zarodkov. Dominantna smrtnost preskusne kemikalije se določi s primerjavo živih ugnezditev na samico v tretirani skupini z živimi ugnezditvami na samico v kontrolni skupini z vehiklom/topilom. Porast števila mrtvih ugnezditev na samico v tretirani skupini nad število mrtvih ugnezditev na samico v kontrolni skupini kaže na izgubo po ugnezditvi, povzročeno s preskusno kemikalijo. Izguba po ugnezditvi se izračuna z določitvijo razmerja med mrtvimi ugnezditvami in skupnim številom ugnezditev v tretirani skupini v primerjavi z razmerjem med mrtvimi ugnezditvami in skupnim številom ugnezditev v kontrolni skupini. Izguba pred ugnezditvijo se lahko oceni s primerjavo števila rumenih telesc, od katerega se odšteje skupno število ugnezditev, ali skupnega števila ugnezditev na samico v tretirani in kontrolni skupini.

## PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI LABORATORIJA

10. Usposobljenost za ta poskus je treba dokazati tako, da se pokaže sposobnost za ponovitev pogostnosti dominantne smrtnosti iz objavljenih podatkov (npr. (13) (14) (15) (16) (17) (18)) s snovmi za pozitivno kontrolo (vključno z blagimi odzivi), kot so tiste iz preglednice 1, in kontrolami z vehiklom, pri čemer se dobijo pogostnosti iz negativnih kontrol, ki so v

skladu s sprejemljivim razponom podatkov (glej vire zgoraj) ali s porazdelitvijo kontrol iz preteklih preskusov laboratorija, če je na voljo.

## OPIS METODE

### Pripravki

#### *Izbira živalskih vrst*

11. Uporabiti je treba splošno uporabljane laboratorijske seve zdravih spolno zrelih živali. Običajno se uporabljajo miši, primerne pa so lahko tudi podgane. Uporabi se lahko katera koli druga ustrezna vrsta sesalcev, če je to v poročilu znanstveno utemeljeno.

#### *Pogoji nastanitve in hranjenja živali*

12. Pri glodavcih mora biti temperatura v prostoru s poskusnimi živalmi 22 °C ( $\pm 3$  °C). Čeprav mora biti relativna vlažnost vsaj 40-odstotna in po možnosti ne sme presegati 70 %, razen med čiščenjem prostora, si je treba prizadevati za 50–60-odstotno vlažnost. Osvetlitev mora biti umetna, pri čemer je zaporedje 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja običajna laboratorijska hrana z neomejeno količino pitne vode. Na izbiro hrane lahko vpliva potreba po zagotovitvi ustrezne mešanice preskusne kemikalije, kadar se daje na ta način. Pred tretiranjem ali parjenjem je treba glodavce nastaniti v majhnih skupinah (ne več kot pet na kletko), tako da so razporejeni glede na spol, če agresivno vedenje ni pričakovano ali opaženo, in tretirano skupino, in sicer po možnosti v kletke s trdimi tlemi z ustrezno okoljsko obogatitvijo. Živali so lahko nastanjene posamično le, če je to znanstveno utemeljeno.

#### *Priprava živali*

13. Zdravi in spolno zreli odrasli samci in samice se naključno dodelijo kontrolni in tretirani skupini. Posamezne živali se označijo z edinstvenimi oznakami s humano, čim manj invazivno metodo (npr. z namestitvijo obročkov ali trakov, z vsaditvijo mikročipa ali biometrično identifikacijo, ne pa z zarezovanjem ušesa in prsta) ter se vsaj pet dni prilagajajo laboratorijskim pogojem. Kletke je treba razporediti tako, da se čim bolj zmanjšajo morebitni učinki, ki nastanejo zaradi razporeditve kletk. Izogibati se je treba navzkrižni kontaminaciji s pozitivno kontrolo in preskusno kemikalijo. Ob začetku študije mora biti razlika med težami živali čim manjša in ne sme presegati  $\pm 20$  % srednje vrednosti teže za vsak spol.

#### *Priprava odmerkov*

14. Trdne preskusne kemikalije je treba raztopiti ali suspendirati v ustreznih topilih ali vehiklih ali primešati hrani ali pitni vodi, preden se odmerijo živalim. Tekoče preskusne kemikalije se lahko odmerijo neposredno ali pa se pred odmerjanjem razredčijo. Pri izpostavljenosti z vdihavanjem se lahko preskusne kemikalije glede na svoje fizikalno-kemijske lastnosti dajejo v obliki plina, pare ali trdnega/tekočega aerosola. Uporabiti je treba sveže

pripravljene preskusne kemikalije, razen če je iz podatkov o stabilnosti razvidno, da je shranjevanje sprejemljivo, in so v njih opredeljeni ustrezni pogoji shranjevanja.

## Preskusni pogoji

### Topilo/vehikel

15. Topilo/vehikel ne sme imeti toksičnih učinkov pri uporabljenih odmerkih in ne sme zbuhati suma, da lahko kemično reagira s preskusno kemikalijo. Če se uporabijo druga, manj znana topila/vehikli, je treba njihovo uporabo podpreti z referenčnimi podatki, ki dokazujejo njihovo združljivost. Priporočljivo je, da se, kadar koli je to mogoče, najprej razmisli o uporabi vodnega topila/vehikla. Primeri pogosto uporabljenih, združljivih topil/vehiklov so voda, fiziološka raztopina, raztopina metilceluloze, raztopina natrijeve soli karboksimetil celuloze, oljčno olje in koruzno olje.

### Pozitivne kontrole

16. Vedno je treba uporabiti živali za sočasne pozitivne kontrole, razen če je laboratorij dokazal usposobljenost za izvedbo preskusa in je v zadnjem času preskus redno uporabljal (npr. v zadnjih petih letih). Vendar živali za pozitivne kontrole ni treba tretirati enako kot živali, ki prejmejo preskusno kemikalijo, niti ni treba vzorčiti vseh intervalov parjenja. Za snovi za pozitivno kontrolo mora biti znano, da povzročajo dominantne smrtnosti v pogojih, uporabljenih pri preskusu. Z živalmi v kontrolnih skupinah je treba ravnati enako kot z živalmi v tretiranih skupinah, le da se ne tretirajo.
17. Odmerki snovi za pozitivno kontrolo morajo biti izbrani tako, da povzročajo blage ali zmerne učinke, ki kritično ocenijo uspešnost in občutljivost preskusa, vendar dosledno povzročajo pozitivne učinke dominantne smrtnosti. Primeri snovi za pozitivno kontrolo in ustrezni odmerki so navedeni v preglednici 1.

**Preglednica 1:** Primeri snovi za pozitivno kontrolo

SNOV [št. CAS] (referenčna št.)	Razpon efektivne doze (mg/kg) (vrsta glodavcev)	Čas dajanja (v dnevih)
Trietilenmelamin [51-18-3] (15)	0,25 (miši)	1
Ciklofosfamid [50-18-0] (19)	50–150 (miši)	5
Ciklofosfamid [50-18-0] (5)	25–100 (podgane)	1
Etil metansulfonat [62-50-0] (13)	100–300 (miši)	5
Monomerni akrilamid [79-06-1] (17)	50 (miši)	5
Klorambucil [305-03-3] (14)	25 (miši)	1

*Negativne kontrole*

18. Živali za negativno kontrolo, tretirane samo s topilom ali vehiklom, sicer pa tretirane enako kot tretirane skupine, je treba vključiti za vsak čas vzorčenja (20). Če ni kontrolnih podatkov iz preteklih preskusov ali objavljenih podatkov, iz katerih bi bilo razvidno, da izbrano topilo/vehikel ne povzroča dominantnih smrtnosti ali drugih škodljivih učinkov, je treba za vsak čas vzorčenja vključiti tudi netretirane kontrolne živali, da se dokaže sprejemljivost kontrol z vehiklom.

**POSTOPEK****Število živali**

19. Posamezni samci se pariyo v ustreznih vnaprej določenih intervalih (npr. tedenskih, odstavka 21 in 23), po možnosti z eno samico, ki se še ni parila. Število samcev na skupino je treba določiti vnaprej, da zadostuje (v povezavi s številom sparjenih samic pri vsakem intervalu parjenja) za zagotovitev statistične moči, potrebne za zaznavo vsaj podvojitve pogostnosti dominantne smrtnosti (odstavek 44).
20. Tudi število samic na interval parjenja je treba določiti vnaprej z izračuni statistične moči, da se omogoči zaznava vsaj podvojitve pogostnosti dominantne smrtnosti (tj. dovolj brejih samic, da se zagotovi vsaj 400 vseh ugnezditev) (20) (21) (22) (23) in da se pričakuje vsaj ena mrtva ugnezditev na enoto analize (tj. paritvena skupina na odmerki) (24).

**Obdobje dajanja in intervali parjenja**

21. Število intervalov parjenja po tretiranju je določeno s časovnim razporedom tretiranja in mora zagotavljati, da se v vseh fazah zorenja moške zarodne celice oceni indukcija dominantne smrtnosti (12) (25). Pri enkratnem tretiranju z dajanjem največ petih dnevni odmerkov je treba po zadnjem tretiranju v tedenskih intervalih izvesti osem (pri miših) ali deset (pri podganah) parjenj. Pri dajanju večkratnih odmerkov se lahko število intervalov parjenja zmanjša sorazmerno s podaljšanjem obdobja dajanja, pri čemer je treba ohraniti cilj, da se ocenijo vse faze spermatogeneze (npr. po 28-dnevni izpostavljenosti zadostujejo samo štiri tedenska parjenja, da se ocenijo vse faze spermatogeneze pri miših). Vsi časovni razporedi tretiranja in parjenj morajo biti znanstveno utemeljeni.
22. Samice morajo ostati pri samcih vsaj v času enega pojavnega ciklusa (npr. en teden zajema en pojavni cikel pri miših in podganah). Samice, ki se med enotedenskim intervalom niso parile, se lahko uporabijo za naslednji interval parjenja. Ali dokler se ne zgodi parjenje, kar se ugotovi ob prisotnosti semenčic v vagini ali ob prisotnosti vaginalnega zamaška.

23. Uporabljeni režim izpostavljenosti in parjenja je odvisen od glavnega namena študije dominantne smrtnosti. Če je cilj ugotoviti, ali zadevna kemikalija povzroča dominantne smrtne mutacije same po sebi, bi bila sprejemljiva metoda z izpostavitvijo celotnega kroga spermatogeneze (npr. sedem tednov pri miših, 5–7 tretiranj na teden) in parjenjem enkrat ob koncu zadevnega kroga. Če pa je cilj opredeliti vrsto zarodnih celic, občutljivo za indukcijo dominantne smrtnosti, potem je priporočljiva enkratna ali petdnevna izpostavljenost, ki ji sledi tedensko parjenje.

### **Velikost odmerkov**

24. Če se izvede predhodna študija za določanje območja, ker ustrezni podatki, ki bi bili v pomoč pri izbiri odmerkov, niso na voljo, jo je treba izvesti v istem laboratoriju ter pri tem uporabiti iste vrste, sev, spol in režim tretiranja kot v glavni študiji (26). S študijo je treba določiti največji tolerančni odmerek (MTD), ki je opredeljen kot največji odmerek, ki ga je mogoče prenesti, ne da bi se pri tem pokazala toksičnost, ki bi v povezavi z obdobjem trajanja študije slednjo omejevala (na primer nenormalno vedenje ali odzivi, manjša upočasnitev pridobivanja telesne teže ali citotoksičnost za hematopoetski sistem), ne pa smrt ali znaki bolečine ali trpljenja, zaradi katerih je potrebna humana evtanazija (27).
25. Največji tolerančni odmerek tudi ne sme negativno vplivati na uspešnost parjenja (21).
26. Preskusne kemikalije s specifičnim biološkim delovanjem pri majhnih, netoksičnih odmerkih (kakor so hormoni in mitogeni) in kemikalije, ki kažejo nasičenost toksokinetičnih lastnosti, so lahko izjeme pri merilih za določanje odmerkov in jih je treba oceniti za vsak primer posebej.
27. Da se pridobijo informacije o odzivu na odmerek, je treba v popolno študijo vključiti skupino negativne kontrole in vsaj tri velikosti odmerkov, ki so običajno ločeni s faktorjem 2, vendar ne več kot 4. Če preskusna kemikalija v študiji za določanje območja ali na podlagi obstoječih podatkov ne povzroča toksičnosti, mora biti najvišji odmerek pri enkratnem dajanju enak 2 000 mg/kg telesne teže. Če pa preskusna kemikalija povzroča toksičnost, mora biti največji tolerančni odmerek najvišji dani odmerek, v uporabljene velikosti odmerkov pa je treba po možnosti zajeti razpon od največjega odmerka do odmerka, ki povzroča malo ali nič toksičnosti. Pri kemikalijah, ki niso toksične, je mejni odmerek za obdobje dajanja, ki traja vsaj 14 dni, 1 000 mg/kg telesne teže na dan, za obdobja dajanja, krajša od 14 dni, pa je mejni odmerek 2 000 mg/kg telesne teže na dan.

### **Dajanje odmerkov**

28. Pri načrtovanju preskusa je treba upoštevati predvideni način izpostavljenosti pri ljudeh. Zato se lahko ob ustrezni utemeljitvi izberejo načini izpostavljenosti, kot so s prehrano, pitno vodo, podkožno, intravenozno, topično, z vdihavanjem, oralno (z gavažo) ali z vsadkom. V vsakem primeru je treba način izpostavljenosti izbrati tako, da se zagotovi ustrezna izpostavljenost ciljnih tkiv. Dajanje z intraperitonealno injekcijo običajno ni

priporočljivo, saj to ni predvideni način izpostavljenosti pri ljudeh, in se lahko uporabi samo na podlagi posebne znanstvene utemeljitve. Če je preskusna kemikalija primešana hrani ali pitni vodi, zlasti v primeru enega samega odmerka, je treba paziti, da med zaužitjem hrane in vode ter parjenjem preteče dovolj časa, da se lahko odkrijejo učinki (odstavek 31). Največja količina tekočine, ki se lahko da naenkrat z gavažo ali injekcijo, je odvisna od velikosti preskusne živali. Količina običajno ne sme presegati 1 ml na 100 g telesne teže, razen pri vodnih raztopinah, pri katerih se lahko uporabi največ 2 ml na 100 g telesne teže. Uporabo večjih količin (če to dovoljuje zakonodaja o dobrobiti živali) je treba utemeljiti. Variabilnost preskusne količine je treba s prilagajanjem koncentracije obdržati na čim najnižji ravni, da se zagotovi konstantna količina glede na telesno težo pri vseh velikostih odmerka.

### **Opažanja**

29. Vsaj enkrat na dan je treba opraviti splošna klinična opazovanja preskusnih živali in evidentirati klinične znake, po možnosti vsak dan ob istem času in ob upoštevanju obdobja največje intenzivnosti pričakovanih učinkov po vnosu odmerka. Vse živali je treba med obdobjem odmerjanja vsaj dvakrat na dan opazovati za odkrivanje obolevnosti in smrtnosti. Vse živali je treba stehati ob začetku študije, vsaj enkrat na teden med študijami s ponavljajočimi se odmerki in ob evtanaziji. Porabo hrane je treba meriti vsaj tedensko. Če se preskusna kemikalija daje s pitno vodo, je treba izmeriti porabo vode ob vsaki menjavi vode in vsaj tedensko. Živali, ki kažejo nesmrtonosne znake čezmerne toksičnosti, je treba evtanazirati pred koncem preskusnega obdobja (27).

### **Odvzem in obdelava tkiv**

30. Samice se evtanazirajo v drugi polovici brejosti, in sicer miši na 13. dan brejosti (DB), podgane pa na 14.–15. dan brejosti. Maternice se pregledajo za dominantne smrtne učinke, da se določi število ugnездitev, živih in mrtvih zarodkov ter rumenih telesc.
31. Rogova maternice in jajčnika se razkrijejo, da se preštejejo rumena telesca, zarodki pa se odstranijo, preštejejo in stehajo. Paziti je treba, da se v maternicah preverijo resorpcije, ki jih zakrivajo živi zarodki, in da se zagotovi, da so preštete vse resorpcije. Evidentira se fetalna smrtnost. Evidentirata se tudi število uspešno oplojenih samic ter število vseh ugnездitev, izgub pred ugnездitvijo in smrtnost po ugnездitvi (vključene zgodnje in pozne resorpcije). Poleg tega se lahko vidni zarodki v Bouinovem fiksativu ohranijo še vsaj dva tedna po pregledu večjih zunanjih nepravilnosti (28), da se zagotovijo dodatne informacije o reproduktivnih in razvojnih učinkih preskusne snovi.

## **PODATKI IN POROČANJE**

### **Obdelava rezultatov**

32. Podatke je treba povzeti v obliki preglednice, da se prikažejo število sparjenih samcev, število brejih samic in število nebreh samic. Posebej je treba navesti rezultate vsakega parjenja, vključno z identiteto vsakega samca in samice. Za vsakega tretiranega samca je treba navesti interval parjenja in velikost odmerka, za vsako samico pa število živih in mrtvih ugnezditev.
33. Izguba po ugnezditvi se izračuna z določitvijo razmerja med mrtvimi ugnezditvami in skupnim številom ugnezditev iz tretirane skupine v primerjavi z razmerjem med mrtvimi ugnezditvami in skupnim številom ugnezditev iz kontrolne skupine z vehiklom/topilom.
34. Izguba pred ugnezditvijo se izračuna kot razlika med številom rumenih telesc in številom ugnezditev ali kot zmanjšanje povprečnega števila ugnezditev na samico v primerjavi s parjenji v kontrolah. Če je izguba pred ugnezditvijo ocenjena, je treba navesti tudi to.
35. Faktor dominantne smrtnosti se oceni kot: (pogini po ugnezditvi/skupno število ugnezditev na samico) x 100.
36. Navesti je treba podatke o toksičnosti in kliničnih znakih (v skladu z odstavkom 29).

### **Merila za sprejemljivost**

37. Sprejemljivost preskusa je določena z naslednjimi merili.
- Sočasna negativna kontrola je skladna z objavljenimi standardi za podatke o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov in podatki laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov, če so na voljo (glej odstavka 10 in 18).
  - Sočasne pozitivne kontrole povzročajo odzive, ki so skladni z objavljenimi standardi za podatke o pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov ali podatkovno zbirko laboratorija o pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov, če je na voljo, in statistično značilno povečanje v primerjavi z negativno kontrolo (glej odstavka 17 in 18).
  - Analizirano je bilo ustrezno število vseh ugnezditev in odmerkov (odstavek 20).
  - Merila za izbor največjega odmerka so skladna z merili, opisanimi v odstavkih 24 in 27.

### **Vrednotenje in razlaga rezultatov**

38. Da bi dobili dovolj podatkov za analizo odziva na odmerek, je treba analizirati vsaj tri tretirane skupine, ki prejemajo odmerke.
39. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno pozitivno, če:
- se vsaj pri enem od preskusnih odmerkov pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;

- je pri vsaj enem poskusnem pogoju (npr. tedenskem intervalu parjenja) povečanje povezano z odmerkom, kadar se ocenjuje z ustreznim testom, in
- če se pojavijo rezultati zunaj sprejemljivega razpona podatkov o negativnih kontrolah ali porazdelitve podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi), če so na voljo.

Za preskusno kemikalijo se nato šteje, da lahko povzroči dominantne smrtne mutacije v zarodnih celicah preskusnih živali. Priporočila glede najustrežnejših statističnih metod so opisana v odstavku 44; drugi priporočeni statistični pristopi so navedeni tudi v virih (20) (21) (22) (24) (29). V uporabljenih statističnih preskusih se mora kot poskusna enota preučiti žival.

40. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno negativno, če:

- se pri nobenem od preskusnih odmerkov ne pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;
- pri nobenem poskusnem pogoju ni z odmerkom povezanega povečanja ter
- če so vsi rezultati znotraj sprejemljivega razpona podatkov o negativnih kontrolah ali podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi), če so na voljo.

Za preskusno kemikalijo se nato šteje, da ne more povzročiti dominantnih smrtnih mutacij v zarodnih celicah preskusnih živali.

41. Preverjanje jasno pozitivnega in jasno negativnega odziva ni potrebno.

42. Če odziv ni jasno negativen ali pozitiven in za pomoč pri opredelitvi biološke pomembnosti rezultatov (npr. šibko ali mejno povečanje) je treba podatke oceniti s strokovno presojo in/ali nadaljnjimi preiskavami z uporabo obstoječih podatkov o poskusih, kot je upoštevanje, ali je pozitiven rezultat zunaj sprejemljivega razpona podatkov o negativnih kontrolah ali podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (30).

43. Zbirka podatkov v redkih primerih celo po izvedbi nadaljnjih preiskav onemogoča sprejetje sklepa o pozitivnih ali negativnih rezultatih, zato se zaključi, da je dvoumna.

44. V uporabljenih statističnih preskusih se mora kot poskusna enota preučiti samec. Čeprav je mogoče, da so podatki o številu (npr. število ugnezditev na samico) porazdeljeni po Poissonu in/ali da so deleži (npr. delež mrtvih ugnezditev) binomsko porazdeljeni, so taki podatki pogosto nadrazpršeni (31). Tako je treba pri statistični analizi najprej uporabiti preskus prevelike in premajhne razpršenosti z uporabo testov variance, kot je Cochranov test binomske variance (32) ali Taronejev  $C(\alpha)$ -test za binomsko nadrazpršenost (31) (33).

Če se ne zazna odstopanje od binomske razpršenosti, se lahko trendi deležev med velikostmi odmerkov preverijo z uporabo Cochran-Armitageevega trendnostnega testa (34), parne primerjave s kontrolno skupino pa se lahko preverijo z uporabo Fisherjevega eksaktnega testa (35). Če se ne zazna odstopanje od Poissonove razpršenosti, se lahko trendi pri štetju preverijo tudi z uporabo Poissonove regresije (36), parne primerjave s kontrolno skupino pa se lahko preverijo v okviru Poissonovega modela z uporabo parnih nasprotij (36). Če se zazna znatna nadrazpršenost ali podrazpršenost, se priporočajo neparametrične metode (23) (31). Mednje spadajo testi, ki temeljijo na rangih, kot so test po Jonckheere-Terpstraju za trend (37) in Mann-Whitneyjev testi (38) za parne primerjave s kontrolno skupino z vehiklom/topilom ter testi s permutacijami, ponovnim vzorčenjem ali samovzorčenjem za primerjave trendov in parne primerjave s kontrolno skupino (31) (39).

45. Pozitivni preskus dominantne smrtnosti zagotavlja dokaze o genotoksičnosti preskusne kemikalije v zarodnih celicah tretiranega samca preskusne vrste.
46. Upoštevanje tega, ali so dobljene vrednosti v razponu preteklih kontrol ali zunaj njega, lahko zagotovi smernice pri ocenjevanju biološke pomembnosti odziva (40).

### **Poročilo o preskusu**

47. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

#### *Povzetek.*

##### *Preskusna kemikalija:*

- vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;
- stabilnost preskusne kemikalije, če je znana;
- topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu, če sta znani;
- meritve vrednosti pH, osmolarnosti in oborine v gojišču, ki mu je bila dodana preskusna kemikalija, če je ustrezno.

#### snov iz ene sestavine:

- fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;
- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

#### Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

- čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

*Priprava preskusne kemikalije:*

- utemeljitev izbire vehikla;
- topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu/vehiklu, če je znana;
- priprava pripravkov hrane in pitne vode ali pripravkov za vdihavanje;
- analitsko določanje sestave (npr. stabilnost, homogenost, nominalne koncentracije), če je na voljo.

*Preskusne živali:*

- uporabljena vrsta/sev in utemeljitev izbire;
- število, starost in spol živali;
- izvor, nastanitvene razmere, prehrana itd.;
- metoda edinstvene identifikacije živali;
- pri kratkotrajnih študijah: telesna teža posameznih samcev ob začetku in koncu preskusa; pri študijah, ki trajajo več kot en teden: teža posameznih živali med študijo in poraba hrane. Vključiti je treba razpon, srednjo vrednost in standardni odklon telesne teže za vsako skupino.

*Preskusni pogoji:*

- podatki o pozitivnih in negativnih kontrolah (z vehiklom/topilom);
- podatki iz študije za določanje območja;
- utemeljitev izbire velikosti odmerkov;
- podrobnosti o pripravi preskusne kemikalije;
- podrobnosti o dajanju preskusne kemikalije;
- utemeljitev načina dajanja;
- metode za merjenje toksičnosti za živali, vključno s histopatološko ali hematološko analizo, če sta bili uporabljeni, ter pogostnost opazovanja živali in tehtanja;
- metode za preverjanje, ali je preskusna kemikalija dosegla ciljno tkivo ali krvni obtok, v primeru negativnih rezultatov;
- dejanski odmerek (v mg/kg telesne teže/dan), izračunan glede na koncentracijo preskusne kemikalije (v ppm) v hrani/pitni vodi in porabo hrane/pitne vode, če je ustrezno;
- podrobnosti o kakovosti hrane in vode;
- podrobnosti o obogatitvi okolja v kletki;
- podroben opis časovnega razporeda tretiranja in vzorčenja ter utemeljitev izbir;

- metoda za analgezijo;
- metoda za evtanazijo;
- postopki za izolacijo in hrambo tkiv;
- izvor in številka serij za vse komplete in reagente (kjer je primerno);
- metode za štetje dominantnih smrtnosti;
- časovni raspored parjenja;
- uporabljene metode za določitev, ali je prišlo do parjenja;
- čas evtanazije;
- merila za štetje učinkov dominantne smrtnosti, vključno z rumenimi telesci, ugnezditvami, resorpcijami in izgubami pred ugnezditvijo, živimi ugnezditvami in mrtvimi ugnezditvami.

*Rezultati:*

- stanje živali pred preskusnim obdobjem in med njim, vključno z znaki toksičnosti;
- telesna teža samcev v obdobjih tretiranja in parjenja;
- število sparjenih samic;
- razmerje med odmerkom in odzivom, če je mogoče;
- podatki o sočasnih in preteklih negativnih kontrolah z območji, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni;
- podatki o sočasni pozitivni kontroli;
- tabelaričen prikaz podatkov ali za vsako samico, vključno s: številom rumenih telesc na samico; številom ugnezditv na samico; številom resorpcij in izgub pred ugnezditvijo na samico; številom živih ugnezditv na samico; številom mrtvih ugnezditv na samico; teža zarodkov;
- povzetek zgoraj navedenih podatkov za vsako obdobje parjenja in odmerka, s pogostnostmi dominantnih smrtnosti;
- uporabljene statistične analize in metode.

*Razprava o rezultatih*

*Sklepna ugotovitev*

## VIRI

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, št. 234, OECD, Pariz.
- (2) Bateman, A. J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures. Kilbey, B. J., *et. al.* (ur.) str. 235–334, Elsevier, Amsterdam.
- (3) Ehling, U. H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., in Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Set up by the Work Group “Dominant lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, Arch. Toxicol., 39, 173–185.
- (4) Shelby, M. D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. Mutation Res., 352:159–167.
- (5) Knudsen, I., Hansen, E. V., Meyer, O. A., in Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. Mutation Res., 48:267–270.
- (6) Anderson, D., Hughes, J. A., Edwards, A. J., in Brinkworth, M. H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. Mutation Res., 397:77–74.
- (7) Shively, C. A., White, D. M., Blauch, J. L., in Tarka, S. M., Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. Toxicol. Lett. 20:325-329.
- (8) Rao, K. S., Cobel-Geard, S. R., Young, J. T., Hanley, T. R., Jr., Hayes, W. C., John, J. A., in Miller, R. R. (1983). Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. Fundam. Appl. Toxicol., 3:80–85.
- (9) Brewen, J. G., Payne, H. S., Jones, K. P., in Preston, R. J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, Mutation Res., 33, 239–249.
- (10) Marchetti, F., Bishop, J. B., Cosentino, L., Moore, II, D., in Wyrobek, A. J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. Biol. Reprod., 70:616–624.

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

- (23) Haseman, J. K., in Soares, E. R. (1976). The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. *Mutation. Res.*, 41: 277–288.
- (24) Whorton, E. B., Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, 1:353–360.
- (25) Anderson, D., Hodge, M. C. E., Palmer, S., in Purchase, I. F. H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. *Mutation. Res.*, 85:417–429.
- (26) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J., in Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagen.*, 7:313–319.
- (27) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 19), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (28) Barrow, M. V., Taylor, W. J., in Morphol, J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291–306.
- (29) Kirkland, D. J. (ur.).(1989). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Cambridge University Press.
- (30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J., in Thybaud, V. (2011). 'Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data', *Mutation. Res.*, 723:87–90.
- (31) Lockhart, A. C., Piegorsch, W. W., in Bishop, J. B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. *Mutation. Res.*, 272:35–58.
- (32) Cochran, W. G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common  $\chi^2$  Tests. *Biometrics*, 10: 417–451.
- (33) Tarone, R. E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: 585–590.
- (34) Margolin, B. H. (1988). Test for Trend in Proportions. V: *Encyclopedia of Statistical Sciences*, zvezek 9, Kotz, S., in Johnson, N. L. (ur.), str. 334–336. John Wiley and Sons, New York.

- (35) Cox, D. R. *Analysis of Binary Data*. Chapman and Hall, London (1970).
- (36) Neter, J. M., Kutner, H. C., Nachtsheim, J., in Wasserman, W. (1996). *Applied Linear Statistical Models*, četrta izdaja, poglavji 14 in 17. McGraw-Hill, Boston.
- (37) Jonckheere, R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika*, 41:133–145.
- (38) Conover, W. J. (1971). *Practical Nonparametric Statistics*. John Wiley and Sons, New York.
- (39) Efron, B. (1982). *The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans*. Society for Industrial and Applied Mathematics, Filadelfija, PA.
- (40) Fleiss, J. (1973). *Statistical Methods for Rates and Proportions*. John Wiley and Sons, New York.

## Dodatek 1

### OPREDELITVE POJMOV

Kemikalija: snov ali zmes.

Rumeno telesce: struktura, ki izloča hormone, nastala na jajčniku na mestu folikla, iz katerega se je sprostilo jajčece. Število rumenih telesc v jajčnikih ustreza številu ovuliranih jajčec.

Dominantna smrtna mutacija: mutacija, ki nastane v zarodni celici ali se fiksira po oploditvi in povzroči smrt zarodka ali plodu.

Stopnja rodnosti: število sparjenih brejih samic glede na število sparjenih samic.

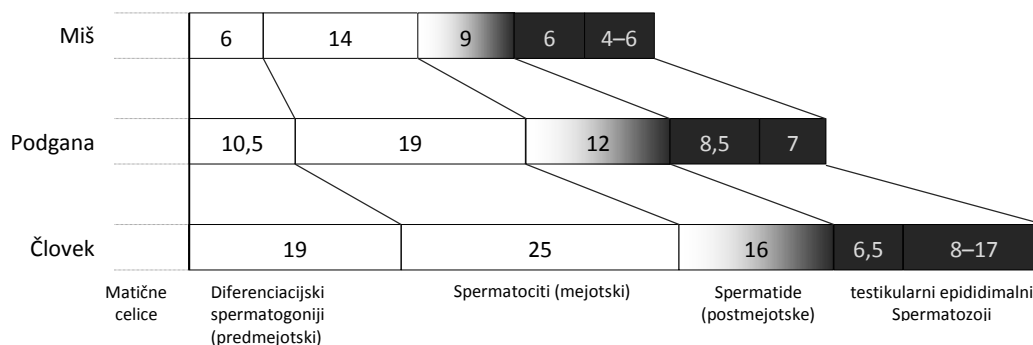
Interval parjenja: čas med koncem izpostavljenosti in parjenjem tretiranih samcev. Z uravnavanjem tega intervala se lahko ocenijo učinki kemikalij na različne vrste zarodnih celic. Pri miših, ki se parijo v 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. in 8. tednu po koncu izpostavljenosti, se merijo učinki na semenčice, kondenzirane spermatide, okrogle spermatide, pahitenske spermatocite, zgodnje spermatocite, diferencirane spermatogonije, diferenciacijske spermatogonije in spermatogonije iz matičnih celic.

Izguba pred ugnezditvijo: razlika med številom ugnezditv in številom rumenih telesc. Lahko se tudi oceni s primerjavo med skupnim številom ugnezditv na samico v tretirani in kontrolni skupini.

Izguba po ugnezditvi: razmerje med mrtvimi ugnezditvami v tretirani skupini v primerjavi z razmerjem med mrtvimi ugnezditvami in skupnim številom ugnezditv v kontrolni skupini.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti in biološki materiali.

**Dodatek 2****ČAS SPERMATOGENEZE PRI SESALCIH**

**Slika 1:** Primerjava med trajanjem (v dnevih) razvoja moške zarodne celice pri miših, podganah in ljudeh. Popravljanje DNK se ne pojavi v osenčenih obdobjih.

Shematski prikaz spermatogeneze pri miših, podganah in ljudeh je naveden zgoraj (povzeto po Adlerju, 1996). Med nediferencirane spermatogonije spadajo: A-enojni; A-parni; in A-poravnani spermatogoniji (Hess in de Franca, 2008). A-enojni se štejejo za dejanske matične celice; zato mora za oceno učinkov na matične celice preteči vsaj 49 dni (pri miši) med zadnjim injiciranjem preskusne kemikalije in parjenjem.

**Viri**

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

Hess, R. A., in De Franca, L. R. (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. V: *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, C. Yan Cheng (ur.), Landes Biosciences and Springer Science&Business Media:1-15.“

(4) Poglavje B.23 dela B se nadomesti z naslednjim:

## **„B.23 PRESKUS KROMOSOMSKIH ABERACIJ V SPERMATOGONIJIH SESALCEV**

### **UVOD**

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje 483 (2016). Preskusne metode se redno preverjajo ob upoštevanju znanstvenega napredka, spreminjajočih se regulativnih zahtev in preudarkov v zvezi z dobrobitjo živali. Pri tej spremenjeni različici preskusne metode se upoštevajo večletne izkušnje s tem preskusom ter možnosti za združevanje ali kombiniranje tega preskusa z drugimi študijami toksičnosti ali genotoksičnosti. S kombiniranjem študij toksičnosti bi se lahko zmanjšalo število živali, uporabljenih pri preskušanju toksičnosti. Ta preskusna metoda je del sklopa preskusnih metod v zvezi z genetsko toksikologijo. OECD je pripravila dokument z jedrnatimi informacijami o preskušanju v zvezi z genetsko toksikologijo in pregledom nedavnih sprememb smernic OECD za preskušanje v zvezi z genetsko toksikologijo (1).
2. Namen *in vivo* preskusa kromosomskih aberacij v spermatogonijih sesalcev je opredeliti kemikalije, ki povzročijo strukturne kromosomske aberacije v spermatogonijskih celicah sesalcev (2) (3) (4). Poleg tega je ta preskus primeren za ocenjevanje genotoksičnosti, saj so pri tem aktivni dejavniki metabolizma *in vivo*, farmakokinetike in procesi popravljanja DNK, ki prispevajo k odzivu, čeprav se lahko med posameznimi vrstami razlikujejo. Ta preskusna metoda ni zasnovana za merjenje numeričnih anomalij; preskus se običajno ne uporablja za ta namen.
3. S tem preskusom se merijo strukturne kromosomske aberacije (kromosomskega in kromatidnega tipa) pri delitvi spermatogonskih zarodnih celic, zato se pričakuje, da se s preskusom napove povzročitev dednih mutacij v teh zarodnih celicah.
4. Opredelitve ključnih pojmov so navedene v Dodatku.

### **ZAČETNI PREUDARKI**

5. V tem preskusu se običajno uporabljajo glodavci, vendar so lahko v nekaterih primerih primerne tudi druge vrste, če je to znanstveno upravičeno. Standardni citogenetski pripravki mod glodavcev povzročajo mitotično (spermatogoniji) in mejotično (spermatociti) metafazo. Mitotična in mejotična metafaza se opredelita na podlagi morfologije kromosomov (4). S tem citogenetskim preskusom *in vivo* se zaznajo strukturne kromosomske aberacije pri mitotični spermatogoniji. Druge tarčne celice niso predmet te preskusne metode.
6. Da se zaznajo aberacije kromatidnega tipa v spermatogonijih, je treba pregledati prvo mitotično delitev celic po tretiranju, preden se te aberacije v naslednjih celičnih delitvah pretvorijo v aberacije kromosomskega tipa. Dodatne informacije o tretiranih spermatocitih se lahko

pridobijo z analizo kromosomskih strukturnih aberacij pri mejotskih kromosomih v diakinezi-metafazi I in metafazi II.

7. V modu so številne generacije spermatogonijev (5), te različne vrste zarodnih celic pa so lahko različno občutljive za tretiranje s kemikalijami. Zaznane aberacije tako pomenijo skupni odziv tretiranih populacij spermatogonijev. Večina mitotičnih celic v pripravkih mod so spermatogoniji B, katerih celični cikel traja približno 26 ur (3).
8. Če obstajajo dokazi, da preskusna kemikalija ali njeni metaboliti ne bodo dosegli moda, ta preskus ni primeren.

## NAČELO PRESKUSNE METODE

9. Običajno se živali preskusni kemikaliji izpostavijo z ustreznim načinom izpostavljenosti, ob primernem času po tretiranju pa se evtanazirajo. Pred evtanazijo se živali tretirajo z zaviralcem metafaze (npr. kolhicinom ali Colcemidom®). Nato se pripravijo in obarvajo preparati kromosomov iz zarodnih celic ter analizirajo kromosomske aberacije v celicah v metafazi.

## PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI LABORATORIJA

10. Usposobljenost za ta preskus je treba dokazati tako, da se pokaže sposobnost za ponovitev pričakovanih rezultatov v zvezi s pogostnostjo strukturnih kromosomskih aberacij v spermatogonijih s snovmi za pozitivno kontrolo (vključno z blagimi odzivi), kot so tiste iz preglednice 1, ter dobijo pogostnosti iz negativnih kontrol, ki so v skladu s sprejemljivim razponom podatkov o kontrolah v objavljenih virih (npr. (2) (3) (6) (7) (8) (9) (10)) ali s porazdelitvijo kontrol iz preteklih preskusov laboratorija, če je na voljo.

## OPIS METODE

### Pripravki

#### *Izbira živalskih vrst*

11. Uporabiti je treba splošno uporabljane laboratorijske seve zdravih mladih odraslih živali. Običajno se uporabljajo samci miši; lahko pa se uporabijo tudi samci drugih ustreznih vrst sesalcev, kadar je to znanstveno utemeljeno in da se lahko ta preskus izvede v povezavi z drugo preskusno metodo. Uporabo drugih vrst, ki niso glodavci, je treba znanstveno utemeljiti v poročilu.

#### *Pogoji nastanitve in hranjenja živali*

12. Pri glodavcih mora biti temperatura v prostoru z živalmi 22 °C ( $\pm 3$  °C). Čeprav mora biti relativna vlažnost vsaj 40-odstotna in po možnosti ne sme presegati 70 %, razen med čiščenjem prostora, si je treba prizadevati za 50–60-odstotno vlažnost. Osvetlitev mora biti umetna, pri čemer je zaporedje 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja običajna

laboratorijska hrana z neomejeno količino pitne vode. Na izbiro hrane lahko vpliva potreba po zagotovitvi ustrezne mešanice preskusne kemikalije, kadar se daje na ta način. Glodavce je treba nastaniti v majhnih skupinah (ne več kot pet na kletko), če ni pričakovati agresivnega vedenja, in sicer po možnosti v kletke s trdimi tlemi z ustrezno okoljsko obogatitvijo. Živali so lahko nastanjene posamično le, če je to znanstveno utemeljeno.

#### *Priprava živali*

13. Običajno se uporabljajo zdravi mladi samci (ob začetku tretiranja stari od 8 do 12 tednov), ki se naključno razporedijo v kontrolno in tretirano skupino. Posamezne živali se označijo z edinstvenimi oznakami s humano, čim manj invazivno metodo (npr. z namestitvijo obročkov ali trakov, z vsaditvijo mikročipa ali biometrično identifikacijo, ne pa z zarezovanjem ušesa ali prsta) ter se vsaj pet dni prilagajajo laboratorijskim pogojem. Kletke je treba razporediti tako, da se čim bolj zmanjšajo morebitni učinki, ki nastanejo zaradi razporeditve kletk. Izogibati se je treba navzkrižni kontaminaciji med pozitivno kontrolo in preskusno kemikalijo. Ob začetku študije mora biti razlika med težami posameznih živali čim manjša in ne sme presegati  $\pm 20\%$ .

#### *Priprava odmerkov*

14. Trdne preskusne kemikalije je treba raztopiti ali suspendirati v ustreznih topilih ali vehiklih ali primešati hrani ali pitni vodi, preden se odmerijo živalim. Tekoče preskusne kemikalije se lahko odmerijo neposredno ali pa se pred odmerjanjem razredčijo. Pri izpostavljenosti z vdihavanjem se lahko preskusne kemikalije glede na svoje fizikalno-kemijske lastnosti dajejo v obliki plina, pare ali trdnega/tekočega aerosola. Uporabiti je treba sveže pripravljene preskusne kemikalije, razen če je iz podatkov o stabilnosti razvidno, da je shranjevanje sprejemljivo, in so v njih opredeljeni ustrezni pogoji shranjevanja.

#### **Pogoji preskusa – topilo/vehikel**

15. Topilo/vehikel ne sme imeti toksičnih učinkov pri uporabljenih odmerkih in ne sme biti sposoben kemično reagirati s preskusnimi kemikalijami. Če se uporabijo druga, manj znana topila/vehikli, je treba njihovo uporabo podpreti z referenčnimi podatki, ki dokazujejo njihovo združljivost. Priporočljivo je, da se, kadar koli je to mogoče, najprej razmisli o uporabi vodnega topila/vehikla. Primeri pogosto uporabljenih, združljivih topil/vehiklov so voda, fiziološka raztopina, raztopina metilceluloze, raztopina natrijeve soli karboksimetil celuloze, oljčno olje in koruzno olje. Če ni podatkov iz preteklih preskusov ali objavljenih podatkov, iz katerih bi bilo razvidno, da izbrano neobičajno topilo/vehikel ne povzroča strukturnih kromosomskih aberacij ali drugih škodljivih učinkov, je treba izvesti začetno študijo, da se dokaže sprejemljivost kontrol s topilom/vehiklom.

#### *Pozitivne kontrole*

16. Vedno je treba uporabiti živali za sočasne pozitivne kontrole, razen če je laboratorij dokazal usposobljenost za izvedbo preskusa in je v zadnjem času preskus redno uporabljal (npr. v zadnjih petih letih). Če sočasna pozitivna kontrolna skupina ni vključena, je treba v vsak poskus vključiti kontrole za štetje (fiksirani in nebarvani mikroskopski preparati). Ti se lahko pridobijo

tako, da se pri študiji v štetje vključijo ustrezni referenčni vzorci, pridobljeni in shranjeni v okviru ločenega poskusa s pozitivnimi kontrolami, ki se v laboratoriju, kjer se preskus izvaja, redno izvaja (npr. vsakih 6 do 18 mesecev); na primer med preverjanjem usposobljenosti in po tem redno, če je to potrebno.

17. Snovi za pozitivno kontrolo morajo zanesljivo povzročiti zaznavno povečanje pogostnosti celic s spontanimi strukturnimi kromosomskimi aberacijami. Odmerke za pozitivno kontrolo je treba izbrati tako, da so učinki jasni, vendar osebi, ki ugotovitve evidentira, ne razkrijejo takoj identitete označenih mikroskopskih preparatov. Primeri snovi za pozitivno kontrolo so navedeni v preglednici 1.

**Preglednica 1:** Primeri snovi za pozitivno kontrolo

<b>Snovi [št. CAS] (referenčna št.)</b>
Ciklofosamid (monohidrat) [št. CAS 50-18-0 (št. CAS 6055-19-2)] (9)
Cikloheksilamin [št. CAS 108-91-8] (7)
Mitomicin C [št. CAS 50-07-7] (6)
Monomerni akrilamid [CAS 79-06-1] (10)
Trietilenmelamin [CAS 51-18-3] (8)

#### *Negativne kontrole*

18. Živali za negativne kontrole, tretirane samo s topilom ali vehiklom, sicer pa obravnavane enako kot tretirane skupine, je treba vključiti za vsak čas vzorčenja. Če ni podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov ali objavljenih podatkov, iz katerih bi bilo razvidno, da izbrano topilo/vehikel ne povzroča kromosomskih aberacij ali drugih škodljivih učinkov, je treba za vsak čas vzorčenja vključiti tudi netretirane kontrolne živali, da se dokaže sprejemljivost kontrol z vehiklom.

## **POSTOPEK**

### **Število živali**

19. Velikosti skupine ob začetku študije je treba določiti z namenom, da se zagotovi vsaj pet samcev na skupino. To število živali na skupino se šteje za zadostno, da se zagotovi ustrezna statistična moč (tj. običajno sposobna zaznati vsaj podvojitve pogostnosti kromosomskih aberacij, ko je stopnja negativne kontrole 1,0-odstotna ali več z 80-odstotno verjetnostjo pri stopnji značilnosti 0,05) (3) (11). Praviloma je za študijo pri dveh časih vzorčenja s tremi skupinami, ki prejemajo odmerke, ter sočasno negativno in pozitivno kontrolno skupino (pri čemer je vsaka skupina sestavljena iz vsaj petih živali) običajno potrebnih 45 živali.

### **Časovni raspored tretiranja**

20. Preskusne kemikalije se običajno dajo enkrat (tj. kot eno tretiranje); lahko se uporabijo tudi drugi režimi odmerjanja, če so znanstveno utemeljeni.
21. Pri skupini z največjim odmerkom se vzorci vzamejo dvakrat po tretiranju. Čas, potreben za sprejem in metabolizem preskusnih kemikalij ter njihov učinek na dinamiko celičnega cikla, lahko vpliva na optimalni čas za zaznavo kromosomskih aberacij, zato je eno vzorčenje zgodnje in drugo pozno, izvedeno približno 24 oziroma 48 ur po tretiranju. Pri vseh drugih odmerkih je treba zgodnje vzorčenje opraviti 24 ur (tj. času, krajšem od trajanja ali enakem trajanju celičnega cikla spermatogonijev B, s čimer se izboljša verjetnost štetja prvih metafaz po tretiranju) po tretiranju, razen če je znano, da so primernejši in utemeljeni drugi časi vzorčenja.
22. Uporabijo se lahko tudi drugi časi vzorčenja. Na primer pri kemikalijah, ki povzročijo učinke, neodvisne od faze S, bi bilo lahko primerno vzorčiti bolj zgodaj (tj. prej kot v 24 urah).
23. Uporabi se lahko režim tretiranja s ponovljenimi odmerki, na primer v povezavi s preskusom na drugi končni točki, ki uporablja 28-dnevno obdobje dajanja (npr. preskusna metoda B.58); vendar bi bile za izvedbo različnih časov vzorčenja potrebne dodatne skupine živali. Tako je treba ustreznost takega časovnega razporeda znanstveno utemeljiti za vsak primer posebej.
24. Živalim se pred evtanazijo intraperitonealno vbrizga ustrezen odmerek zaviralca metafaze (npr. Colcemid<sup>®</sup> ali kolhicin). Zatem se živali vzorčijo v ustreznem časovnem intervalu. Pri miših in podganah je ta interval približno 3–5 ur.

### **Velikost odmerkov**

25. Če se izvede predhodna študija za določanje območja, ker ustrezni podatki, ki bi bili v pomoč pri izbiri odmerkov, niso na voljo, jo je treba izvesti v istem laboratoriju, pri tem uporabiti iste vrste, sev in režim tretiranja kot v glavni študiji ter upoštevati priporočila za izvedbo študij za določanje območja (12). S to študijo je treba določiti največji tolerančni odmerek (MTD), ki je opredeljen kot odmerek, ki povzroči blage toksične učinke, povezane s trajanjem študije (na primer nenormalno vedenje ali odzivi, manjša upočasnitev pridobivanja telesne teže ali citotoksičnost za hematopoetski sistem), ne pa smrti ali znakov bolečine, trpljenja ali stiske, zaradi katerih je treba živali evtanazirati (13).
26. Največji odmerek se lahko opredeli tudi kot odmerek, ki povzroči nekaj znakov toksičnosti v spermatogonijih (npr. zmanjšanje razmerja med mitozami spermatogonijev v prvi in drugi mejotski metafazi). To zmanjšanje naj ne bi presehalo 50 %.
27. Preskusne kemikalije s specifičnim biološkim delovanjem pri majhnih, netoksičnih odmerkih (kakor so hormoni in mitogeni) in kemikalije, ki kažejo nasičenost toksokinetičnih lastnosti, so lahko izjeme pri merilih za določanje odmerkov in jih je treba oceniti za vsak primer posebej.
28. Da se pridobijo informacije o odzivu na odmerek, je treba v popolno študijo vključiti skupino negativne kontrole (odstavek 18) in vsaj tri velikosti odmerkov, ki so običajno ločeni s faktorjem 2, vendar ne več kot 4. Če preskusna kemikalija v študiji za določanje območja ali na

podlagi obstoječih podatkov ne povzroča toksičnosti, mora biti najvišji odmerek pri enkratnem dajanju enak 2 000 mg/kg telesne teže. Če pa preskusna kemikalija povzroča toksičnost, mora biti največji tolerančni odmerek najvišji dani odmerek, v uporabljenih velikostih odmerkov pa je treba po možnosti zajeti razpon od največjega odmerka do odmerka, ki povzroča malo ali nič toksičnosti. Kadar se toksičnost za ciljno tkivo (tj. modo) opazi pri vseh preskušanih velikostih odmerkov, je priporočljiva dodatna študija pri netoksičnih odmerkih. Pri študijah, namenjenih celovitejši opredelitvi kvantitativnih informacij o razmerju med odmerkom in odzivom, so morda potrebne dodatne skupine, ki prejemajo odmerke. Za določene vrste preskusnih kemikalij (npr. zdravila za uporabo v humani medicini), za katere veljajo posebne zahteve, se lahko te meje razlikujejo. Če preskusna kemikalija povzroča toksičnost, je treba izbrati mejni odmerek in dva nižja odmerka (kot je opisano zgoraj). Mejni odmerek pri obdobju dajanja, ki traja vsaj 14 dni, je 1 000 mg/kg telesne teže na dan, pri obdobjih dajanja, krajših od 14 dni, pa je mejni odmerek 2 000 mg/kg telesne teže na dan.

### Dajanje odmerkov

29. Pri načrtovanju preskusa je treba upoštevati predvideni način izpostavljenosti pri ljudeh. Zato se lahko ob ustrezni utemeljitvi izberejo načini izpostavljenosti, kot so s prehrano, pitno vodo, lokalno podkožno, intravenozno, oralno (z gavažo), z vdihavanjem ali vsadkom. Vsekakor pa je treba način izbrati tako, da zagotovi ustrezno izpostavljenost ciljnih tkiv. Dajanje z intraperitonealno injekcijo običajno ni priporočljivo, razen če je znanstveno utemeljeno, saj navadno ni fiziološko ustrezen način izpostavljenosti pri ljudeh. Če je preskusna kemikalija primešana hrani ali pitni vodi, zlasti v primeru enega samega odmerka, je treba paziti, da med zaužitjem hrane in vode ter vzorčenjem preteče dovolj časa, da se lahko zaznajo učinki (glej odstavek 33). Največja količina tekočine, ki se lahko da naenkrat z gavažo ali injekcijo, je odvisna od velikosti preskusne živali. Količina običajno ne sme presegati 1 ml/100 g telesne teže, razen pri vodnih raztopinah, pri katerih se lahko uporabi največ 2 ml/100 g telesne teže. Uporabo večjih količin (če to dovoljuje zakonodaja o dobrobiti živali) je treba utemeljiti. Variabilnost preskusne količine je treba s prilagajanjem koncentracije obdržati na čim najnižji ravni, da se zagotovi konstantna količina glede na telesno težo pri vseh velikostih odmerka.

### Opazanja

30. Vsaj enkrat na dan je treba opraviti splošna klinična opazovanja preskusnih živali in evidentirati klinične znake, po možnosti vsak dan ob istem času in ob upoštevanju obdobja največje intenzivnosti pričakovanih učinkov po vnosu odmerka. Vse živali je treba vsaj dvakrat na dan opazovati za odkrivanje obolevnosti in smrtnosti. Vse živali je treba stehati ob začetku študije, vsaj enkrat na teden med študijami s ponavljajočimi se odmerki in ob evtanaziji. V študijah, ki trajajo en teden ali več, je treba vsaj enkrat na teden izmeriti porabo hrane. Če se preskusna kemikalija daje s pitno vodo, je treba izmeriti porabo vode ob vsaki menjavi vode in vsaj tedensko. Živali, ki kažejo neletalne znake čezmerne toksičnosti, je treba evtanazirati pred koncem preskusnega obdobja (13).

### Priprava kromosomov

31. Takoj po evtanaziji se iz enega ali obeh mod pridobijo suspenzije zarodnih celic, ki se nato izpostavijo hipotonični raztopini in fiksirajo po ustaljenih protokolih (npr. (2) (14) (15)). Celice se nato nanesejo na objektna stekelca in obarvajo (16) (17). Vsa stekelca morajo biti označena tako, da oseba, ki evidentira ugotovitve, ne pozna njihove identitete.

### Analiza

32. Za vsako žival je treba v štetje vključiti vsaj 200 dobro vidnih metafaz (3) (11). Če je pogostnost preteklih negativnih kontrol  $< 1 \%$ , je treba v štetje vključiti več kot 200 celic/žival, da se poveča statistična moč (3). Uporabiti je treba metode obarvanja, ki omogočajo opredelitev centromere.
33. Aberacije kromosomskega in kromatidnega tipa je treba evidentirati posebej in razvrstiti glede na podvrste (prelomi, izmenjave). Vrzeli je treba evidentirati, vendar jih ni treba upoštevati pri ugotavljanju, ali kemikalija povzroča znatno povečanje pojava celic s kromosomskimi aberacijami. S postopki, ki se uporabljajo v laboratoriju, je treba zagotoviti, da analizo kromosomskih aberacij izvajajo osebe, ki so dobro usposobljene za štetje. Ob priznavanju, da postopki pripravljanja preparatov pogosto povzročijo pretrganje dela metafaz in posledično izgubo kromosomov, število centromer v štetih celicah torej ne sme biti manjše od  $2n \pm 2$ , pri čemer je  $n$  haploidno število kromosomov za zadevno vrsto.
34. Čeprav je preskus namenjen zaznavanju strukturnih kromosomskih aberacij, je pomembno, da se pogostnosti poliploidnih celic in celic z endoredupliciranimi kromosomi evidentirata, ko se opazita (glej odstavek 44).

## PODATKI IN POROČANJE

### Obdelava rezultatov

35. Podatke za posamezne živali je treba prikazati v obliki preglednic. Za vsako žival je treba oceniti število celic s strukturnimi kromosomskimi aberacijami in število kromosomskih aberacij na celico. Ločeno je treba navesti aberacije kromatidnega in kromosomskega tipa, razvrščene glede na podvrste (prelomi, izmenjave), skupaj z njihovim številom in pogostnostmi za poskusne in kontrolne skupine. Vrzeli se evidentirajo ločeno. O pogostnosti vrzeli se poroča, vendar se običajno ne vključi v analizo celotne pogostnosti strukturnih kromosomskih aberacij. Ko se opazijo poliploidija in/ali celice z endoredupliciranimi kromosomi, se poroča o njihovem deležu.
36. Navesti je treba podatke o toksičnosti in kliničnih znakih (v skladu z odstavkom 30).

### Merila za sprejemljivost

37. Sprejemljivost preskusa je določena z naslednjimi merili.

- Sočasna negativna kontrola je skladna z objavljenimi standardi za podatke o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov, ki naj bi na splošno znašali  $> 0\%$  in  $\leq 1,5\%$  celic s kromosomskimi aberacijami, ter podatki laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov, če so na voljo (glej odstavek 10 in 18).
  - Sočasne pozitivne kontrole povzročajo odzive, ki so skladni z objavljenimi standardi za podatke o pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov ali zbirko podatkov laboratorija o pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov, če je na voljo, in statistično značilno povečanje v primerjavi z negativno kontrolo (glej odstavek 17 in 18).
  - Analizirano je bilo ustrezno število celic in odmerkov (glej odstavek 28 in 32).
  - Merila za izbor največjega odmerka so skladna z merili, opisanimi v odstavkih 25 in 26.
38. Če se opazita mitoza in mejoza, je treba določiti razmerje med mitozami spermatogonijev v prvi in drugi mejotski metafazi kot merilo citotoksičnosti za vse tretirane živali in živali negativne kontrole v celem vzorcu 100 delečih se celic na žival. Če se opazi le mitoza, je treba določiti mitotični indeks v vsaj 1 000 celicah za vsako žival.

#### **Vrednotenje in razlaga rezultatov**

39. Da bi dobili dovolj podatkov za analizo odziva na odmerek, je treba analizirati vsaj tri tretirane skupine, ki prejemajo odmerke.
40. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno pozitivno, če:
- se vsaj pri enem od preskusnih odmerkov pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;
  - je povečanje povezano z odmerkom pri vsaj enem času vzorčenja in
  - je kateri koli od rezultatov zunaj sprejemljivega razpona podatkov o negativnih kontrolah ali porazdelitve podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi), če je na voljo.

Za preskusno kemikalijo se nato šteje, da lahko povzroča kromosomske aberacije v spermatogonijih preskusnih živali. Priporočila glede najustreznejših statističnih metod so navedena tudi v virih (11) (18). V uporabljenih statističnih preskusih se mora kot poskusna enota preučiti žival.

41. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno negativno, če:
- se pri nobenem od preskusnih odmerkov ne pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;
  - pri nobenem poskusnem pogoju ni z odmerkom povezanega povečanja in

- če so vsi rezultati znotraj sprejemljivega razpona podatkov o negativnih kontrolah ali podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi), če so na voljo.

Za preskusno kemikalijo se nato šteje, da ne more povzročiti nastanka kromosomskih aberacij v spermatogonijih preskusnih živali. Priporočila glede najustreznejših statističnih metod so navedena tudi v virih (11) (18). Negativen rezultat ne izključuje možnosti, da lahko kemikalija povzroči kromosomske aberacije v poznejših razvojnih fazah, ki niso preučene, ali genske mutacije.

42. Preverjanje jasno pozitivnega in jasno negativnega odziva ni potrebno.
43. Če odziv ni jasno negativen ali pozitiven in za pomoč pri opredelitvi biološke pomembnosti rezultatov (npr. šibko ali mejno povečanje) je treba podatke oceniti s strokovno presojo in/ali nadaljnjimi preiskavami z uporabo obstoječih podatkov o poskusih, kot je upoštevanje, ali je pozitiven rezultat zunaj sprejemljivega razpona podatkov o negativnih kontrolah ali podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (19).
44. Zbirka podatkov v redkih primerih celo po izvedbi nadaljnjih preiskav onemogoča sprejetje sklepa o pozitivnih ali negativnih rezultatih, zato se zaključí, da je dvoumna.
45. Povečanje števila poliploidnih celic lahko kaže na to, da ima preskusna kemikalija potencial za zaviranje mitotičnih procesov in povzročanje numeričnih kromosomskih aberacij (20). Povečanje števila celic z endoredupliciranimi kromosomi lahko pomeni, da ima preskusna kemikalija potencial za zaviranje poteka celičnega cikla (21) (22), kar je drugačen mehanizem povzročanja numeričnih kromosomskih sprememb kot zaviranje mitotičnih procesov (glej odstavek 2). Pojav poliploidnih celic in celic z endoredupliciranimi kromosomi je zato treba evidentirati ločeno.

### **Poročilo o preskusu**

46. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

#### *Povzetek.*

##### *Preskusna kemikalija:*

- vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;
- stabilnost preskusne kemikalije, če je znana;
- topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu, če sta znani;
- meritve vrednosti pH, osmolarnosti in oborine v gojišču, ki mu je bila dodana preskusna kemikalija, če je ustrezno.

Snov iz ene sestavine:

- fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;
- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

- čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

*Priprava preskusne kemikalije:*

- utemeljitev izbire vehikla;
- topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu/vehiklu;
- priprava pripravkov hrane in pitne vode ali pripravkov za vdihavanje;
- analitsko določanje sestave (npr. stabilnost, homogenost, nominalne koncentracije),
- kadar se izvaja.

*Preskusne živali:*

- uporabljena vrsta/sev in utemeljitev izbire;
- število in starost živali;
- izvor, nastanitvene razmere, prehrana itd.;
- metoda edinstvene identifikacije živali;
- pri kratkotrajnih študijah: teža posameznih živali ob začetku in koncu preskusa; pri študijah, ki trajajo več kot en teden: teža posameznih živali med študijo in poraba hrane. Vključiti je treba razpon, srednjo vrednost in standardni odklon telesne teže za vsako skupino.

*Preskusni pogoji:*

- podatki o pozitivnih in negativnih kontrolah (z vehiklom/topilom);
- podatki iz študije za določanje območja, če je bila izvedena;
- utemeljitev izbire velikosti odmerkov;
- utemeljitev načina dajanja;
- podrobnosti o pripravi preskusne kemikalije;
- podrobnosti o dajanju preskusne kemikalije;
- razlogi za čas usmrtnice;
- metode za merjenje toksičnosti za živali, vključno s histopatološko ali hematološko analizo, če sta bili uporabljeni, ter pogostnost opazovanja živali in tehtanja;

- metode za preverjanje, ali je preskusna kemikalija dosegla ciljno tkivo ali krvni obtok, v primeru negativnih rezultatov;
- dejanski odmerek (v mg/kg telesne teže/dan), izračunan glede na koncentracijo preskusne kemikalije (v ppm) v hrani/pitni vodi in porabo hrane/pitne vode, če je ustrezno;
- podrobnosti o kakovosti hrane in vode;
- podroben opis časovnega zaporedja tretiranj in vzorčenj ter utemeljitev izbir;
- metoda za evtanazijo;
- metoda za analgezijo (če se uporablja);
- postopki za izolacijo tkiv;
- identiteta kemikalije, ki zavira metafazo, njena koncentracija in čas tretiranja;
- metode za pripravo preparatov;
- merila za štetje aberacij;
- število analiziranih celic na žival;
- merila za obravnavanje študij kot pozitivnih, negativnih ali dvoumnih.

#### *Rezultati:*

- stanje živali pred preskusnim obdobjem in med njim, vključno z znaki toksičnosti;
- telesna teža in teža organov ob usmrtni (če se uporabljajo večkratna tretiranja, telesne teže med režimom tretiranja);
- znaki toksičnosti;
- mitotični indeks;
- razmerje med mitozami spermatogonijev v prvi in drugi mejotski metafazi ali drugi dokazi o izpostavljenosti ciljnemu tkivu;
- vrsta in število aberacij, navedena za vsako žival posebej;
- skupno število aberacij na skupino s srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni;
- število celic z aberacijami na skupino s srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni;
- razmerje med odmerkom in odzivom, če je mogoče;
- uporabljene statistične analize in metode;
- podatki o sočasni negativni kontroli;
- podatki o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov z območji, srednjimi vrednostmi, standardnimi odkloni in 95-odstotnim intervalom zaupanja (kadar je na voljo) ali objavljeni podatki o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov, uporabljeni za sprejemljivost rezultatov preskusa;

- podatki o sočasni pozitivni kontroli;
- spremembe v ploidnosti, če so opažene, vključno s pogostnostjo poliploidije in/ali endoredupliciranih celic.

*Razprava o rezultatih*

*Sklepna ugotovitev*

## VIRI

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, št. 234, OECD, Pariz.
- (2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. V: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. ur. Venitt, S., in Parry, J. M. IRL Press, Oxford, Washington DC, str. 275–306.
- (3) Adler, I.-D., Shelby, M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T., in Tanaka, N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. *Mutation Res.*, 312, 313–318.
- (4) Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. *Mutation Res.*, 455, 167–189.
- (5) Hess, R. A., in de Franca, L. R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. V: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis. Cheng, C. Y. (ur.). Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, str. 1–15.
- (6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, *Mutation. Res.*, 23(3): 368–379. Adler, I.-D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. V: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C., Lambert, B., in Magnusson, J. (ur.). Liss, New York, str. 477–484.
- (7) Cattanaach, B. M., in Pollard, C. E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, *Mutation Res.*, 12, 472–474.
- (8) Cattanaach, B. M., in Williams, C. E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, *Mutation Res.*, 13, 371–375.
- (9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, *Humangenetik* 29, 135–140.
- (10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, *Mutation Res.*, 57(3): 313–324.
- (11) Adler, I.-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I., in Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, *Mutation Res.*, 417, 19–30.

- (12) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J., in Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 313–319.
- (13) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment (št. 19), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (14) Yamamoto, K., in Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. *Mutation Res.*, 52, 207–209.
- (15) Hsu, T. C., Elder, F., in Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. *Environ. Mutagen.*, 1, 291–294.
- (16) Evans, E. P., Breckon, G., in Ford, C. E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 3, 289–294.
- (17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G., in Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays. V: Kirkland, D. J. (ur.). 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, str. 115–141.
- (18) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G., in Savage, J. R. K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays. V: Kirkland, D. J. (ur.). 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, str. 184–232.
- (19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J., in Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. *Mutation Res.*, 723, 87–90.
- (20) Warr, T. J., Parry, E. M., in Parry, J. M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, *Mutation Res.*, 287, 29–46.
- (21) Huang, Y., Change, C., in Trosko, J. E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. *Cancer Res.*, 43, 1362–1364.
- (22) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. *Mutation Res.*, 119, 403–413.

## Dodatek

### OPREDELITVE POJMOV

Aneuploidija: vsako odstopanje od normalnega diploidnega (ali haploidnega) števila kromosomov za en ali več kot en kromosom, vendar ne za celotni set kromosomov (poliploidija).

Centromera: del kromosoma, s katerim se med delitvijo celic povežejo niti delitvenega vretena, kar omogoči urejeno gibanje hčerinskih kromosomov proti poloma hčerinskih celic.

Kemikalija: snov ali zmes.

Raznolikost kromosomov: raznolikost oblik (npr. metacentrični, akrocentrični itd.) in velikosti kromosomov.

Aberacija kromatidnega tipa: strukturna poškodba kromosoma, izražena kot prelom posamezne kromatide ali prelom in združitev med kromatidama.

Aberacija kromosomskega tipa: strukturna poškodba kromosoma, izražena kot prelom ali prelom in združitev obeh kromatid na istem mestu.

Klastogen: vsaka kemikalija, ki povzroči strukturne kromosomske aberacije v populacijah celic ali organizmih.

Vrzel: akromatska lezija, ki je manjša od širine ene kromatide, z zelo majhno nepravilnostjo kromatid.

Genotoksično: splošni pojem, ki zajema vse vrste poškodb DNK ali kromosomov, vključno s prelomi, delecijami, adukti, nukleotidnimi spremembami in povezavami, prerazporeditvami, mutacijami, kromosomskimi aberacijami in aneuploidijo. Vsi genotoksični učinki ne vplivajo na nastanek mutacij ali trajnih poškodb kromosomov.

Mitotični indeks (MI): razmerje med številom celic v metafazi in skupnim številom celic v opazovani populaciji celic; kazalnik stopnje proliferacije te populacije.

Mitoza: delitev celičnega jedra, ki je običajno razdeljena na profazo, prometafazo, metafazo, anafazo in telofazo.

Mutageno: povzroča dedno spremembo zaporedij baznih parov DNK v genih ali strukture kromosomov (kromosomske aberacije).

Numerična anomalija: sprememba števila kromosomov, ki se razlikuje od normalnega števila, ki je značilno za uporabljene živali.

Poliploidija: večkratnik haploidnega števila kromosomov ( $n$ ), razen diploidnega števila (tj.  $3n$ ,  $4n$  in tako naprej).

Strukturna aberacija: sprememba v strukturi kromosoma, ki se lahko zazna pri mikroskopskem pregledu metafaze celične delitve in je vidna v obliki delecij in fragmentov, izmenjav.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti in biološki materiali.“

(5) Poglavje B.40 dela B se nadomesti z naslednjim:

## **„B.40 JEDKOST ZA KOŽO *IN VITRO*: PRESKUSNA METODA TRANSKUTANE ELEKTRIČNE UPORNOSTI (TER)**

### **UVOD**

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 430 (2015). Jedkost za kožo pomeni nastanek nepovračljive poškodbe kože, ki se kaže kot vidno odmiranje prek povrhnjice v usnjico po nanosu preskusne kemikalije (kot je opredeljeno v globalno usklajenem sistemu Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN) (1) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (uredba CLP)<sup>1</sup>). Pri tej posodobljeni preskusni metodi B.40 se izvede postopek *in vitro*, ki omogoča opredelitev nejedkih in jedkih snovi ter zmesi v skladu z GHS ZN (1) in uredbo CLP.
2. Ocena jedkosti za kožo se je običajno izvajala z uporabo laboratorijskih živali (preskusna metoda B.4, enakovredna Smernici OECD za preskušanje 404, ki je bila prvotno sprejeta leta 1981 ter revidirana v letih 1992, 2002 in 2015) (2). Poleg sedanje preskusne metode B.40 so bile validirane še druge preskusne metode *in vitro* za preskušanje potenciala kemikalij za povzročanje jedkosti za kožo, ki so bile sprejete kot preskusna metoda B.40a (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 431) (3) in preskusna metoda B.65 (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 435) (4), s katerima se lahko po potrebi opredelijo tudi podkategorije jedkih kemikalij. Več validiranih preskusnih metod *in vitro* je bilo sprejetih kot preskusna metoda B.46 (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 439) (5), ki naj bi se uporabljala za preskušanje draženja kože. V Smernici OECD za celostne pristope k testiranju in ocenjevanju (IATA) v zvezi z jedkostjo za kožo in draženjem kože je opisanih več modulov, v katerih so zbrani različni viri informacij in orodja za analizo, zagotovljene smernice o tem, (i) kako obstoječe podatke, pridobljene s preskušanjem, in podatke, ki ne temeljijo na preskušanju, združiti in uporabiti pri ocenjevanju potenciala kemikalij za draženje kože in jedkost za kožo, (ii) predlagan pa je tudi pristop, kadar je potrebno dodatno preskušanje (6).
3. S to preskusno metodo se obravnava končna točka jedkost za kožo z vidika zdravja ljudi. Temelji na preskusni metodi transkutane električne upornosti (TER) pri podganah, pri kateri se z uporabo kožnih ploščic opredelijo jedke snovi glede na njihovo zmožnost zmanjšati celovitost in pregradno funkcijo rožene plasti pokožnice. Ustrezna smernica OECD za preskušanje je bila

---

<sup>1</sup> Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 13.12.2008, str. 1).

prvotno sprejeta leta 2004, leta 2015 pa je bila posodobljena zaradi sklicevanja na dokument s smernicami IATA.

4. Za oceno preskušanja *in vitro* v zvezi z jedkostjo za kožo za regulativne namene so bile izvedene predvalidacijske študije (7), ki jim je sledila uradna validacijska študija preskusne metode TER na podganji koži za oceno jedkosti za kožo (8) (9) (10) (11). Na podlagi izidov teh študij je bilo izdelano priporočilo, da se lahko preskusna metoda TER (imenovana validirana referenčna metoda – VRM) uporabi za regulativne namene za oceno jedkosti za kožo *in vivo* (12) (13) (14).
5. Preden se omogoči uporaba predlagane podobne ali spremenjene preskusne metode TER *in vitro* v zvezi z jedkostjo za kožo, ki ni VRM, za regulativne namene, je treba določiti njeno zanesljivost, ustreznost (točnost) in omejitve, kar zadeva predlagano uporabo, da se zagotovi njena podobnost z VRM v skladu s standardi izvajanja (15). Medsebojno priznavanje podatkov OECD bo zagotovljeno šele, ko bo predlagana nova ali posodobljena preskusna metoda v skladu s standardi izvajanja pregledana in vključena v ustrezno smernico OECD za preskušanje.

## OPREDELITVE POJMOV

6. Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku.

## ZAČETNI PREUDARKI

7. V validacijski študiji (10) in drugih objavljenih študijah (16) (17) so ugotovili, da se lahko pri preskusni metodi TER na podganji koži razlikuje med znanimi snovmi, ki so jedke za kožo, in znanimi snovmi, ki niso jedke, s splošno 94-odstotno občutljivostjo (51/54) in 71-odstotno specifičnostjo (48/68) za zbirko podatkov o 122 snoveh.
8. S to preskusno metodo se obravnava jedkost za kožo *in vitro*. Omogoča opredelitev nejedkih in jedkih preskusnih kemikalij v skladu z GHS ZN/uredbo CLP. Kot so pokazale validacijske študije (8) (9) (10) (11), je omejitev te preskusne metode ta, da ne omogoča razvrstitve jedkih snovi in zmesi v podkategorije v skladu z GHS ZN/uredbo CLP. Uporaba te preskusne metode bo odvisna od veljavnega regulativnega okvira. Čeprav ta preskusna metoda ne zagotavlja ustreznih informacij o dražilnosti za kožo, je treba opozoriti, da se s preskusno metodo B.46 izrecno obravnava učinek dražilnosti za kožo *in vitro* na zdravje (5). Za popolno vrednotenje lokalnih učinkov na kožo po enkratni izpostavljenosti kože je treba uporabiti Smernico OECD v zvezi z IATA (6).
9. V validacijski študiji, na kateri temelji ta preskusna metoda, je bil preizkušen širok nabor kemikalij, ki predstavljajo predvsem snovi, v empirično zbirko podatkov validacijske študije pa je vključenih 60 snovi, ki zajemajo najrazličnejše kemijske razrede (8) (9). Na podlagi vseh razpoložljivih podatkov se preskusna metoda uporablja za najrazličnejše kemijske razrede in agregatna stanja, vključno s tekočimi snovmi, poltrdnimi snovmi, trdnimi snovmi in voski. Ker

pa za posamezna agregatna stanja preskusne snovi z ustreznimi referenčnimi podatki niso na voljo, je treba opozoriti, da je bilo med validacijo ocenjeno podobno majhno število voskov in jedkih trdnih snovi. Tekoče snovi so lahko vodne raztopine ali ne, trdne snovi so lahko topne ali netopne v vodi. Kadar se lahko dokaže, da preskusne metode ni mogoče uporabljati za posamezno kategorijo snovi, se ta preskusna metoda zanje ne sme uporabiti. Poleg tega se predpostavlja, da se ta preskusna metoda uporablja za zmesi kot razširitev njene uporabe za snovi. Ker pa zmesi zajemajo širok spekter kategorij in sestave in ker so v zvezi s preskušanjem zmesi trenutno na voljo samo omejene informacije, se ta preskusna metoda v primerih, ko se lahko dokaže, da je ni mogoče uporabiti za posamezno kategorijo zmesi (npr. v skladu s strategijo, kot jo predlagajo Eskes *et al.*, 2012) (18), ne sme uporabiti za to posamezno kategorijo zmesi. Preden se preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni. Plini in aerosoli še niso bili ocenjeni v validacijskih študijah (8) (9). Čeprav se lahko preskusijo z uporabo preskusne metode TER, veljavna preskusna metoda ne dovoljuje preskušanja plinov in aerosolov.

## NAČELO PRESKUSA

10. Preskusna kemikalija se nanese za največ 24 ur na epidermalne površine kožnih ploščic v preskusnem sistemu z dvema komorama, v katerem kožne ploščice delujejo kot pregrada med komorami. Kožne ploščice se odvzamejo s humano usmrčenih podgan, starih 28–30 dni. Jedke kemikalije se opredelijo glede na zmožnost zmanjšati celovitost in pregradno funkcijo rožene plasti pokožnice, ki se meri kot znižanje TER pod raven praga (16) (glej odstavek 32). Za TER na koži podgan je bil na podlagi obsežnih podatkov za širok obseg snovi izbran prag 5 k $\Omega$ , kjer je bila velika večina vrednosti precej nad pragom (pogosto > 10 k $\Omega$ ) ali precej pod njim (pogosto < 3 k $\Omega$ ) (16). Na splošno preskusne kemikalije, ki niso jedke za živali, ampak so dražilne ali nedražilne, ne znižujejo TER pod ta prag. Prav tako lahko uporaba drugih kožnih pripravkov ali druge opreme spremeni vrednost praga, kar zahteva dodatne validacije.
11. V preskusni postopek je vključena stopnja vezave barvila za potrjevanje pozitivnih rezultatov preskusa TER, kadar so vrednosti okoli 5 k $\Omega$ . V stopnji vezave barvila se ugotovi, ali je povečanje ionske prepustnosti posledica fizičnega uničenja rožene plasti pokožnice. Metoda TER je na podganji koži pokazala, da lahko pri kuncih napove jedkost *in vivo*, določeno s preskusno metodo B.4 (2).

## DOKAZOVANJE USPOSOBLJENOSTI

12. Pred redno uporabo preskusne metode TER na koži podgan, ki izpolnjuje zahteve te preskusne metode, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost tako, da pravilno razvrstijo 12 snovi za preverjanje tehnične usposobljenosti, priporočenih v preglednici 1. V primerih, ko snov s seznama ni na voljo ali ko je to utemeljeno, se lahko uporabi druga snov, za katero so na

voljo ustrezni referenčni podatki *in vivo* in *in vitro* (npr. s seznama referenčnih kemikalij (16)), če se uporabijo enaka merila za izbor, kot so opisana v preglednici 1.

**Preglednica 1:** Seznam snovi za preverjanje usposobljenosti<sup>1</sup>

Snov	Št. CAS	Kemijski razred <sup>2</sup>	GHS ZN/uredba CLP Kat. na podlagi rezultatov <i>in vivo</i> <sup>3</sup>	VRM Kat. na podlagi rezultatov <i>in vitro</i>	Agregatno stanje	pH <sup>4</sup>
<b>Jedke snovi <i>in vivo</i></b>						
N,N'-dimetil dipropilentriamin	10563-29-8	organska baza	1A	6 x C	tekoče	8,3
1,2-diaminopropan	78-90-0	organska baza	1A	6 x C	tekoče	8,3
Žveplova kislina (10-odstotna)	7664-93-9	anorganska kislina	(1A)/1B/1C	5 x C 1 x NJ	tekoče	1,2
Kalijev hidroksid (10-odstotni vodni)	1310-58-3	anorganska baza	(1A)/1B/1C	6 x C	tekoče	13,2
Oktanojska (kaprilska) kislina	124-07-2	organska kislina	1B/1C	4 x C 2 x NJ	tekoče	3,6
2-terc-butilfenol	88-18-6	fenol	1B/1C	4 x C 2 x NJ	tekoče	3,9
<b>Nejedke snovi <i>in vivo</i></b>						
Izostearinska kislina	2724-58-5	organska kislina	NJ	6 x NJ	tekoče	3,6
4-amino-1,2,4-triazol	584-13-4	organska baza	NJ	6 x NJ	trdno	5,5
Fenetil bromid	103-63-9	elektrofil	NJ	6 x NJ	tekoče	3,6
4-(metiltio)-benzaldehyd	3446-89-7	elektrofil	NJ	6 x NJ	tekoče	6,8
1,9-dekadien	1647-16-1	nevtralna organska snov	NJ	6 x NJ	tekoče	3,9
Tetrakloroetilen	127-18-4	nevtralna organska snov	NJ	6 x NJ	tekoče	4,5

Kratice: aq = vodni; št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS); VRM = validirana referenčna metoda; ND = ni določeno.

<sup>1</sup> Snovi za preverjanje usposobljenosti, ki so najprej razvrščene na jedke in nejedke, nato po podkategoriji jedkosti in nazadnje po kemijskem razredu, so bile izbrane med snovmi, uporabljenimi pri validacijski študiji ECVAM v zvezi s preskusno metodo TER na koži podgan (8) (9). Če ni navedeno drugače, so se snovi preskusile pri stopnji čistosti, pri kateri so bile kupljene od komercialnega vira (8). Kolikor je bilo mogoče, so bile v izbor vključene snovi, ki: (i) predstavljajo razpon odzivov jedkosti (npr. snovi, ki niso jedke; snovi, ki so od blago do močno jedke), ki jih je mogoče izmeriti ali napovedati z VRM; (ii) predstavljajo kemijske razrede, uporabljene v validacijski študiji; (iii) kažejo značilnosti delovanja VRM; (iv) imajo dobro opredeljene kemijske strukture; (v) dajejo dokončne rezultate pri referenčni preskusni metodi *in vivo*; (vi) so razpoložljive na trgu in (vii) niso povezane s previsokimi stroški odstranjevanja.

<sup>2</sup> Kemijski razred, dodeljen po Barrattu *et al.* (8).

<sup>3</sup> Ustrezne embalažne skupine ZN so I, II in III za kategorije 1A, 1B oziroma 1C po GHS ZN/uredbi CLP.

<sup>4</sup> Vrednosti pH so povzete po Fentemu *et al.* (9) in Barrattu *et al.* (8).

## POSTOPEK

13. Na voljo so standardni delovni postopki za preskusno metodo TER v zvezi z jedkostjo za kožo na koži podgan (19). Preskusne metode TER na koži podgan, zajete s to preskusno metodo, morajo izpolnjevati pogoje, navedene v nadaljevanju.

### Živali

14. Uporabiti je treba podgane, ker je bila občutljivost kože podgan za snovi pri tej preskusni metodi predhodno dokazana (12) in so edini vir kože, ki je bil uradno validiran (8) (9). Zagotoviti je treba, da so mešički dlak v dormantni fazi, preden se začne rast odraslih dlak, pri čemer sta zlasti pomembna starost (ob odvzemu kože) in sev podgane.
15. Dlaka na hrbtu in bokih mladih približno 22 dni starih samcev ali samic (Wistar ali podobnega seva podgan) se previdno odstrani z majhnimi škarjami. Nato se živali s pazljivim brisanjem umijejo, ostrižena površina pa se potopi v antibiotično raztopino (ki denimo vsebuje streptomycin, penicilin, kloramfenikol in amfotericin v koncentracijah, ki učinkovito preprečujejo rast bakterij). Živali se z antibiotično raztopino ponovno umijejo tretji ali četrti dan po prvem umivanju, uporabijo pa se v 3 dneh po drugem umivanju, ko rožena plast okreva po odstranitvi dlak.

### Priprava kožnih ploščic

16. Živali se humano usmrtijo, ko so stare 28–30 dni; ta starost je ključna. Z vsake posamezne živali se nato odstrani hrbtno-bočna koža, s katere se previdno odlušči vsa odvečna podkožna maščoba. Nato se izrežejo kožne ploščice v premeru približno 20 mm. Koža se lahko shrani pred uporabo ploščic, kadar se dokaže, da so podatki pozitivnih in negativnih kontrol enaki kot pri sveži koži.
17. Vsaka kožna ploščica se namesti čez konec cevi iz PTFE (politetrafluoroetilena), pri čemer se mora površina pokožnice dotikati cevi. Čez konec cevi se tesno namesti gumijast obroč, s katerim se koža pričvrsti, nato se obreže odvečno tkivo. Gumijasti obroč se nato z naravnim vazelinom pazljivo pritesni na konec PTFE-cevi. Cev se z vzmetno sponko namesti v receptorsko komoro, ki vsebuje raztopino  $MgSO_4$  (154 mM) (slika 1). Kožne ploščice morajo biti popolnoma potopljene v raztopino  $MgSO_4$ . Iz kože ene podgane je mogoče pridobiti od 10 do 15 kožnih ploščic. Mere cevi in obroča so prikazane na sliki 2.
18. Na dveh kožnih ploščicah iz kože vsake živali se pred začetkom preskušanja za namene kontrole kakovosti izmeri TER. Preostale ploščice se lahko uporabijo pri preskusni metodi, če je električna upornost obeh ploščic večja od 10 k $\Omega$ . Če je upornost manjša od 10 k $\Omega$ , je treba preostale ploščice, pripravljene iz iste kože, zavreči.

## Nanos preskusne kemikalije in kontrolnih snovi

19. Pri vsaki ponovitvi (poskusu) je treba uporabiti istočasne pozitivne in negativne kontrole, da se zagotovi ustreznost izvedbe modela poskusa. Pri vsaki ponovitvi (poskusu) se lahko uporabijo le kožne ploščice ene živali. Predlagana preskusna kemikalija za pozitivno kontrolo je 10-molarna klorovodikova kislina, za negativno kontrolo pa destilirana voda.
20. Tekoče preskusne kemikalije (150  $\mu$ l) se enakomerno nanesejo na površino pokožnice v cevi. Pri preskušanju trdnega materiala se na kožno ploščico enakomerno nanese dovolj trdne snovi, da se zagotovi, da je prekrita celotna površina pokožnice. Nato se na trdno snov doda deionizirana voda (150  $\mu$ l), cevka pa se rahlo pretrese. Za največji stik s kožo bo morda treba trdno snov segreti do 30 °C, da se preskusna kemikalija stali ali zmehča, ali zmleti, da nastane granulati ali prašek.
21. Za vsako preskusno in kontrolno kemikalijo se pri vsaki ponovitvi (poskusu) uporabijo tri kožne ploščice. Preskusne kemikalije se za 24 ur nanesejo pri 20–23 °C. Preskusna kemikalija se odstrani tako, da se toliko časa spira s curkom tekoče vode pri največ sobni temperaturi, dokler ni več mogoče odstraniti materiala.

## Meritve TER

22. Impedanca kože se izmeri kot TER z Wheatstonovim mostičem nizke napetosti in izmeničnega toka (18). Splošne specifikacije za mostič so: delovna napetost 1–3 volte, izmenični tok 50–1 000 Hz v obliki sinusa ali pravokotnika in merilno območje najmanj 0,1–30 k $\Omega$ . Merilni mostič v validacijski študiji je meril induktivnost do 2 000 H, kapacitivnost do 2 000  $\mu$ F in upornost do 2 M $\Omega$  pri frekvencah 100 Hz ali 1 kHz v zaporednih ali vzporednih meritvah. V preskusu jedkosti TER se meritve evidentirajo v obliki upornosti pri frekvenci 100 Hz in z zaporednimi vrednostmi. Pred merjenjem električne upornosti se površinska napetost kože zmanjša, tako da se doda zadostna količina 70-odstotnega etanola, da prekrije pokožnico. Po nekaj sekundah se etanol odstrani iz cevi, tkivo pa se nato navlaži s 3 ml raztopine MgSO<sub>4</sub> (154 mM). Za merjenje upornosti v k $\Omega$ /kožno ploščico se elektrode merilnega mostiča namestijo na vsako stran kožne ploščice (slika 1). Mere elektrod in dolžina elektrode pod krokodilsko sponko so navedene na sliki 2. Sponka notranje (debele) elektrode med merjenjem upornosti leži na vrhu PTFE-cevi, s čimer se zagotovi, da je v raztopino MgSO<sub>4</sub> ves čas potopljena enaka dolžina elektrode. Zunanja elektroda je v receptorski komori, in sicer se dotika njenega dna. Razdalja med vzmetno sponko in dnom PTFE-cevi je konstantna (slika 2), saj ta razdalja vpliva na dobljeno vrednost upornosti. Zato mora biti razdalja med notranjo elektrodo in kožno ploščico konstantna in minimalna (1–2 mm).
23. Če je izmerjeni upor večji od 20 k $\Omega$ , je to morda posledica tega, da ostanki preskusne kemikalije prekrivajo površino pokožnice kožne ploščice. Za dodatno odstranitev te plasti se lahko na primer začepi PTFE-cev z orokavičenim palcem in jo stresa približno 10 sekund; raztopina MgSO<sub>4</sub> se zavrže, merjenje upornosti pa se ponovi s svežim MgSO<sub>4</sub>.

24. Lastnosti in mere preskusne naprave in uporabljenega poskusnega postopka lahko vplivajo na pridobljene vrednosti TER. Prag za jedkost  $5 \text{ k}\Omega$  je bil ugotovljen na podlagi podatkov, pridobljenih s posebnimi napravami in postopkom, opisanim v tej metodi. Če se preskusni pogoji bistveno spremenijo ali če se uporabi drugačna naprava, lahko veljajo drugačni pragovi in kontrolne vrednosti. Zaradi tega je treba metodologijo in prag upornosti obvezno umerjati s preskušanjem vrste snovi za preverjanje usposobljenosti, ki se izberejo med snovmi, uporabljenimi v validacijski študiji (8) (9), ali skupinami snovi, ki so podobne preskušani. Nabor primernih snovi za preverjanje usposobljenosti je prikazan v preglednici 1.

### **Metode vezave barvila**

25. Izpostavljenost določenim nejedkim materialom lahko povzroči zmanjšanje upornosti pod prag  $5 \text{ k}\Omega$ , pri čemer je omogočen prehod ionov skozi roženo plast in s tem zmanjšanje električne upornosti (9). Npr. nevtralne organske snovi in snovi, ki so površinsko aktivne (med drugim detergenti, emulgatorji in druge površinsko aktivne snovi), lahko odstranjujejo kožne lipide in povzročijo večjo prepustnost za ione. Zato je treba pri vrednostih TER za preskusne kemikalije pod  $5 \text{ k}\Omega$  ali okoli te vrednosti in brez vidnih poškodb kožnih ploščic opraviti oceno penetracije barvila na kontrolnih in tretiranih tkivih, da se ugotovi, ali so vrednosti TER posledica povečane prepustnosti kože ali jedkosti za kožo (7) (9). V slednjem primeru barvilo sulforodamin B pretrga roženo plast, pri čemer barvilo po nanosu na površino kože hitro penetrira in obarva pod njim ležeče tkivo. To specifično barvilo je odporno proti širokemu razponu snovi in nanj ne vpliva ekstrakcijski postopek, opisan spodaj.

### **Nanos in odstranitev barvila sulforodamin B**

26. Po oceni TER se magnezijev sulfat odstrani iz cevi, kožo pa je treba natančno pregledati za vidne poškodbe. Če očitnih večjih poškodb (npr. perforacije) ni, se na površino pokožnice vsake kožne ploščice za 2 uri nanese  $150 \mu\text{l}$  10-odstotne (m/V) raztopine barvila sulforodamin B (Acid Red 52; C.I. 45100; št. CAS 3520-42-1) v destilirani vodi. Te kožne ploščice se nato približno 10 sekund spirajo s tekočo vodo pri največ sobni temperaturi, da se odstrani morebitno odvečno/nevezano barvilo. Vsaka kožna ploščica se pazljivo odstrani iz PTFE-cevi in prenese v vialo (npr. 20-mililitrsko stekleničko za scintilacijsko tekočino), ki vsebuje deionizirano vodo (8 ml). Viale se 5 minut rahlo stresajo, da se odstrani preostalo odvečno nevezano barvilo. Postopek izpiranja se ponovi, nato pa se kožne ploščice odstranijo in prenesejo v vialo, ki vsebuje 5 ml 30-odstotnega (m/V) natrijevega dodecil sulfata (SDS) v destilirani vodi, ter v inkubatorju čez noč shranijo pri  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ .
27. Po inkubaciji se vse kožne ploščice odstranijo in zavržejo, preostala raztopina pa se 8 minut centrifugira pri  $21 \text{ }^\circ\text{C}$  (relativna centrifugalna sila  $\sim 175 \times g$ ). 1 ml vzorca supernatanta se nato razredči v razmerju 1 proti 5 (V/V) (tj. 1 ml + 4 ml) s 30-odstotnim SDS (m/V) v destilirani vodi. Optična gostota raztopine se meri pri 565 nm.

### **Izračun vsebnosti barvila**

28. Vsebnost barvila sulforodamin B v ploščici se izračuna iz vrednosti optične gostote (9) (koeficient molarne ekstinkcije barvila sulforodamin B pri 565 nm =  $8,7 \times 10^4$ ; molekulska masa = 580). Vsebnost barvila se določi za vsako kožno ploščico s pomočjo ustrezne umeritvene krivulje, nato pa se izračuna srednja vrednost vsebnosti barvila za ponovljene vzorce.

### Merila za sprejemljivost

29. Povprečni rezultati TER se sprejmejo pod pogojem, da so vrednosti istočasne pozitivne in negativne kontrole v mejah sprejemljivosti za to metodo v preskusnem laboratoriju. Meje sprejemljivosti za metodologijo in naprave, opisane zgoraj, so prikazane v naslednji preglednici.

Kontrola	Snov	Mejni upor (k $\Omega$ )
Pozitivna	10-molarna klorovodikova kislina	0,5–1,0
Negativna	destilirana voda	10–25

30. Povprečni rezultati vezanja barvila se sprejmejo, če so vrednosti istočasne kontrole v mejah sprejemljivosti za metodo. Predlagane sprejemljive meje vsebnosti barvila za kontrolne snovi za zgoraj opisano metodologijo in napravo so navedene v spodnji preglednici.

Kontrola	Snov	Meje vsebnosti barvila ( $\mu$ g/košček)
Pozitivna	10-molarna klorovodikova kislina	40–100
Negativna	destilirana voda	15–35

### Razlaga rezultatov

31. Mejna vrednost TER, ki se uporablja za razlikovanje med jedkimi in nejedkimi preskusnimi kemikalijami, je bila določena med optimiranjem preskusne metode, preskušena v predvalidacijski fazi in potrjena v uradni validacijski študiji.
32. Napovedni model za preskusno metodo TER v zvezi z jedkostjo za kožo na koži podgan (9) (19), povezan s sistemom za razvrščanje GHS ZN/uredbe CLP, je naveden v nadaljevanju.

Za preskusno kemikalijo se šteje, da ni jedka za kožo:

- i) če je srednja vrednost TER, dobljena za preskusno kemikalijo, večja od (>) 5 k $\Omega$  ali
  - ii) če je srednja vrednost TER, dobljena za preskusno kemikalijo, manjša ali enaka ( $\leq$ ) 5 k $\Omega$  in
- če na kožnih ploščicah ni vidnih poškodb (npr. perforacije) ter

- je srednja vrednost vsebnosti barvila v kožni ploščici manjša ( $<$ ) od istočasno določene srednje vrednosti vsebnosti barvila v kožni ploščici iz pozitivne kontrole z 10-molarno HCl (za vrednosti pozitivne kontrole glej odstavek 30).

Za preskusno kemikalijo se šteje, da je jedka za kožo:

- i) če je srednja vrednost TER, dobljena za preskusno kemikalijo, manjša ali enaka ( $\leq$ ) 5 k $\Omega$  in so kožne ploščice vidno poškodovane (npr. perforirane) ali
  - ii) če je srednja vrednost TER, dobljena za preskusno kemikalijo, manjša ali enaka ( $\leq$ ) 5 k $\Omega$  in
- če na kožnih ploščicah ni vidnih poškodb (npr. perforacije), vendar
  - je srednja vrednost vsebnosti barvila v kožni ploščici večja ali enaka ( $\geq$ ) istočasno določeni srednji vrednosti vsebnosti barvila v kožni ploščici iz pozitivne kontrole z 10-molarno HCl (za vrednosti pozitivne kontrole glej odstavek 30).

33. Kadar je razvrstitev nedvoumna, bi moralo za preskusno kemikalijo zadoščati eno preskušanje (poskus), sestavljeno iz vsaj treh ponovljenih vzorcev kožnih ploščic. V primeru mejnih rezultatov, kot so neskladne ponovne meritve in/ali povprečni TER, enak  $5 \pm 0,5$  k $\Omega$ , je treba preučiti možnost izvedbe druge neodvisne ponovitve preskušanja (poskusa) in nato še tretje, če so rezultati prvih dveh ponovitev preskušanj (poskusov) neskladni.

## PODATKI IN POROČANJE

### Podatki

34. Vrednosti upornosti (k $\Omega$ ), in kadar je primerno, vrednosti vsebnosti barvila ( $\mu$ g/ploščico) za preskusno kemikalijo skupaj s podatki pozitivnih in negativnih kontrol je treba prikazati v obliki preglednice, vključno s podatki za vsak ponovljeni vzorec ploščice pri vsaki ponovitvi preskušanja (poskusa) in srednjimi vrednostmi  $\pm$  standardni odklon. Vse ponovljene poskuse je treba navesti. Za vsako preskusno kemikalijo je treba navesti opažene poškodbe kožnih ploščic.

### Poročilo o preskusu

35. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

*Preskusna kemikalija in kontrolne snovi:*

- snov iz ene sestavine: kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi: čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin;
- fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;
- vir, številka serije, če je na voljo;

- obdelava preskusnih/kontrolnih kemikalij pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, drobljenje);
- stabilnost preskusne kemikalije, rok uporabe ali datum za ponovno analizo, če je znan;
- pogoji skladiščenja.

*Preskusne živali:*

- uporabljeni sev in spol;
- starost živali, ko so bile uporabljene kot donorke;
- izvor, nastanitvene razmere, prehrana itd.;
- podrobnosti o pripravi kože.

*Preskusni pogoji:*

- umeritvene krivulje za preskusne aparature;
- umeritvene krivulje za izvedbo preskusa vezave barvila, filtrirana valovna dolžina, uporabljena za merjenje vrednosti optične gostote, in razpon linearnosti optične gostote merilne naprave (npr. spektrofotometra), če je primerno;
- podrobnosti o preskusnem postopku, uporabljenem za meritve TER;
- podrobnosti o preskusnem postopku, uporabljenem za oceno vezave barvila, če je primerno;
- uporabljeni preskusni odmerki, trajanje obdobja izpostavljenosti in temperature izpostavljenosti;
- podrobnosti o postopku spiranja, uporabljenem po obdobju izpostavljenosti;
- število ponovljenih vzorcev kožnih ploščic, uporabljenih na preskusno kemikalijo, in kontrol (pozitivnih in negativnih kontrol);
- opis morebitnih prilagoditev preskusnega postopka;
- navedba podatkov o modelu iz preteklih preskusov. To mora med drugim vključevati:
  - i) sprejemljivost vrednosti TER (v  $k\Omega$ ) za pozitivno in negativno kontrolo z navedbo mejnega uporna za pozitivne in negativne kontrole;
  - ii) sprejemljivost vrednosti vsebnosti barvila (v  $\mu\text{g}/\text{ploščico}$ ) za pozitivno in negativno kontrolo z navedbo mej vsebnosti barvila za pozitivno in negativno kontrolo;
  - iii) sprejemljivost rezultatov preskusov z navedbo variabilnosti med ponovljenimi vzorci kožnih ploščic v preteklih preskusih;
- opis uporabljenih meril za odločanje/uporabljenega napovednega modela.

*Rezultati:*

- preglednice s podatki iz preskusov TER in vezave barvila (če je ustrezno) za posamezne preskusne kemikalije in kontrole, za vsako ponovitev preskušanja (poskusa) in vsak ponovljeni

vzorec kožne ploščice (posamezne živali in posamezni vzorci kože), srednje vrednosti, standardni odkloni in koeficienti variacije;

- opis vseh opaženih učinkov;
- izpeljana razvrstitev z navedbo uporabljenega napovednega modela/meril za odločitev.

*Razprava o rezultatih*

*Sklepne ugotovitve*

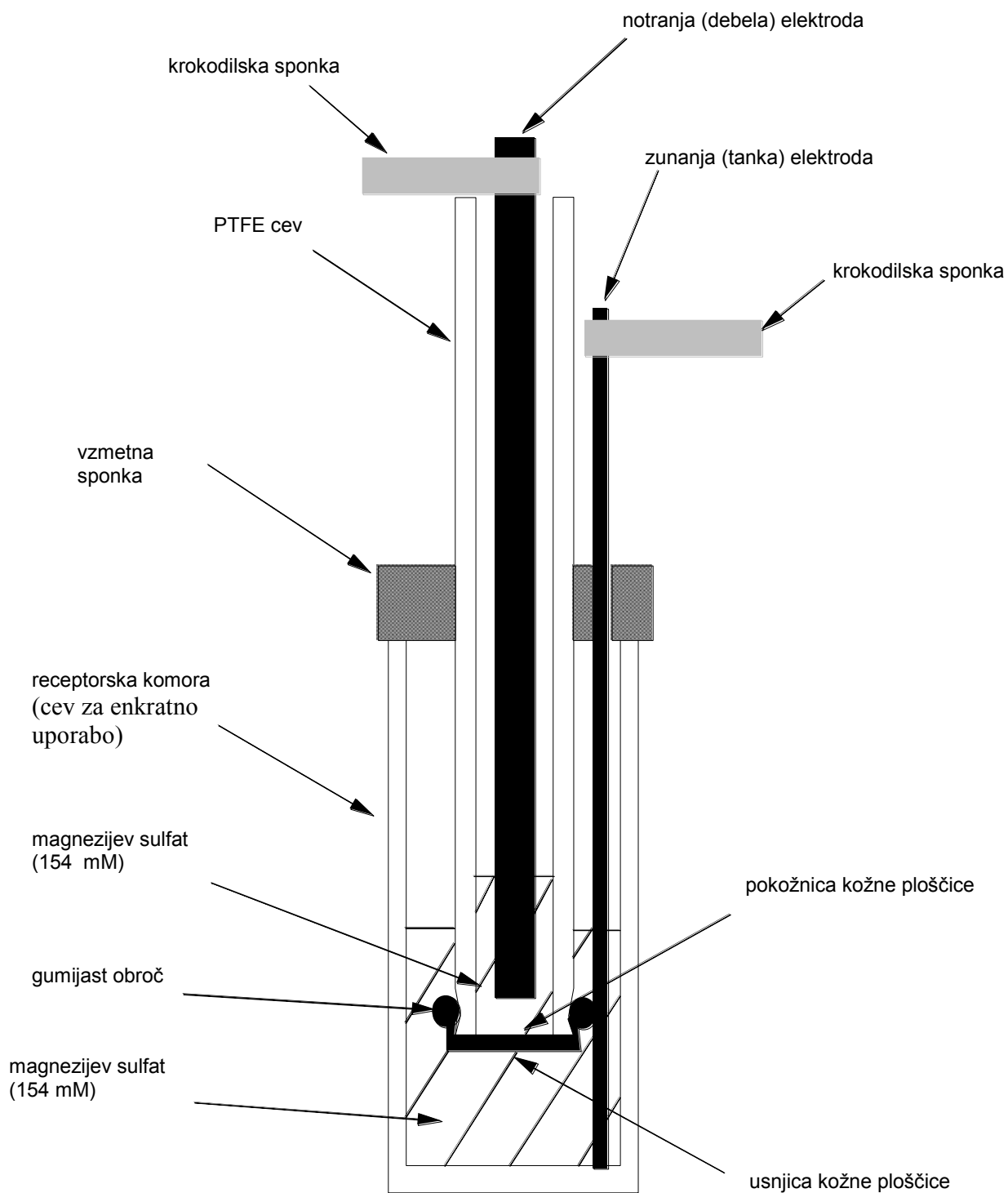
## VIRI

- (1) Združeni narodi (ZN) (2013). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS), druga revidirana izdaja, ZN New York in Ženeva, 2013. Na voljo na: [[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) Poglavje B.4 te priloge, Akutno draženje kože, jedkost za kožo.
- (3) Poglavje B.40a te priloge, Model kože *in vitro*.
- (4) Poglavje B.65 te priloge, Preskusna metoda membranske pregrade *in vitro*.
- (5) Poglavje B.46 te priloge, Draženje kože *in vitro*: preskusna metoda rekonstruirane človeške pokožnice.
- (6) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 203), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (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., in Balls, M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23, 219–255.
- (8) Barratt, M. D., Brantom, P. G., Fentem, J. H., Gerner, I., Walker, A. P., in Worth, A. P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.In Vitro* 12, 471–482.
- (9) Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J., Holzhütter, H.-G., in Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic.In Vitro* 12, 483–524.
- (10) Balls, M., Blaauboer, B. J., Fentem, J. H., Bruner, L., Combes, R. D., Ekwall, B., Fielder, R. J., Guillouzo, A., Lewis, R. W., Lovell, D. P., Reinhardt, C. A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., in Zucco, F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops. *ATLA* 23, 129–147.
- (11) ICCVAM (Medagencijski koordinacijski odbor ZDA za validacijo alternativnih metod). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test

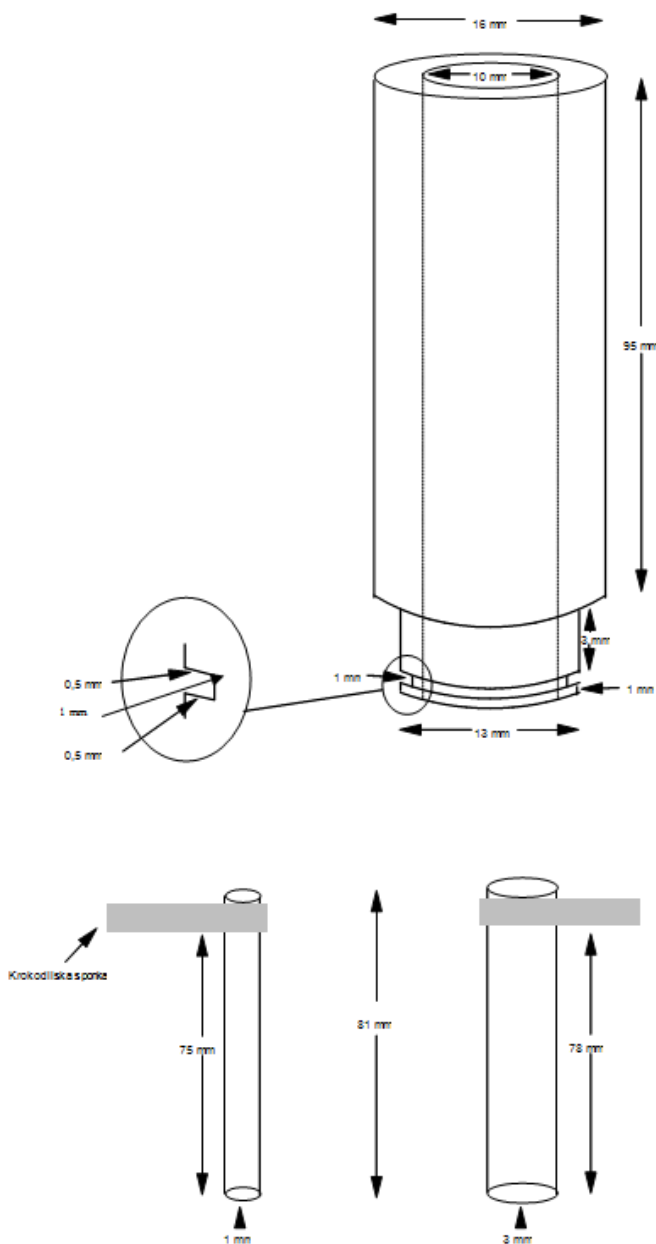
- Methods. Publikacija NIH št. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, ZDA.
- (12) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), izdal ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3. april 1998.
- (13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275–280.
- (14) ICCVAM (Medagencijski koordinacijski odbor ZDA za validacijo alternativnih metod) (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. Publikacija NIH št. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, ZDA.
- (15) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, št. 218. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (16) Oliver, G. J. A., Pemberton, M. A., in Rhodes, C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. *Fd. Chem. Toxicol.* 24, 507–512.
- (17) Botham, P. A., Hall, T. J., Dennett, R., McCall, J. C., Basketter, D. A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D. J., in Gardner, J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro*: Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol. In Vitro* 6, 191–194.
- (18) Eskes, C., Detappe, V., Koëter, H., Kreysa, J., Liebsch, M., Zuang, V., Amcoff, P., Barroso, J., Cotovio, J., Guest, R., Hermann, M., Hoffmann, S., Masson, P., Alépée, N., Arce, L. A., Brüscheweiler, B., Catone, T., Cihak, R., Clouzeau, J., D'Abrosca, F., Delveaux, C., Derouette, J. P., Engelking, O., Facchini, D., Fröhlicher, M., Hofmann, M., Hopf, N., Molinari, J., Oberli, A., Ott, M., Peter, R., Sá-Rocha, V. M., Schenk, D., Tomicic, C., Vanparys, P., Verdon, B., Wallenhorst, T., Winkler, G. C., in Depallens, O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: priporočila z delavnice. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 62, 393–403.
- (19) TER SOP (december 2008). *INVITTOX* Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.
- (20) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 34), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.



SLIKA 1: NAPRAVA ZA PRESKUS TER NA KOŽI PODGANE



**SLIKA 2: MERE UPORABLJENIH CEVI IZ POLITETRAFLUOROETILENA (PTFE), RECEPTORSKIH CEVI IN ELEKTROD**



**Ključni dejavniki zgoraj prikazane naprave:**

- Notranji premer PTFE-cevi,
- dolžina elektrod relativno na PTFE-cev in receptorsko cev, tako da se kožna ploščica ne dotika elektrod in da je v stiku z raztopino  $\text{MgSO}_4$  standardna dolžina elektrode,
- višina raztopine  $\text{MgSO}_4$  v receptorski cevki mora biti relativna na gladino raztopine v PTFE-cevi, kakor je prikazano na sliki 1,

- kožna ploščica mora biti v PTFE-cev dovolj dobro fiksirana, da je električni upor resnično merilo lastnosti kože.

## Dodatek

### OPREDELITVE POJMOV

**Točnost:** stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz ‚skladnost‘ se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravih rezultatov preskusne metode (20).

**J:** jedko.

**Kemikalija:** snov ali zmes.

**Skladnost:** je merilo učinkovitosti za preskusne metode, s katerimi se pridobijo kategorični rezultati, in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz točnost se včasih uporabljata kot sopomenki in pomenita delež vseh preskušanih kemikalij, ki so pravilno razvrščene kot pozitivne ali negativne. Skladnost je zelo odvisna od razširjenosti pozitivnih rezultatov v vrstah preučevane preskusne kemikalije (20).

**GHS (globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (ZN)):** sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudje (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (1).

**IATA:** Integrated Approach to Testing and Assessment (celostni pristop k testiranju in ocenjevanju).

**Zmes:** zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi.

**Snov iz ene sestavine:** snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je vsaj 80 mas. % glavne sestavine.

**Snov z več sestavinami:** snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je več glavnih sestavin s koncentracijo  $\geq 10$  mas. % in  $< 80$  mas. %. Snov z več sestavinami je rezultat proizvodnega postopka. Razlika med zmesjo in snovjo z več sestavinami je v tem, da je zmes pridobljena z mešanjem dveh ali več snovi brez kemične reakcije. Snov z več sestavinami je rezultat kemične reakcije.

**NJ:** nejedko.

**OD:** optična gostota.

**PC:** pozitivna kontrola: ponovljen vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s snovjo, za katero je znano, da povzroči pozitiven odziv. Za zagotovitev, da se lahko variabilnost odziva pozitivne kontrole oceni v daljšem časovnem obdobju, pa stopnja pozitivnega odziva ne sme biti prevelika.

**Standardi izvajanja (SI):** standardi, ki temeljijo na validirani preskusni metodi in so podlaga za oceno primerljivosti predlagane preskusne metode, ki je funkcijsko in mehanistično podobna. Vključujejo: (i) nujne elemente preskusne metode; (ii) najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij, izbranih iz skupine kemikalij, ki se uporabljajo za dokazovanje sprejemljive učinkovitosti validirane preskusne metode, ter (iii) podobne stopnje zanesljivosti in točnosti, ki temeljijo na rezultatih validirane preskusne metode, kar mora dokazati predlagana preskusna metoda pri ocenjevanju ob uporabi najkrajšega možnega seznama referenčnih kemikalij.

**Ustreznost:** opis razmerja med preskusno metodo in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere preskusna metoda pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Ustreznost upošteva tudi točnost (skladnost) preskusne metode (20).

**Zanesljivost:** stopnja obnovljivosti preskusne metode v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oцени se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih (20).

**Občutljivost:** delež vseh pozitivnih/aktivnih kemikalij, ki se s preskusno metodo pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (20).

**Jedkost za kožo *in vivo*:** nastanek nepovračljivih poškodb kože: zlasti vidnega odmiranja prek povrhnjice v usnjico po nanosu preskusne kemikalije za največ 4 ure. Za reakcije jedkosti so značilne razjede, krvavitve, krvave hraste in do konca 14-dnevnega opazovanja izguba barve zaradi beljenja kože, celi predeli alopecije in brazgotine. Dvoumne lezije je morda treba preiskati histopatološko.

**Specifičnost:** delež vseh negativnih/neaktivnih kemikalij, ki se s preskusno metodo pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (20).

**Snov:** kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo.

**Ponovitev (preskusa):** sočasno preskušanje iste preskusne kemikalije na vsaj treh ponovljenih vzorcih kožnih ploščic.

**Preskusna kemikalija:** vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

**Transkutana električna upornost (TER):** merilo električne impedance kože, ki je izražena kot upornost v kiloohmih. Preprosta in robustna metoda za ocenjevanje pregradne funkcije z evidentiranjem prehoda ionov preko kože z napravo z Wheatstonovim mostičem.

**UVCB:** snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.“



(6) Poglavje B.40bis dela B se nadomesti z naslednjim:

## **„B.40a JEDKOST ZA KOŽO *IN VITRO*: PRESKUSNA METODA REKONSTRUIRANE ČLOVEŠKE POKOŽNICE**

### **UVOD**

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 431 (2016). Jedkost za kožo pomeni nastanek nepovračljive poškodbe kože, ki se kaže kot vidno odmiranje prek povrhnjice v usnjico po nanosu preskusne kemikalije (kot je opredeljeno v globalno usklajenem sistemu Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN) (1) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (uredba CLP)<sup>1</sup>). Pri tej posodobljeni preskusni metodi B.40a se izvede postopek *in vitro*, ki omogoča opredelitev nejedkih in jedkih snovi in zmesi v skladu z GHS ZN in uredbo CLP. Omogoča tudi delno razvrstitev jedkih snovi v podkategorije.
2. Ocena potenciala kemikalij za povzročanje jedkosti za kožo se je običajno izvajala z uporabo laboratorijskih živali (preskusna metoda B.4, enakovredna Smernici OECD za preskušanje 404, ki je bila prvotno sprejeta leta 1981 ter revidirana v letih 1992, 2002 in 2015) (2). Poleg sedanje preskusne metode B.40a sta bili validirani še dve drugi preskusni metodi *in vitro* za preskušanje potenciala kemikalij za povzročanje jedkosti, ki sta bili sprejeti kot preskusna metoda B.40 (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 430) (3) in preskusna metoda B.65 (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 435) (4). Poleg tega je bila preskusna metoda *in vitro* B.46 (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 439) (5) sprejeta za preskušanje potenciala za draženje kože. V smernici OECD za celostne pristope k testiranju in ocenjevanju (IATA) v zvezi z jedkostjo za kožo in draženjem kože je opisanih več modulov, v katerih so zbrani viri informacij in orodja za analizo, zagotovljene smernice o tem, (i) kako obstoječe podatke, pridobljene s preskušanjem, in podatke, ki ne temeljijo na preskušanju, združiti in uporabiti pri ocenjevanju potenciala kemikalij za draženje kože in povzročanje jedkosti za kožo, (ii) predlagan pa je tudi pristop, kadar je potrebno dodatno preskušanje (6).
3. S to preskusno metodo se obravnava končna točka jedkost za kožo z vidika zdravja ljudi. Pri njej se uporablja rekonstruirana človeška pokožnica (pridobljena iz netransformiranih keratinocitov človeške pokožnice), ki ima zelo podobne histološke, morfološke, biokemijske in fiziološke značilnosti kot zgornji deli človeške kože, tj. pokožnica. Ustrezna smernica OECD za

---

<sup>1</sup> Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 13.12.2008, str. 1).

preskušanje je bila prvotno sprejeta leta 2004, leta 2013 je bila posodobljena zaradi vključitve dodatnih preskusnih metod z uporabo modelov rekonstruirane človeške pokožnice in možnosti uporabe metod za pomoč pri razvrščanju jedkih kemikalij v podkategorije, leta 2015 pa je bila posodobljena zaradi sklicevanja na dokument s smernicami IATA in uvedbe uporabe alternativnega postopka za merjenje viabilnosti.

4. V to preskusno metodo so vključeni štirje validirani, na trgu dostopni modeli rekonstruirane človeške pokožnice. Predvalidacijske študije (7), ki jim je sledila uradna validacijska študija za oceno jedkosti za kožo (8) (9) (10), so bile izvedene (11) (12) za dva od teh na trgu dostopnih preskusnih modelov, EpiSkin™ Standard Model (SM) in EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200) (v nadaljnjem besedilu: validirani referenčni metodi – VRM). Na podlagi rezultatov teh študij je bilo izdano priporočilo, da se lahko obe zgoraj navedeni metodi VRM uporabita za regulativne namene za razlikovanje med jedkimi (J) in nejedkimi (NJ) snovmi ter da se lahko model EpiSkin™ poleg tega uporablja kot pomoč pri razvrščanju jedkih snovi v podkategorije (13) (14) (15). Glede na validacijo na podlagi standardov izvajanja sta podobne rezultate kot VRM EpiDerm™ pokazala še dva druga na trgu dostopna modela rekonstruirane človeške pokožnice za preskušanje jedkosti za kožo *in vitro* (16) (17) (18). To sta SkinEthic™ RHE<sup>1</sup> in epiCS® (ki se je prej imenoval EST-1000), ki ju je prav tako mogoče uporabiti za regulativne namene za razlikovanje med jedkimi in nejedkimi snovmi (19) (20). S povalidacijskimi študijami, ki so jih proizvajalci modela rekonstruirane človeške pokožnice izvedli v obdobju 2012–2014 z izpopolnjenim protokolom za odpravo interferenc nespecifične redukcije MTT s preskusnimi kemikalijami, sta se izboljšali uspešnost razlikovanja med jedkimi in nejedkimi snovmi ter pomoč pri razvrščanju jedkih snovi v podkategorije (21) (22). Opravljene so bile dodatne statistične analize povalidacijskih podatkov, pridobljenih z modeli EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE in EpiCS®, da bi se opredelili alternativni napovedni modeli, s katerimi se je izboljšala napovedna zmožljivost za razvrstitev v podkategorije (23).
5. Preden se omogoči uporaba predlagane podobne ali spremenjene preskusne metode z rekonstruirano človeško pokožnico *in vitro* v zvezi z jedkostjo za kožo, ki ni VRM, za regulativne namene, je treba določiti njeno zanesljivost, ustreznost (točnost) in omejitve, kar zadeva predlagano uporabo, da se zagotovi njena podobnost z VRM v skladu s standardi izvajanja (24), navedenimi v skladu z načeli Smernic OECD 34 (25). Medsebojno priznavanje podatkov bo zagotovljeno šele, ko bo predlagana nova ali posodobljena preskusna metoda v skladu s standardi izvajanja pregledana in vključena v ustrezno smernico za preskušanje.

---

<sup>1</sup> Kratica RHE (= Reconstructed human Epidermis (rekonstruirana človeška pokožnica)) se uporablja za vse modele, ki temeljijo na tehnologiji rekonstruirane človeške pokožnice. Kratica RHE, kot se uporablja v povezavi z modelom SkinEthic™, pomeni isto, vendar je kot del imena te posebne preskusne metode, pod katerim se trži, navedena z velikimi črkami.

Preskusni modeli, vključeni v navedeno smernico za preskušanje, se lahko uporabijo za obravnavanje zahtev držav po rezultatih preskusov v zvezi s preskusno metodo *in vitro* za jedkost za kožo, hkrati pa se izkoristi medsebojno priznavanje podatkov.

## OPREDELITVE POJMOV

6. Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

## ZAČETNI PREUDARKI

7. Ta preskusna metoda omogoča opredelitev nejedkih in jedkih snovi ter zmesi v skladu z GHS ZN in uredbo CLP. Ta preskusna metoda dodatno pomaga pri razvrstitvi jedkih snovi in zmesi v neobvezno podkategorijo 1A v skladu z GHS ZN (1) ter kombinacijo podkategorij 1B in 1C (21) (22) (23). Omejitev te preskusne metode je, da ne omogoča razlikovanja med podkategorijo snovi, ki so jedke za kožo, 1B in podkategorijo 1C v skladu z GHS ZN in uredbo CLP zaradi omejenega nabora znanih kemikalij, ki so jedke *in vivo*, iz podkategorije 1C. Preskusne modele EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE in epiCS® je mogoče razvrstiti v podkategorije (tj. 1A, 1B ali 1C ali NJ).
8. V validacijski študiji v podporo preskusnim modelom, vključenim v to preskusno metodo, ko se uporabljajo za opredelitev nejedkih in jedkih snovi, je bil preskušen širok nabor kemikalij, ki večinoma predstavljajo posamezne snovi; v empirično zbirko podatkov validacijske študije je vključenih 60 kemikalij, ki zajemajo najrazličnejše kemijske razrede (8) (9) (10). Preskušanje za dokaz občutljivosti, specifičnosti in točnosti preskusa ter njegove obnovljivosti v laboratoriju za razvrstitev v podkategorije so izvedli raziskovalci, ki so razvili preskusno metodo, rezultate pa je pregledala OECD (21) (22) (23). Na podlagi vseh razpoložljivih podatkov se preskusna metoda uporablja za najrazličnejše kemijske razrede in agregatna stanja, vključno s tekočimi snovmi, poltrdnimi snovmi, trdnimi snovmi in voski. Tekoče snovi so lahko vodne raztopine ali ne, trdne snovi so lahko topne ali netopne v vodi. Če je mogoče, je treba trdne snovi pred nanosom zmleti v fin prah; druga predhodna obdelava vzorca ni potrebna. Kadar se lahko dokaže, da preskusnih modelov, vključenih v to preskusno metodo, za posamezno kategorijo preskusnih kemikalij ni mogoče uporabiti, se zanje ne smejo uporabljati. Poleg tega se predpostavlja, da se ta preskusna metoda uporablja za zmesi kot razširitev njene uporabe za snovi. Ker pa zmesi zajemajo širok spekter kategorij in sestave in ker so v zvezi s preskušanjem zmesi trenutno na voljo samo omejene informacije, se ta preskusna metoda v primerih, ko se lahko dokaže, da je ni mogoče uporabiti za posamezno kategorijo zmesi (npr. v skladu s strategijo, kot je predlagana v (26)), za to posamezno kategorijo zmesi ne sme uporabljati. Preden se preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni. Plini in aerosoli še niso bili ocenjeni v validacijskih študijah (8) (9) (10). Čeprav se lahko

preskusijo z uporabo tehnologije rekonstruirane človeške pokožnice, veljavna preskusna metoda ne dovoljuje preskušanja plinov in aerosolov.

9. Preskusne kemikalije, ki absorbirajo svetlobo v istem razponu kot formazan MTT, in preskusne kemikalije, ki lahko povzročijo neposredno redukcijo vitalnega barvila MTT (glede na formazan MTT), lahko vplivajo na meritve viabilnosti tkiva, zato je treba za popravke uporabiti prilagojene kontrole. Vrsta prilagojenih kontrol, ki so lahko potrebne, je odvisna od vrste interference, ki jo povzroča preskusna kemikalija, in postopka za merjenje formazana MTT (glej odstavke 25–31).
10. Čeprav ta preskusna metoda ne prinaša ustreznih informacij o draženju kože, je treba opozoriti, da se s preskusno metodo B.46 izrecno obravnava učinek draženja kože *in vitro* na zdravje in temelji na istem sistemu rekonstruirane človeške pokožnice, čeprav uporablja drug protokol (5). Za popolno vrednotenje lokalnih učinkov na kožo po enkratni izpostavljenosti kože je treba uporabiti dokument s smernico OECD v zvezi s celostnimi pristopi k testiranju in ocenjevanju (IATA) (6). Ta pristop IATA vključuje opravljanje preskusov jedkosti za kožo *in vitro* (kot je opisano v tej preskusni metodi) in preskusov draženja kože pred preskušanjem na živih živalih. Razumljivo je, da se pri uporabi človeške kože upoštevajo nacionalna in mednarodna etična načela in pogoji.

## NAČELO PRESKUSA

11. Preskusna kemikalija se lokalno nanese na tridimenzionalni model rekonstruirane človeške pokožnice, ki vključuje netransformirane keratinocite pokožnice iz človeškega tkiva, gojene za večplastni, zelo raznolik model človeške pokožnice. Sestavljajo ga organizirane bazalne, spinalne in zrnate plasti ter večplastna rožena plast, ki vključuje medcelične lamelarne maščobne plasti, ki predstavljajo glavne razrede maščob in so podobni strukturi *in vivo*.
12. Preskusna metoda z rekonstruirano človeško pokožnico temelji na predpostavki, da lahko jedke kemikalije prodrejo v roženo plast z difuzijo ali erozijo in so citotoksične za spodaj ležeče plasti celic. Viabilnost celic se meri z encimsko pretvorbo vitalnega barvila MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid, tiazolil modro tetrazol bromid; številka CAS 298–93-1) v soli modrega formazana, katere količina se izmeri po ekstrakciji iz tkiv (27). Jedke kemikalije se opredelijo glede na njihovo zmožnost zmanjšanja viabilnosti celic pod opredeljene vrednosti praga (glej odstavka 35 in 36). Preskusna metoda jedkosti za kožo, ki temelji na rekonstruirani človeški pokožnici, je pokazala, da lahko pri kuncih napove učinke jedkosti za kožo *in vivo* v skladu s preskusno metodo B.4 (2).

## DOKAZOVANJE USPOSOBLJENOSTI

13. Pred redno uporabo katerega koli od štirih validiranih preskusnih modelov rekonstruirane človeške pokožnice, ki izpolnjujejo zahteve te preskusne metode, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost tako, da pravilno razvrstijo 12 snovi za preverjanje usposobljenosti,

navedenih v preglednici 1. Če se uporabi metoda za razvrščanje v podkategorije, je treba dokazati tudi pravilno razvrščanje v podkategorije. V primerih, ko snov s seznama ni na voljo ali ko je to utemeljeno, se lahko uporabi druga snov, za katero so na voljo ustrezni referenčni podatki *in vivo* in *in vitro* (npr. s seznama referenčnih kemikalij (24)), če se uporabijo enaka merila za izbor, kot so opisana v preglednici 1.

**Preglednica 1:** Seznam snovi za preverjanje usposobljenosti<sup>1</sup>

Snov	Št. CAS	Kemijski razred <sup>2</sup>	Kat. po GHS ZN/uredbi CLP na podlagi rezultatov <i>in vitro</i> <sup>4</sup>	VRM Kat. na podlagi rezultatov <i>in vitro</i> <sup>4</sup>	Snov, ki zmanjšuje MTT <sup>5</sup>	Agregatno stanje
<b>Podkategorija 1A za jedke snovi <i>in vivo</i></b>						
Bromoocetna kislina	79-08-3	organska kislina	1A	(3) 1A	--	trdno
Borov trifluorid dihidrat	13319-75-0	anorganska kislina	1A	(3) 1A	--	tekoče
Fenol	108-95-2	fenol	1A	(3) 1A	--	trdno
Dikloroacetil klorid	79-36-7	elektrofil	1A	(3) 1A	--	tekoče
<b>Kombinacija podkategorij 1B in 1C za jedke snovi <i>in vivo</i></b>						
Monohidrat glioksilne kisline	563-96-2	organska kislina	1B in 1C	(3) 1B in 1C	--	trdno
Mlečna kislina	598-82-3	organska kislina	1B in 1C	(3) 1B in 1C	--	tekoče
Etanolamin	141-43-5	organska baza	1B	(3) 1B in 1C	da	viskozno
Klorovodikova kislina (14,4 %)	7647-01-0	anorganska kislina	1B in 1C	(3) 1B in 1C	--	tekoče
<b>Nejedke snovi <i>in vivo</i></b>						
Fenetil bromid	103-63-9	elektrofil	NJ	(3) NJ	da	tekoče
4-amino-1,2,4-triazol	584-13-4	organska baza	NJ	(3) NJ	--	trdno
4-(metiltio)-benzaldehyd	3446-89-7	elektrofil	NJ	(3) NJ	da	tekoče
Lavrinska kislina	143-07-7	organska kislina	NJ	(3) NJ	--	trdno

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS); VRM = validirana referenčna metoda; NJ = ni jedko.

<sup>1</sup> Snovi za preverjanje usposobljenosti, ki so najprej razvrščene na jedke in nejedke, nato po podkategoriji jedkosti in nazadnje po kemijskem razredu, so bile izbrane med snovmi, uporabljenimi pri validacijskih študijah ECVAM EpiSkin™ in EpiDerm™ (8) (9) (10), in med povalidacijskimi študijami, temelječimi na podatkih raziskovalcev, ki so razvili EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ in epiCS® (23). Če ni navedeno drugače, so se snovi preskusile pri stopnji čistosti, pri kateri so bile kupljene od komercialnega vira (8) (10). Kolikor je bilo mogoče, so bile v izbor vključene snovi, ki: (i) predstavljajo razpon odzivov jedkosti (npr. snovi, ki niso jedke; snovi, ki so od blago do močno jedke), ki jih je mogoče izmeriti ali napovedati z VRM; (ii) predstavljajo kemijske razrede, uporabljene v validacijskih študijah; (iii) imajo dobro opredeljene kemijske strukture; (iv) povzročajo obnovljive rezultate v VRM; (v) dajejo dokončne rezultate pri referenčni preskusni metodi *in vivo*; (vi) so razpoložljive na trgu in (vii) niso povezane s previsokimi stroški odstranjevanja.

<sup>2</sup> Kemijski razred, dodeljen po Barrattu *et al.* (8).

<sup>3</sup> Ustrezne embalažne skupine ZN so I, II in III za 1A, 1B oziroma 1C po GHS ZN/uredbi CLP.

<sup>4</sup> Napovedi VRM *in vitro*, navedene v tej preglednici, so bile dobljene s preskusnima modeloma EpiSkin™ in EpiDerm™ (VRM) med povalidacijskim preskušanjem, ki so ga izvedli razvijalci preskusne metode.

<sup>5</sup> Vrednosti viabilnosti, dobljene pri validacijskih študijah jedkosti za kožo Evropskega centa za validacijo alternativnih metod (ECVAM), niso bile popravljene za neposredno redukcijo MTT (v validacijskih študijah niso bile izvedene odmrle kontrole). Vendar so bili povalidacijski podatki, ki so jih zagotovili razvijalci preskusne metode in so predstavljeni v tej preglednici, dobljeni s prilagojenimi kontrolami (23).

14. V okviru dokazovanja usposobljenosti se priporoča, da uporabnik po prejetju preveri pregrado tkiv, kakor to določa proizvajalec modela rekonstruirane človeške pokožnice. To je zlasti pomembno, če tkiva potujejo na dolge razdalje/dalj časa. Potem ko je preskusna metoda uspešno vzpostavljena in je dokazana usposobljenost glede njene uporabe, redno preverjanje tkiv ni več potrebno. Vendar je priporočljivo, da se ob redni uporabi metode še naprej ocenjujejo značilnosti pregrade tkiv v rednih časovnih razmikih.

## POSTOPEK

15. V nadaljevanju so na splošno opisani elementi in postopki preskusnih modelov rekonstruirane človeške pokožnice za ocenjevanje jedkosti za kožo, zajetih s to preskusno metodo. Modele rekonstruirane človeške pokožnice, potrjene kot znanstveno veljavne za uporabo v okviru te preskusne metode, in sicer modele EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE in epiCS® (16) (17) (19) (28) (29) (30) (31) (32) (33), je mogoče dobiti od komercialnih virov. Za te štiri modele rekonstruirane človeške pokožnice so na voljo standardni delovni postopki (34) (35) (36) (37), njihovi glavni elementi preskusne metode pa so povzeti v Dodatku 2. Priporočljivo je, da se pri izvajanju in uporabi enega od teh modelov v laboratoriju preveri ustreznost standardni delovni postopek. Preskušanje s štirimi preskusnimi modeli rekonstruirane človeške pokožnice, zajetimi s to preskusno metodo, se mora izvajati v skladu z zahtevami, navedenimi v nadaljevanju.

## ELEMENTI PRESKUSNE METODE REKONSTRUIRANE ČLOVEŠKE POKOŽNICE

### Splošni pogoji

16. Za rekonstrukcijo epitelija se uporabijo netransformirani človeški keratinociti. Pod funkcionalno roženo plastjo je več slojev živih epiteljskih celic (bazalna plast, trnasta plast, zrnata plast). Rožena plast mora biti razdeljena na več plasti in vsebovati lipidni profil za močno funkcionalno pregrado za zaustavitev hitre penetracije primerjalnih kemikalij citotoksičnosti, npr. natrijevega dodecil sulfata (SDS) ali Tritona X-100. Pregradna funkcija mora biti dokazana in se lahko oceni z določitvijo koncentracije, pri kateri se zaradi primerjalne kemikalije po določenem času izpostavljenosti zmanjša viabilnost tkiv za 50 % (IC<sub>50</sub>), ali z določitvijo časa izpostavljenosti, ki je potreben za zmanjšanje viabilnosti celic za 50 % (ET<sub>50</sub>) po nanosu določene stalne koncentracije primerjalne kemikalije (glej odstavek 18). Zadrževalne značilnosti modela rekonstruirane človeške pokožnice morajo preprečevati prehod materiala

okoli rožene plasti v živo tkivo, kar bi preprečilo učinkovitost modelov za raziskovanje v zvezi z izpostavljenostjo kože. V modelu rekonstruirane človeške pokožnice ne sme biti bakterij, virusov, mikoplazme ali gliv.

## Pogoji za funkcionalnost

### *Viabilnost*

17. Analiza, ki se uporablja za kvantifikacijo viabilnosti tkiva, je analiza MTT (27). Viabilne celice konstrukcije tkiva rekonstruirane človeške pokožnice reducirajo vitalno barvilo MTT v oborino modrega formazana MTT, ki se nato ekstrahira iz tkiva z uporabo izopropanola (ali podobnega topila). Optična gostota (OD) izvlečka ekstrakcijskega topila mora biti dovolj majhna, tj.  $OD < 0,1$ . Ekstrahirani formazan MTT se lahko kvantitativno določi bodisi z uporabo meritve standardne absorbance (OD) bodisi z uporabo postopka spektrofotometrije HPLC/UPLC (38). Uporabniki modela rekonstruirane človeške pokožnice morajo zagotoviti, da vsaka serija zadevnega modela izpolnjuje merila, določena za negativno kontrolo. Razpon sprejemljivosti (zgornja in spodnja meja) za vrednosti optične gostote pri negativni kontroli mora določiti razvijalec/dobavitelj modela rekonstruirane človeške pokožnice. Razponi sprejemljivosti za vrednosti optične gostote pri negativni kontroli za štiri validirane preskusne modele rekonstruirane človeške pokožnice, vključene v to preskusno metodo, so navedeni v preglednici 2. Uporabnik spektrofotometrije HPLC/UPLC mora razpone optične gostote pri negativni kontroli, navedene v preglednici 2, uporabiti kot merilo za sprejemljivost negativne kontrole. Evidentirati je treba, da je negativno kontrolno tkivo, kar zadeva celične kulture, v obdobju izpostavljenosti stabilno (meritve optične gostote so podobne).

**Preglednica 2:** Razponi sprejemljivosti za vrednosti optične gostote pri negativni kontroli za kontrolo kakovosti serije

	<b>Spodnja meja</b>	<b>Zgornja meja</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

### *Pregradna funkcija*

18. Rožena plast in njena maščobna sestava morata zadostovati za zaustavitev hitre penetracije nekaterih citotoksičnih primerjalnih kemikalij, npr. SDS ali Tritona X-100, kot se ocenjuje z  $IC_{50}$  ali  $ET_{50}$  (preglednica 3). Pregradno funkcijo vsake serije uporabljenega modela rekonstruirane človeške pokožnice mora dokazati razvijalec/prodajalec zadevnega modela ob dobavi tkiv končnemu uporabniku (glej odstavek 21).

### *Morfologija*

19. Opravljen mora biti histološki pregled modela rekonstruirane človeške pokožnice za prikaz večplastne strukture, podobne človeški pokožnici, ki vključuje bazalno plast, trnasto plast, zrnato plast in roženo plast ter ima podoben lipidni profil kot človeška pokožnica. Histološki pregled vsake serije uporabljenega modela rekonstruirane človeške pokožnice, s katerim se dokaže ustrezna morfologija tkiv, mora zagotoviti razvijalec/prodajalec zadevnega modela ob dobavi tkiv končnemu uporabniku (glej odstavek 21).

#### Obnovljivost

20. Uporabniki preskusnih metod morajo dokazati obnovljivost preskusnih metod v daljšem časovnem obdobju s pozitivnimi in negativnimi kontrolami. Poleg tega se lahko preskusna metoda uporabi samo, če razvijalec/dobavitelj modela rekonstruirane človeške pokožnice zagotovi podatke, ki dokazujejo obnovljivost v daljšem časovnem obdobju z jedkimi in nejedkimi kemikalijami, na primer s seznama snovi za preverjanje usposobljenosti (preglednica 1). Če se preskusna metoda uporabi za razvrščanje v podkategorije, je treba dokazati tudi obnovljivost v zvezi z razvrščanjem v podkategorije.

#### Kontrola kakovosti

21. Model rekonstruirane človeške pokožnice se lahko uporabi samo, če razvijalec/dobavitelj dokaže, da vsaka serija zadevnega modela izpolnjuje opredeljena merila za sprostitev proizvodnje, med katerimi so najpomembnejša merila za *viabilnost* (odstavek 17), *pregradno funkcijo* (odstavek 18) in *morfologijo* (odstavek 19). Ti podatki se zagotovijo uporabnikom preskusne metode, da lahko te informacije vključijo v poročilo o preskusu. Za zanesljivo napoved razvrstitve med jedke snovi se lahko štejejo le rezultati, doseženi s tkivi iz serij, potrjenih s kontrolo kakovosti. Razpon sprejemljivosti (zgornja in spodnja meja) za IC50 ali ET50 določi razvijalec/dobavitelj modela rekonstruirane človeške pokožnice. Razponi sprejemljivosti za štiri validirane preskusne modele so navedeni v preglednici 3.

**Preglednica 3:** Merila za kontrolo kakovosti ob sprostitvi serij

	<b>Spodnja meja</b>	<b>Zgornja meja</b>
<b>EpiSkin™ (SM)</b> (18-urno tretiranje s SDS) (33)	IC <sub>50</sub> = 1,0 mg/ml	IC <sub>50</sub> = 3,0 mg/ml
<b>EpiDerm™ SCT (EPI-200)</b> (1-odstotni Triton X-100) (34)	ET50 = 4,0 ure	ET50 = 8,7 ure
<b>SkinEthic™ RHE</b> (1-odstotni Triton X-100) (35)	ET50 = 4,0 ure	ET50 = 10,0 ure
<b>epiCS®</b> (1-odstotni Triton X-100) (36)	ET50 = 2,0 ure	ET50 = 7,0 ure

### Nanos preskusne kemikalije in kontrolnih kemikalij

22. Za vsako preskusno kemikalijo in kontrole je treba za vsak čas izpostavljenosti uporabiti vsaj dva ponovljena vzorca tkiva. Za tekoče in trdne kemikalije je treba nanesti zadostno količino preskusne kemikalije, da se površina pokožnice enakomerno prekrije, pri čemer mora biti odmerek natančno določen, tj. najmanj  $70 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  ali  $30 \text{ mg}/\text{cm}^2$ . Odvisno od modela je treba za boljši stik med preskusno kemikalijo in površino pokožnice pred nanosom trdnih kemikalij površino pokožnice navlažiti z deionizirano ali destilirano vodo (34) (35) (36) (37). Če je mogoče, je treba trdne snovi preskusiti v obliki finega prahu. Metoda nanosa mora biti primerna glede na preskusno kemikalijo (glej npr. reference (34–37)). Ob koncu časa izpostavljenosti je treba preskusno kemikalijo skrbno sprati s pokožnice z vodnim pufrom ali 0,9-odstotnim NaCl. Odvisno od tega, kateri od štirih validiranih preskusnih modelov rekonstruirane človeške pokožnice se uporabi, se za vsako preskusno kemikalijo uporabita dve ali tri obdobja izpostavljenosti (za vse štiri ustrezne modele rekonstruirane človeške pokožnice: 3 minute in 1 ura; za model EpiSkin<sup>TM</sup> dodatni čas izpostavljenosti traja 4 ure). Glede na uporabljeni preskusni model rekonstruirane človeške pokožnice in ocenjevano obdobje izpostavljenosti lahko inkubacijska temperatura znaša od sobne temperature do  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .
23. Pri vsaki ponovitvi je treba uporabiti sočasno negativno in pozitivno kontrolo (PC), da se dokaže, da so viabilnost celic (z negativnimi kontrolami), pregradna funkcija in posledična občutljivost tkiva (s PC) v okviru opredeljenega območja sprejemljivosti iz preteklih preskusov. Predlagana kemikalija za pozitivno kontrolo je ledocetna kislina ali 8-normalni KOH, odvisno od uporabljenega modela rekonstruirane človeške pokožnice. Opozoriti je treba, da je 8-normalni KOH snov, ki neposredno zmanjšuje MTT in ki lahko zahteva prilagojene kontrole, kot je opisano v odstavkih 25 in 26. Predlagani negativni kontroli sta 0,9-odstotni NaCl ali voda.

### Meritve viabilnosti celic

24. Analizo MTT, ki je kvantitativna analiza, je treba v okviru te preskusne metode uporabljati za merjenje viabilnosti celic (27). Vzorec tkiva se za 3 ure potopi v ustrezno koncentracijo raztopine MTT (npr. 0,3 ali 1 mg/ml). S topilom (npr. izopropanolom, kislim izopropanolom) se izvleče oborina modrega formazana, potem pa se koncentracija formazana izmeri tako, da se določi optična gostota pri valovni dolžini 570 nm z uporabo filtrirane valovne dolžine največ  $\pm 30 \text{ nm}$ , ali z uporabo postopka spektrofotometrije HPLC/UPLC (glej odstavka 30 in 31) (38).
25. Preskusne kemikalije lahko vplivajo na analizo MTT ali z neposredno redukcijo MTT v modri formazan in/ali z barvno interferenco, če preskusna kemikalija naravno ali zaradi postopkov tretiranja absorbira v istem razponu optične gostote formazana ( $570 \pm 30 \text{ nm}$ , predvsem modre in vijoličaste kemikalije). Dodatne kontrole je treba uporabiti, da se zazna in popravi morebitno vplivanje teh preskusnih kemikalij, kot sta kontrola z nespecifično redukcijo MTT (NSMTT) in kontrola z nespecifično barvo (NSC) (glej odstavke od 26 do 30). To je še zlasti pomembno, če se določena preskusna kemikalija z izpiranjem s tkiva ne odstrani v celoti ali če prodre v pokožnico, tako da je med preskusom viabilnosti MTT prisotna v tkivu. Za podrobnejši opis

načina popravka neposredne redukcije MTT in vpliva barvil glej standardne delovne postopke za preskusne modele (34) (35) (36) (37).

26. Za opredelitev snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, je treba vsako preskusno kemikalijo dodati sveže pripravljenemu mediju MTT (34) (35) (36) (37). Če se zmes MTT, ki vsebuje preskusno kemikalijo, obarva modro/vijolično, se šteje, da preskusna kemikalija neposredno zmanjšuje MTT, zato je treba izvesti dodatno funkcionalno preverjanje na neviabilni pokožnici, in to neodvisno od uporabe meritve standardne absorbance (OD) ali postopka spektrofotometrije HPLC/UPLC. Pri tem dodatnem funkcionalnem preverjanju se uporabijo odmrla tkiva, ki imajo samo rezidualno presnovno aktivnost, vendar absorbirajo podobno količino preskusne kemikalije kot viabilna tkiva. Vsaka kemikalija, ki zmanjšuje MTT, se nanese na vsaj dva dvojnika odmrla tkiva za vsak čas izpostavljenosti, nato se na teh dvojniki opravi celoten preskus jedkosti za kožo. Dejanska viabilnost tkiva se nato izračuna kot delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi snovi, ki zmanjšuje MTT, od katerega se odšteje delež nespecifične redukcije MTT, dobljen z odmrlimi tkivi, izpostavljenimi isti snovi, ki zmanjšuje MTT, izračunan glede na negativno kontrolo, izvedeno sočasno s preskusom, ki se popravlja (% NSMTT).
27. Za opredelitev morebitnega vplivanja obarvanih preskusnih kemikalij ali preskusnih kemikalij, ki so se obarvale v stiku z vodo ali izopropanolom, in odločitev, ali so potrebne dodatne kontrole, je treba opraviti spektralno analizo preskusne kemikalije v vodi (okolje med izpostavljenostjo) in/ali izopropanolu (raztopina za ekstrahiranje). Če preskusna kemikalija v vodi in/ali izopropanolu absorbira svetlobo v razponu  $570 \pm 30$  nm, je treba izvesti dodatne kontrole z barvilom ali pa uporabiti postopek spektrofotometrije HPLC/UPLC, pri čemer v tem primeru te kontrole niso potrebne (glej odstavka 30 in 31). Pri izvajanju meritve standardne absorbance (OD) se vsaka moteča obarvana preskusna kemikalija nanese na vsaj dva ponovljena vzorca viabilnega tkiva za vsak čas izpostavljenosti, nato se na teh ponovljenih vzorcih izvede celoten preskus jedkosti za kožo, vendar se v fazi inkubacije MTT inkubirata z medijem namesto z raztopino MTT, da se ustvari kontrola z nespecifično barvo (NSC<sub>živo</sub>). Kontrolo z nespecifično barvo (NSC<sub>živo</sub>) je treba zaradi inherentne biološke variabilnosti živih tkiv izvesti sočasno za vsak čas izpostavljenosti za vsako obarvano preskusno kemikalijo (pri vsaki ponovitvi). Dejanska viabilnost tkiva se nato izračuna kot delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi moteči preskusni kemikaliji in inkubiranimi z raztopino MTT, od katerega se odšteje delež nespecifične barve, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi moteči preskusni kemikaliji in inkubiranimi z medijem brez MTT, pri čemer se ta preskus izvede sočasno s preskusom, ki se popravlja (% NSC<sub>živo</sub>).
28. Pri preskusnih kemikalijah, za katere je ugotovljeno, da neposredno zmanjšujejo MTT (glej odstavek 26) in povzročajo barvno interferenco (glej odstavek 27), je potreben tudi tretji niz kontrol poleg NSMTT in NSC<sub>živo</sub>, opisanih v prejšnjih odstavkih, ko se izvaja meritev standardne absorbance (OD). To po navadi velja za temno obarvane preskusne kemikalije, ki motijo analizo MTT (npr. modre, vijoličaste, črne), ker njihova lastna barva ovira oceno

njihove zmožnosti za neposredno redukcijo MTT, kot je opisana v odstavku 26. Te preskusne kemikalije se lahko vežejo na živa in odmrta tkiva, zato se s kontrolo NSMTT ne le popravi potencialna neposredna redukcija MTT zaradi preskusne kemikalije, ampak tudi barvna interferenca, ki nastane zaradi vezave preskusne kemikalije na odmrta tkiva. To bi lahko vodilo do dvojnega popravka barvne interference, saj se s kontrolo NSC<sub>živo</sub> že popravi barvna interferenca, ki jo povzroča vezava preskusne kemikalije na živa tkiva. Za preprečitev morebitnega dvojnega popravka barvne interference je treba izvesti še tretjo kontrolo za nespecifično barvo v odmrlih tkivih (NSC<sub>odmrlo</sub>). Pri tej dodatni kontroli se preskusna kemikalija nanese na vsaj dva ponovljena vzorca odmrlega tkiva za vsak čas izpostavljenosti, nato pa se na teh ponovljenih vzorcih izvede celoten postopek preskušanja, pri čemer pa se v fazi inkubacije MTT inkubirajo z medijem namesto z raztopino MTT. Za vsako preskusno kemikalijo zadostuje ena sama kontrola NSC<sub>odmrlo</sub> ne glede na število izvedenih neodvisnih preskusov/ponovitev, vendar jo je treba izvesti sočasno s kontrolo NSMTT in po možnosti z isto serijo tkiva. Dejanska viabilnost tkiva se nato izračuna kot delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi preskusni kemikaliji, od katerega se odštejeta % NSMTT in % NSC<sub>živo</sub>, prišteje pa se mu delež nespecifične barve, dobljen z odmrli tkivi, izpostavljenimi moteči preskusni kemikaliji in inkubiranimi z medijem brez MTT, izračunan glede na negativno kontrolo, izvedeno sočasno s preskusom, ki se popravlja (% NSC<sub>odmrlo</sub>).

29. Pomembno je poudariti, da se lahko zaradi nespecifične redukcije MTT in nespecifičnih barvnih interferenc povečajo odčitki izvlečka tkiva nad razponom linearnosti spektrofotometra. Na tej podlagi mora vsak laboratorij najprej določiti razpon linearnosti svojega spektrofotometra s formazanom MTT (št. CAS 57360-69-7) iz komercialnega vira, šele nato lahko začne preskušanje preskusnih kemikalij za regulativne namene. Natančneje, meritev standardne absorbance (OD) z uporabo spektrofotometra je ustrezna za oceno preskusnih kemikalij, ki neposredno zmanjšujejo MTT in povzročajo barvno interferenco, ko so optične gostote izvlečkov tkiv, dobljene s preskusno kemikalijo brez kakršnega koli popravka za neposredno redukcijo MTT in/ali barvno interferenco, znotraj linearnega razpona spektrofotometra ali ko nepopravljeni delež viabilnosti, dobljen s preskusno kemikalijo, to že opredeljuje kot jedko (glej odstavka 35 in 36). Vendar je treba rezultate za preskusne kemikalije, ki povzročajo % NSMTT in/ali % NSC<sub>živo</sub> > 50 % negativne kontrole, obravnavati previdno.
30. Za obarvane preskusne kemikalije, ki zaradi premočnega vplivanja na analizo MTT niso združljive z meritvijo standardne absorbance (OD), se lahko uporabi alternativni postopek spektrofotometrije HPLC/UPLC za merjenje formazana MTT (glej odstavek 31) (37). Sistem spektrofotometrije HPLC/UPLC omogoča, da se formazan MTT loči od preskusne kemikalije pred njegovo kvantifikacijo (38). Iz tega razloga kontrole NSC<sub>živo</sub> ali NSC<sub>odmrlo</sub> pri uporabi spektrofotometrije HPLC/UPLC niso nikoli potrebne, in to ne glede na to, katera kemikalija se preskuša. Kljub temu je treba kontrole NSMTT uporabiti v primeru suma, da preskusna kemikalija neposredno zmanjšuje MTT ali da njena barva ovira oceno sposobnosti za neposredno redukcijo MTT (kot je opisano v odstavku 26). Kadar se za merjenje formazana

MTT uporabi spektrofotometrija HPLC/UPLC, se delež viabilnosti tkiva izračuna kot razmerje med površino vrha formazana MTT, dobljeno z živimi tkivi, izpostavljenimi preskusni kemikaliji, in površino vrha formazana MTT, dobljeno s sočasno negativno kontrolo. Za preskusne kemikalije, ki lahko neposredno zmanjšajo MTT, se dejanska viabilnost tkiva izračuna kot delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi preskusni kemikaliji, od katerega se odšteje % NSMTT. Nazadnje, opozoriti je treba, da snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT in lahko povzročijo tudi barvno interferenco ter ki ostanejo v tkivih po tretiranju in zmanjšujejo MTT tako močno, da optične gostote (z uporabo standardne meritve optične gostote) ali površine vrha (z uporabo spektrofotometrije UPLC/HPLC) preskušanih izvlečkov tkiv, ki presegajo razpon linearnosti spektrofotometra, ni mogoče oceniti, čeprav naj bi se to zgodilo samo v zelo redkih primerih.

31. Spektrofotometrija HPLC/UPLC se lahko uporabi tudi z vsemi vrstami preskusnih kemikalij (obarvanimi, neobarvanimi, kemikalijami, ki zmanjšujejo MTT, in tistimi, ki ne zmanjšujejo MTT) za merjenje formazana MTT (38). Zaradi raznovrstnosti sistemov spektrofotometrije HPLC/UPLC je treba ustreznost sistema spektrofotometrije HPLC/UPLC dokazati pred njegovo uporabo za kvantifikacijo formazana MTT iz izvlečkov tkiv, tako da izpolnjuje merila za sprejemljivost za niz standardnih parametrov ustreznosti na podlagi tistih, ki so opisani v smernicah ameriške uprave za hrano in zdravila za industrijo (U.S. Food and Drug Administration) v zvezi z bioanalitično metodo validacije (38) (39). Ti ključni parametri in njihova merila za sprejemljivost so prikazani v Dodatku 4. Ko so izpolnjena merila za sprejemljivost, opredeljena v Dodatku 4, se sistem spektrofotometrije HPLC/UPLC šteje za ustrezen in je pripravljen za merjenje formazana MTT v poskusnih pogojih, opisanih v tej preskusni metodi.

### **Merila za sprejemljivost**

32. Za vsako preskusno metodo, pri kateri se uporabljajo veljavni modeli rekonstruirane človeške pokožnice, morajo negativna kontrolna tkiva izražati optično gostoto, iz katere je razvidna kakovost tkiv, kot je opisana v preglednici 2 in ki ne sme biti nižja od mej, določenih s preteklimi preskusi. Iz tkiv, tretiranih s pozitivno kontrolo, tj. ledocetno kislino ali 8-normalnim KOH, mora biti razvidna sposobnost tkiv, da se odzovejo na jedko kemikalijo v pogojih preskusnega modela (glej Dodatek 2). Variabilnost med ponovljenimi vzorci tkiv preskusne kemikalije in/ali kontrolnih kemikalij mora biti znotraj sprejemljivih mej za zahteve vsakega ustreznega modela rekonstruirane človeške pokožnice (glej Dodatek 2) (npr. razlika v viabilnosti med dvema ponovljenim vzorcema tkiva ne sme presegati 30 %). Če negativna ali pozitivna kontrola, vključena v ponovitev, ni znotraj sprejemljivih razponov, se ponovitev šteje za neveljavno in jo je treba ponoviti. Če je variabilnost preskusnih kemikalij zunaj opredeljenega razpona, je treba njeno preskušanje ponoviti.

### **Razlaga rezultatov in napovedni model**

33. Vrednosti optične gostote, pridobljene za vsako preskusno kemikalijo, je treba uporabiti za izračun deleža viabilnosti celic glede na negativno kontrolo, katere viabilnost znaša 100 %. Če

se uporabi spektrofotometrija HPLC/UPLC, se delež viabilnosti tkiva izračuna kot delež površine vrha formazana MTT, dobljene z živimi tkivi, izpostavljenimi preskusni kemikaliji, glede na vrh formazana MTT, dobljen s sočasno negativno kontrolo. V spodnjih odstavkih 35 in 36 so za vsak preskusni model, zajet s to preskusno metodo, opredeljene mejne vrednosti deleža viabilnosti celic, ki se uporabljajo za razlikovanje med jedkimi in nejedkimi preskusnimi kemikalijami (ali za razlikovanje med različnimi podkategorijami jedkosti), ki jih je treba uporabiti pri razlagi rezultatov.

34. Kadar je razvrstitev nedvoumna, bi moralo za preskusno kemikalijo zadoščati eno samo preskušanje, sestavljeno iz vsaj dveh ponovljenih vzorcev tkiv. V primeru mejnih rezultatov, kot so neskladne ponovne meritve, je morda treba preučiti drugo preskušanje in nato še tretje, če rezultati prvih dveh preskušanj niso skladni.
35. Napovedni model za preskusni model EpiSkin™ za jedkost za kožo (9) (34) (22), povezan s sistemom za razvrščanje GHS ZN/uredbe CLP, je prikazan v preglednici 4.

**Preglednica 4:** Napovedni model EpiSkin™

<b>Viabilnost, izmerjena po časovnih točkah izpostavljenosti (t = 3, 60 in 240 minut)</b>	<b>Napoved, ki se upošteva</b>
< 35-odstotna po 3-minutni izpostavljenosti	<b>Jedko:</b> • Neobvezna podkategorija 1A*
≥ 35-odstotna po 3-minutni izpostavljenosti <b>IN</b> < 35-odstotna po 60-minutni izpostavljenosti <b>ALI</b> ≥ 35-odstotna po 60-minutni izpostavljenosti <b>IN</b> < 35-odstotna po 240-minutni izpostavljenosti	<b>Jedko:</b> • Kombinacija neobveznih podkategorij 1B in 1C
≥ 35-odstotna po 240-minutni izpostavljenosti	<b>Nejedko</b>

\* Glede na podatke, ustvarjene za presojo koristnosti preskusnih modelov rekonstruirane človeške pokožnice za pomoč pri razvrščanju v podkategorije, se je pokazalo, da približno 22 % rezultatov iz podkategorije 1A preskusnega modela EpiSkin™ dejansko lahko predstavlja snovi/zmesi iz podkategorije 1B ali 1C (tj. razvrstitve v previsoko podkategorijo) (glej Dodatek 3).

36. Napovedni modeli za preskusne modele jedkosti za kožo EpiDerm™ SCT (10) (23) (35), SkinEthic™ RHE (17) (18) (23) (36) in epiCS® (16) (23) (37), povezani s sistemom za razvrščanje GHS ZN/uredbe CLP, so prikazani v preglednici 5.

**Preglednica 5:** EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE in epiCS®

<b>Viabilnost, izmerjena po časovnih točkah izpostavljenosti (t = 3 in 60)</b>	<b>Napoved, ki se upošteva</b>
<b>1. KORAK za EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE in epiCS®</b>	
< 50-odstotna po 3-minutni	<b>Jedko</b>

≥ 50-odstotna po 3-minutni izpostavljenosti IN	<b>Jedko</b>
≥ 50-odstotna po 3-minutni izpostavljenosti IN	<b>Nejedko</b>
<b>2. KORAK za EpiDerm™ SCT – za snovi/zmesi, v 1. koraku opredeljene kot jedke</b>	
< 25-odstotna po 3-minutni	Neobvezna podkategorija 1A *
≥ 25-odstotna po 3-minutni	Kombinacija neobveznih podkategorij 1B in 1C
<b>2. KORAK za SkinEthic™ RHE – za snovi/zmesi, v 1. koraku opredeljene kot jedke</b>	
< 18-odstotna po 3-minutni	Neobvezna podkategorija 1A *
≥ 18-odstotna po 3-minutni	Kombinacija neobveznih podkategorij 1B in 1C
<b>2. KORAK za epiCS® – za snovi/zmesi, v 1. koraku opredeljene kot jedke</b>	
< 15-odstotna po 3-minutni	Neobvezna podkategorija 1A *
≥ 15-odstotna po 3-minutni	Kombinacija neobveznih podkategorij 1B in 1C

## PODATKI IN POROČANJE

### Podatki

37. Za vsako preskušanje je treba podatke o posameznih ponovljenih vzorcih tkiv (npr. vrednosti optične gostote in izračunani delež viabilnih celic za vsako preskusno kemikalijo, vključno z razvrstitvijo) v poročilu navesti v obliki preglednice, po potrebi vključno s podatki iz ponovljenih poskusov. Poleg tega je treba v poročilu za vsak preskus navesti srednje vrednosti in razpone viabilnosti in KV med ponovljenimi vzorci tkiv. Za vsako preskusno kemikalijo je treba navesti opažene interakcije med reagentom MTT in snovmi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, ali obarvanimi preskusnimi kemikalijami.

### Poročilo o preskusu

38. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

*Preskusna kemikalija in kontrolne kemikalije:*

- snov iz ene sestavine: kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi: čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin;

- fizični videz, topnost v vodi in morebitne dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti;
- vir, številka serije, če je na voljo;
- obdelava preskusnih/kontrolnih kemikalij pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, drobljenje);
- stabilnost preskusne kemikalije, rok uporabe ali datum za ponovno analizo, če je znan;
- pogoji skladiščenja.

*Uporabljen model in protokol rekonstruirane človeške pokožnice ter njuna utemeljitev (če je ustrezno)*

*Preskusni pogoji:*

- uporabljeni model rekonstruirane človeške pokožnice (vključno s številko serije);
- podatki o umerjanju za merilno napravo (npr. spektrofotometer), valovna dolžina in filtrirana valovna dolžina (če je ustrezno), ki se uporabljajo za kvantifikacijo formazana MTT, ter razpon linearnosti merilne naprave;
- opis metode, uporabljene za kvantifikacijo formazana MTT;
- opis ustreznosti sistema spektrofotometrije HPLC/UPLC, če je ustrezno;
- popolne informacije v podporo specifičnemu uporabljenemu modelu rekonstruirane človeške pokožnice, vključno z njegovo učinkovitostjo. To mora med drugim vključevati:
  - i) viabilnost;
  - ii) pregradno funkcijo;
  - iii) morfologijo;
  - iv) obnovljivost in napovedljivost;
  - v) kontrole kakovosti modela:
- navedba podatkov o modelu iz preteklih preskusov. To mora med drugim vključevati:
- sprejemljivost podatkov o kontroli kakovosti s sklicevanjem na podatke o seriji, pridobljene v preteklosti;
- dokaz o usposobljenosti za izvajanje preskusne metode pred redno uporabo s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti.

*Preskusni postopek:*

- podrobnosti o uporabljenem preskusnem postopku (vključno s postopki spiranja, ki se uporabijo po obdobju izpostavljenosti);
- odmerki uporabljene preskusne kemikalije in kontrolnih kemikalij;
- trajanje obdobja izpostavljenosti in temperature izpostavljenosti;

- navedba kontrol, uporabljenih za snovi, ki neposredno zmanjšajo MTT, in/ali barvilnih preskusnih kemikalij, če je ustrezno;
- število ponovljenih vzorcev tkiv, uporabljenih za vsako preskusno kemikalijo in kontrole (pozitivna kontrola, negativna kontrola in NSMTT, NSCŽivo in NSCodmrlo, če je ustrezno), za vsak čas izpostavljenosti;
- opis uporabljenih meril za odločanje/napovednega modela na podlagi uporabljenega modela rekonstruirane človeške pokožnice;
- opis morebitnih prilagoditev preskusnega postopka (vključno s postopki spiranja).

*Merila za sprejemljivost ponovitve in preskusa:*

- srednje vrednosti pozitivne in negativne kontrole ter razponi sprejemljivosti na podlagi podatkov iz preteklih preskusov;
- sprejemljiva variabilnost med ponovljenimi vzorci tkiv za pozitivne in negativne kontrole;
- sprejemljiva variabilnost med ponovljenimi vzorci tkiv za preskusno kemikalijo.

*Rezultati:*

- preglednice s podatki o posameznih preskusnih kemikalijah in kontrolah za vsako obdobje izpostavljenosti, vsako ponovitev preskusa in vsako ponovljeno meritev, vključno z optično gostoto ali površino vrha formazana MTT, deležem viabilnosti tkiv, povprečnim deležem viabilnosti tkiv, razlikami med ponovljenimi vzorci, standardnimi odkloni in/ali KV, če je ustrezno;
- če je ustrezno, rezultati kontrol, uporabljenih za snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, in/ali barvilne preskusne kemikalije, vključno z optično gostoto ali površino vrha formazana MTT, % NSMTT, % NSCŽivo, % NSCodmrlo, razlikami med ponovljenimi vzorci tkiv, standardnimi odkloni in/ali KV (če je ustrezno), ter končni pravilni delež viabilnosti tkiv;
- rezultati, dobljeni s preskusnimi kemikalijami in kontrolnimi kemikalijami, glede na opredeljena merila za sprejemljivost ponovitve in preskusa;
- opis drugih opaženih učinkov;
- izpeljana razvrstitev z navedbo uporabljenega napovednega modela/meril za odločitev.

*Razprava o rezultatih*

*Sklepne ugotovitve*

## VIRI

- (1) ZN (2013). Globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS). Peta revidirana izdaja, ZN New York in Ženeva. Na voljo na: [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) Poglavje B.4 te priloge, Akutno draženje kože, jedkost za kožo.
- (3) Poglavje B.40 te priloge, Jedkost za kožo *in vitro*.
- (4) Poglavje B.65 te priloge, Preskusna metoda membranske pregrade *in vitro*.
- (5) Poglavje B.46 te priloge, Draženje kože *in vitro*: preskusna metoda rekonstruirane človeške pokožnice.
- (6) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 203), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (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., Ponec, M., Regnier, J. F., Steiling, W., Walker, A. P., in Balls, M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23:219–255.
- (8) Barratt, M. D., Brantom, P. G., Fentem, J. H., Gerner, I., Walker, A. P., in Worth, A. P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 12:471–482.
- (9) Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J., Holzhütter, H.-G., in Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxicol. in Vitro* 12:483–524.
- (10) Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C., Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., Wiemann, C., Kaufmann, T., Remmele, M., in 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., in Zucco, F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, *ATLA* 23:129–147.

- (12) ICCVAM (Medagencijski koordinacijski odbor ZDA za validacijo alternativnih metod) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. Publikacija NIH št. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, ZDA.
- (13) ICCVAM (Medagencijski koordinacijski odbor ZDA za validacijo alternativnih metod) (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. Publikacija NIH št. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, ZDA.
- (14) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), izdal ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3. april 1998.
- (15) EC-ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, izdal ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21. marec 2000.
- (16) Hoffmann, J., Heisler, E., Karpinski, S., Losse, J., Thomas, D., Siefken, W., Ahr, H. J., Vohr, H. W., in Fuchs, H. W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol. In Vitro* 19: 925–929.
- (17) Kandárová, H., Liebsch, M., Spielmann, H., Genschow, E., Schmidt E., Traue, D., Guest, R., Whittingham, A., Warren, N., Gamer, A. O., Remmele, M., Kaufmann, T., Wittmer, E., De Wever, B., in Rosdy, M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol. In Vitro* 20: 547–559.
- (18) Tornier, C., Roquet, M., in Fraissinette, A. B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0.5 cm<sup>2</sup> Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24:1379–1385.
- (19) EC-ECVAM (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, izdal ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), 17. november 2006.
- (20) EC-ECVAM (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, izdal ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 12. junij 2009.
- (21) OECD (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 190). Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

- (22) Alépée, N., Grandidier, M. H., in Cotovio, J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. In Vitro* 28:131–145.
- (23) Desprez, B., Barroso, J., Griesinger, C., Kandárová, H., Alépée, N., in Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. *Toxicol. In Vitro* 29:2055–2080.
- (24) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 219). Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (25) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. . Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 34), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (26) Eskes, C., *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.*62:393–403.
- (27) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65:55–63.
- (28) Tinois, E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro*. V: *In Vitro* Skin Toxicology. Rougier, A., Goldberg, A. M., in Maibach, H. I. (ur.): 133–140.
- (29) Cannon, C. L., Neal, P. J., Southee, J. A., Kubilus, J., in Klausner M. (1994). New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol.in Vitro* 8:889–891.
- (30) Ponec, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Bouwstra, J., in Mommaas, M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. *Inter. J. Pharmaceu.* 203:211–225.
- (31) Tinois, E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M., in Thivolet, J. (1991). *In Vitro* and Post - Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193:310–319.
- (32) Parenteau, N. L., Bilbo, P., Nolte, C. J., Mason, V. S., in Rosenberg, M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.*9:163–171.

- (33) Wilkins, L. M., Watson, S. R., Prosky, S. J., Meunier, S. F., in Parenteau, N. L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8:747–756.
- (34) EpiSkin™ SOP (december 2011). *INVITTOX* Protocol (št. 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.
- (35) EpiDerm™ SOP (februar 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 (januar 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.
- (37) EpiCS® SOP (januar 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., in McNamee, P. Use of HPLC/UPLC- spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29:741–761.
- (39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (maj 2001). Na voljo na: [\[http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf\]](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf).

## Dodatek 1

### OPREDELITVE POJMOV

**Točnost:** stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz ‚skladnost‘ se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusne metode (25).

**Viabilnost celic:** parameter za merjenje celotne dejavnosti celične populacije, npr. zmožnosti celičnih mitohondrijskih dehidrogenaz za redukcijo vitalnega barvila MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid, tiazolil modro), ki se glede na izmerjeno končno točko in uporabljeni načrt preskusa ujema s skupnim številom in/ali viabilnostjo živih celic.

**Kemikalija:** snov ali zmes.

**Skladnost:** je merilo učinkovitosti za preskusne metode, s katerimi se pridobijo kategorični rezultati, in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz točnost se včasih uporabljata kot sopomenki in pomenita delež vseh preskušanih kemikalij, ki so pravilno razvrščene kot pozitivne ali negativne. Skladnost je zelo odvisna od razširjenosti pozitivnih rezultatov v vrstah preučevane preskusne kemikalije (25).

**ET<sub>50</sub>:** lahko se oceni z določanjem časa izpostavljenosti, ki je potreben za zmanjšanje viabilnosti celic za 50 % po nanosu določene stalne koncentracije primerjalne kemikalije, glej tudi IC<sub>50</sub>.

**GHS (globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij):** sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudje (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (1).

**HPLC:** tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (High Performance Liquid Chromatography).

**IATA:** Integrated Approach to Testing and Assessment (celostni pristop k testiranju in ocenjevanju).

**IC<sub>50</sub>:** lahko se oceni z določanjem koncentracije, pri kateri primerjalna kemikalija po določenem času izpostavljenosti zmanjša viabilnost tkiv za 50 % (IC<sub>50</sub>), glej tudi ET<sub>50</sub>.

**Prevelik odmerek:** količina na pokožnico nanese preskusne kemikalije, ki je večja od količine, potrebne za celotno in enakomerno prekritje površine pokožnice. **Zmes:** zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi, ki v njej ne reagirajo.

**Snov iz ene sestavine:** snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je vsaj 80 mas. % glavne sestavine.

**MTT:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid; tiazolil modro tetrazol bromid.

Snov z več sestavinami: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je več glavnih sestavin s koncentracijo  $\geq 10$  mas. % in  $< 80$  mas. %. Snov z več sestavinami je rezultat proizvodnega postopka. Razlika med zmesjo in snovjo z več sestavinami je v tem, da je zmes pridobljena z mešanjem dveh ali več snovi brez kemične reakcije. Snov z več sestavinami je rezultat kemične reakcije.

**NJ:** nejedko.

**Kontrola NSC<sub>odmrlo</sub>:** kontrola z nespecifično barvo v odmrlih tkivih.

**Kontrola NSC<sub>živo</sub>:** kontrola z nespecifično barvo v živih tkivih.

**NSMTT:** nespecifična redukcija MTT.

**OD:** optična gostota.

**PC:** pozitivna kontrola, ponovljen vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s kemikalijo, za katero je znano, da povzroči pozitiven odziv. Za zagotovitev, da se lahko variabilnost odziva pozitivne kontrole oceni v daljšem časovnem obdobju, pa stopnja pozitivnega odziva ne sme biti prevelika.

**Standardi izvajanja (SI):** standardi, ki temeljijo na validirani preskusni metodi in so podlaga za oceno primerljivosti predlagane preskusne metode, ki je funkcijsko in mehanistično podobna. Vključujejo: (i) nujne elemente preskusne metode; (ii) najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij, izbranih iz skupine kemikalij, ki se uporabljajo za dokazovanje sprejemljive učinkovitosti validirane preskusne metode, ter (iii) podobne stopnje zanesljivosti in točnosti, ki temeljijo na rezultatih validirane preskusne metode, ki jih mora dokazati predlagana preskusna metoda pri ocenjevanju ob uporabi najkrajšega možnega seznama referenčnih kemikalij (25).

**Ustreznost:** opis razmerja med preskusno metodo in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere preskusna metoda pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Ustreznost upošteva tudi točnost (skladnost) preskusne metode (25).

**Zanesljivost:** stopnja obnovljivosti preskusne metode v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih (25).

**Ponovitev:** ponovitev zajema eno ali več preskusnih kemikalij, preskušanih sočasno z negativno kontrolo in pozitivno kontrolo.

**Občutljivost:** delež vseh pozitivnih/aktivnih kemikalij, ki se s preskusno metodo pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (25).

**Jedkost za kožo *in vivo*:** nastanek nepovračljivih poškodb kože: zlasti vidnega odmiranja prek povrhnjice v usnjico po nanosu preskusne kemikalije za največ 4 ure. Za reakcije jedkosti so značilne razjede, krvavitve, krvave hraste in do konca 14-dnevnega opazovanja izguba barve zaradi beljenja kože, celi predeli alopecije in brazgotine. Dvournne lezije je morda treba preiskati histopatološko.

**Specifičnost:** delež vseh negativnih/neaktivnih kemikalij, ki se s preskusno metodo pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (25).

**Snov:** kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo. **Preskusna kemikalija:** vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

**UPLC:** tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti (Ultra-High Performance Liquid Chromatography).

**UVCB:** snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

## Dodatek 2

### GLAVNI ELEMENTI PRESKUSNIH MODELOV REKONSTRUIRANE ČLOVEŠKE POKOŽNICE, VALIDIRANIH ZA PRESKUŠANJE JEDKOSTI ZA KOŽO

Elementi preskusnega modela	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Površina modela	0,38 cm <sup>2</sup>	0,63 cm <sup>2</sup>	0,5 cm <sup>2</sup>	0,6 cm <sup>2</sup>
Število ponovljenih vzorcev tkiv	Najmanj 2 za vsak čas izpostavljenosti.	2–3 za vsak čas izpostavljenosti.	Najmanj 2 za vsak čas izpostavljenosti.	Najmanj 2 za vsak čas izpostavljenosti.

Elementi preskusnega modela	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
<b>Odmerki pri tretiranju in nanos</b>	<p><u>Tekočine in viskozne snovi</u>: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm<sup>2</sup>).</p> <p><u>Trdne snovi</u>: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm<sup>2</sup>) + 100 µl ± 5 µl raztopine NaCl (9 g/l).</p> <p><u>Voskaste/lepljive snovi</u>: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm<sup>2</sup>) z najlonsko mrežico.</p>	<p><u>Tekočine</u>: 50 µl (79,4 µl/cm<sup>2</sup>) z najlonsko mrežico ali brez nje.</p> <p><i>Preverjanje združljivosti preskusne kemikalije z najlonsko mrežico pred preskusom.</i></p> <p><u>Poltrdne snovi</u>: 50 µl (79,4 µl/cm<sup>2</sup>).</p> <p><u>Trdne snovi</u>: 25 µl H<sub>2</sub>O (ali več, če je potrebno) + 25 mg (39,7 mg/cm<sup>2</sup>).</p> <p><u>Voski</u>: ploščat ‚kolutast‘ kos premera približno 8 mm, nameščen na vrhu tkiva, namočenega v 15 µl H<sub>2</sub>O.</p>	<p><u>Tekočine in viskozne snovi</u>: 40 µl ± 3 µl (80 µl/cm<sup>2</sup>) z uporabo najlonske mrežice.</p> <p><i>Preverjanje združljivosti preskusne kemikalije z najlonsko mrežico pred preskusom.</i></p> <p><u>Trdne snovi</u>: 20 µl ± 2µl H<sub>2</sub>O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm<sup>2</sup>).</p> <p><u>Voskaste/lepljive snovi</u>: 20 ± 3 mg (40 mg/cm<sup>2</sup>) z uporabo najlonske mrežice.</p>	<p><u>Tekočine</u>: 50 µl (83,3 µl/cm<sup>2</sup>) z uporabo najlonske mrežice.</p> <p><i>Preverjanje združljivosti preskusne kemikalije z najlonsko mrežico pred preskusom.</i></p> <p><u>Poltrdne snovi</u>: 50 µl (83,3 µl/cm<sup>2</sup>).</p> <p><u>Trdne snovi</u>: 25 mg (41,7 mg/cm<sup>2</sup>) + 25 µl H<sub>2</sub>O (ali več, če je potrebno).</p> <p><u>Voskaste snovi</u>: ploščat okrogel kos premera približno 8 mm, nameščen na vrhu tkiva, namočenega v 15 µl H<sub>2</sub>O.</p>
<b>Predhodno preverjanje neposredne redukcije MTT</b>	<p>50 µl (tekočina) ali 20 mg (trdna snov) + 2 ml MTT</p> <p>0,3 mg/ml raztopine 180 ± 5 min</p> <p>pri 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95-odstotna relativna vlažnost</p> <p>→ če se raztopina obarva modro/vijolično, je treba izvesti prilagojene kontrole s tkivi, odmrliimi v vodi.</p>	<p>50 µl (tekočina) ali 25 mg (trdna snov) + 1 ml MTT</p> <p>1 mg/ml raztopine 60 min</p> <p>pri 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95-odstotna relativna vlažnost</p> <p>→ če se raztopina obarva modro/vijolično, je treba izvesti prilagojene kontrole s tkivi, odmrliimi zaradi zamrznitve.</p>	<p>40 µl (tekočina) ali 20 mg (trdna snov) + 1 ml MTT</p> <p>1 mg/ml raztopine 180 ± 15 min pri 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95-odstotna relativna vlažnost</p> <p>→ če se raztopina obarva modro/vijolično, je treba izvesti prilagojene kontrole s tkivi, odmrliimi zaradi zamrznitve.</p>	<p>50 µl (tekočina) ali 25 mg (trdna snov) + 1 ml MTT</p> <p>1 mg/ml raztopine 60 min</p> <p>pri 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95-odstotna relativna vlažnost</p> <p>→ če se raztopina obarva modro/vijolično, je treba izvesti prilagojene kontrole s tkivi, odmrliimi zaradi zamrznitve.</p>

Elementi preskusnega modela	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
<b>Predhodno preverjanje barvne interference</b>	10 µl (tekočina) ali 10 mg (trdna snov) + 90 µl H <sub>2</sub> O se 15 min mešata pri sobni temperaturi → če se raztopina obarva, je treba izvesti prilagojene kontrole z živimi tkivi.	50 µl (tekočina) ali 25 mg (trdna snov) + 300 µl H <sub>2</sub> O 60 min pri 37 °C, 5 % CO <sub>2</sub> , 95-odstotna relativna vlažnost → če se raztopina obarva, je treba izvesti prilagojene kontrole z živimi tkivi.	40 µl (tekočina) ali 20 mg (trdna snov) + 300 µl H <sub>2</sub> O se 60 min mešata pri sobni temperaturi → če je preskusna kemikalija obarvana, je treba izvesti prilagojene kontrole z živimi tkivi.	50 µl (tekočina) ali 25 mg (trdna snov) + 300 µl H <sub>2</sub> O 60 min pri 37 °C, 5 % CO <sub>2</sub> , 95-odstotna relativna vlažnost → če se raztopina obarva, je treba izvesti prilagojene kontrole z živimi tkivi.
<b>Čas in temperatura izpostavljenosti</b>	3 min, 60 min (± 5 min) in 240 min (± 10 min) v prezračevanem prostoru, sobna temperatura (18–28 °C).	3 min pri sobni temperaturi in 60 min pri 37 °C, 5 % CO <sub>2</sub> , 95-odstotna relativna vlažnost.	3 min pri sobni temperaturi in 60 min pri 37 °C, 5 % CO <sub>2</sub> , 95-odstotna relativna vlažnost.	3 min pri sobni temperaturi in 60 min pri 37 °C, 5 % CO <sub>2</sub> , 95-odstotna relativna vlažnost.
<b>Spiranje</b>	25 ml 1x PBS (2 ml/posamezno spiranje).	20-krat z neprekinjenim rahlim curkom 1x PBS.	20-krat z neprekinjenim rahlim curkom 1x PBS.	20-krat z neprekinjenim rahlim curkom 1x PBS.
<b>Negativna kontrola</b>	50 µl raztopine NaCl (9 g/l) preskušeno z vsakim časom izpostavljenosti.	50 µl H <sub>2</sub> O preskušeno z vsakim časom izpostavljenosti.	40 µl H <sub>2</sub> O preskušeno z vsakim časom izpostavljenosti.	50 µl H <sub>2</sub> O preskušeno z vsakim časom izpostavljenosti.

Elementi preskusnega modela	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
<b>Pozitivna kontrola</b>	50 µl ledocetne kisline preskuša se samo 4 ure.	50 µl 8-normalnega KOH preskušeno z vsakim časom izpostavljenosti.	40 µl 8-normalnega KOH preskuša se samo 1 uro.	50 µl 8-normalnega KOH preskušeno z vsakim časom izpostavljenosti.
<b>Raztopina MTT</b>	2 ml 0,3 mg/ml.	300 µl 1 mg/ml.	300 µl 1 mg/ml.	300 µl 1 mg/ml.
<b>Čas in temperatura inkubacije MTT</b>	180 min (± 15 min) pri 37 °C, 5 % CO <sub>2</sub> , 95-odstotna relativna vlažnost.	180 min pri 37 °C, 5 % CO <sub>2</sub> , 95-odstotna relativna vlažnost.	180 min (±15 min) pri 37 °C, 5 % CO <sub>2</sub> , 95-odstotna relativna vlažnost.	180 min pri 37 °C, 5 % CO <sub>2</sub> , 95-odstotna relativna vlažnost.
<b>Ekstrakcijsko topilo</b>	500 µl nakisanega izopropanola (0,04 N HCl v izopropanolu) (izolirano tkivo v celoti potopljeno).	2 ml izopropanola (ekstrakcija iz zgornjega in spodnjega dela vstavka).	1,5 ml izopropanola (ekstrakcija iz zgornjega in spodnjega dela vstavka).	2 ml izopropanola (ekstrakcija iz zgornjega in spodnjega dela vstavka).
<b>Čas in temperatura ekstrakcije</b>	Čez noč pri sobni temperaturi, zaščiteno pred svetlobo.	Čez noč brez stresanja pri sobni temperaturi ali 120 min s stresanjem (~ 120 vrt/min) pri sobni temperaturi.	Čez noč brez stresanja pri sobni temperaturi ali 120 min s stresanjem (~ 120 vrt/min) pri sobni temperaturi.	Čez noč brez stresanja pri sobni temperaturi ali 120 min s stresanjem (~ 120 vrt/min) pri sobni temperaturi.
<b>Odčitek optične gostote</b>	570 nm (545–595 nm) brez referenčnega filtra.	570 nm (ali 540 nm) brez referenčnega filtra.	570 nm (540–600 nm) brez referenčnega filtra.	540–570 nm brez referenčnega filtra.
<b>Kontrola kakovosti tkiva</b>	18-urno tretiranje s SDS 1,0 mg/ml ≤ IC <sub>50</sub> ≤ 3,0 mg/ml.	Tretiranje z 1-odstotnim Tritonom X-100 4,08 ure ≤ ET <sub>50</sub> ≤ 8,7 ure.	Tretiranje z 1-odstotnim Tritonom X-100 4,0 ure ≤ ET <sub>50</sub> ≤ 10,0 ure.	Tretiranje z 1-odstotnim Tritonom X-100 2,0 ure ≤ ET <sub>50</sub> ≤ 7,0 ure.

Elementi preskusnega modela	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
<b>Merila za sprejemljivost</b>	<p>1. Srednja optična gostota ponovljenih vzorcev tkiv, tretiranih z negativno kontrolo (NaCl), mora biti <math>\geq 0,6</math> in <math>\leq 1,5</math> za vsak čas izpostavljenosti.</p> <p>2. Srednja viabilnost ponovljenih vzorcev tkiv, 4 ure izpostavljenih pozitivni kontroli (ledocetna kislina), izražena kot delež negativne kontrole, mora biti <math>\leq 20</math> %.</p> <p>3. V razponu 20–100-odstotne viabilnosti in za optične gostote <math>\geq 0,3</math> razlika v viabilnosti med dvema ponovljenima vzorcema tkiv ne sme presegati 30 %.</p>	<p>1. Srednja optična gostota ponovljenih vzorcev tkiv, tretiranih z negativno kontrolo (H<sub>2</sub>O), mora biti <math>\geq 0,8</math> in <math>\leq 2,8</math> za vsak čas izpostavljenosti.</p> <p>2. Srednja viabilnost ponovljenih vzorcev tkiv, 1 uro izpostavljenih pozitivni kontroli (8-normalni KOH), izražena kot delež negativne kontrole, mora biti <math>&lt; 15</math> %.</p> <p>3. V razponu 20–100-odstotne viabilnosti mora biti koeficient variacije (KV) med ponovljenimi vzorci tkiv <math>\leq 30</math> %.</p>	<p>1. Srednja optična gostota ponovljenih vzorcev tkiv, tretiranih z negativno kontrolo (H<sub>2</sub>O), mora biti <math>\geq 0,8</math> in <math>\leq 3,0</math> za vsak čas izpostavljenosti.</p> <p>2. Srednja viabilnost ponovljenih vzorcev tkiv, 1 uro (in 4 ure, če je to ustrezno) izpostavljenih pozitivni kontroli (8-normalni KOH), izražena kot delež negativne kontrole, mora biti <math>&lt; 15</math> %.</p> <p>3. V razponu 20–100-odstotne viabilnosti in za optične gostote <math>\geq 0,3</math> razlika v viabilnosti med dvema ponovljenima vzorcema tkiv ne sme presegati 30 %.</p>	<p>1. Srednja optična gostota ponovljenih vzorcev tkiv, tretiranih z negativno kontrolo (H<sub>2</sub>O), mora biti <math>\geq 0,8</math> in <math>\leq 2,8</math> za vsak čas izpostavljenosti.</p> <p>2. Srednja viabilnost ponovljenih vzorcev tkiv, 1 uro izpostavljenih pozitivni kontroli (8-normalni KOH), izražena kot delež negativne kontrole, mora biti <math>&lt; 20</math> %.</p> <p>3. V razponu 20–100-odstotne viabilnosti in za optične gostote <math>\geq 0,3</math> razlika v viabilnosti med dvema ponovljenima vzorcema tkiv ne sme presegati 30 %.</p>

### Dodatek 3

#### UČINKOVITOST PRESKUSNIH MODELOV PRI RAZVRŠČANJU V PODKATEGORIJE

V spodnji preglednici je prikazana učinkovitost štirih preskusnih modelov, izračunana na podlagi skupine 80 kemikalij, ki so jih preskusili razvijalci štirih preskusov. Izračune je opravil sekretariat OECD, pregledala in potrdila pa jih je podskupina strokovnjakov (21) (23).

Preskusni modeli EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ in epiCS® omogočajo razvrščanje v podkategorije (tj. 1A, 1B ali 1C ali NJ).

Učinkovitosti, stopnje razvrstitve v previsoko podkategorijo, stopnje razvrstitve v prenizko podkategorijo in točnost (napovedovalna zmogljivost) štirih preskusnih modelov na podlagi skupine 80 kemikalij, ki so bile vse preskušene z dvema ali tremi ponovitvami pri vsakem preskusnem modelu, so navedene v spodnji preglednici.

<b>STATISTIČNI PODATKI O NAPOVEDIH, DOBLJENIH NA PODLAGI CELOTNE SKUPINE KEMIKALIJ</b>				
(n = 80 kemikalij, preskušeni v dveh neodvisnih ponovitvah za epiCS® ali treh neodvisnih ponovitvah za EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ in SkinEthic™ RHE, tj. 159* oziroma 240 razvrstitev)				
* Ena kemikalija se je pri epiCS® preskusila enkrat, ker ni bila na voljo (23).				
	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®
<b>Razvrstitve v previsoko podkategorijo:</b>				
1B in 1C previsoko razvrščeni v podkategorijo	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
NJ previsoko razvrščena v podkategoriji 1B in	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
NJ previsoko razvrščena v podkategorijo 1A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
Popr. razvrstitev v previsoko podkat.	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
<b>Skupna stopnja razvrstitve v previsoko</b>	<b>17,9 %</b>	<b>23,3 %</b>	<b>24,5 %</b>	<b>25,8 %</b>
<b>Razvrstitve v prenizko podkategorijo:</b>				
1A prenizko razvrščena v podkategoriji 1B in 1C	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1A prenizko razvrščena v podkategorijo NJ	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1B in 1C prenizko razvrščeni v podkategorijo NJ	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
<b>Skupna stopnja razvrstitve v prenizko</b>	<b>3,3 %</b>	<b>2,5 %</b>	<b>5,4 %</b>	<b>4,4 %</b>
<b>Pravilne razvrstitve v podkategorije:</b>				
Pravilna razvrstitev v podkategorijo 1A	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %

Pravilna razvrstitev v podkategorijo 1B in/ali 1C	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
Pravilna razvrstitev v podkategorijo NJ	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
<b>Splošna točnost</b>	<b>78,8 %</b>	<b>74,2 %</b>	<b>70 %</b>	<b>69,8 %</b>

NJ: nejedka snov.

#### Dodatek 4

Ključni parametri in merila sprejemljivosti za ustreznost sistema spektrofotometrije HPLC/UPLC za merjenje formazana MTT, ekstrahirane iz tkiva rekonstruirane človeške pokožnice

Parameter	Protokol, izpeljan iz smernic FDA (37) (38)	Merila za sprejemljivost
Selektivnost	Analiza izopropanola, živega slepega vzorca (izvleček izopropanola iz živih tkiv rekonstruirane človeške pokožnice brez kakršnega koli tretiranja), odmrlega slepega vzorca (izvleček izopropanola iz odmrlih tkiv rekonstruirane človeške pokožnice brez kakršnega koli tretiranja).	$Površina_{interferenca} \leq 20 \%$ $površine_{LLOQ}^1$ .
Natančnost	Kontrole kakovosti (tj. formazan MTT pri 1,6 µg/ml, 16 µg/ml in 160 µg/ml) v izopropanolu (n = 5).	$KV \leq 15 \%$ ali $\leq 20 \%$ za LLOQ.
Točnost	Kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 5).	$\% Dev \leq 15 \%$ ali $\leq 20 \%$ za LLOQ.
Vpliv matriksa	Kontrole kakovosti v živem slepem vzorcu (n = 5).	$85 \% \leq$ vpliv matriksa $\% \leq 115 \%$ .
Prenos	Analiza izopropanola po standardu ULOQ <sup>2</sup> .	$Površina_{interferenca} \leq 20 \%$ $površine_{LLOQ}$ .
Obnovljivost (znotraj dneva)	3 neodvisne umeritvene krivulje (na podlagi 6 zaporednih tretjinskih razredčin formazana MTT v izopropanolu, ki se začnejo pri ULOQ, tj. 200 µg/ml); kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 5).	Umeritvene krivulje: $\% Dev \leq 15 \%$ ali $\leq 20 \%$ za LLOQ.
Obnovljivost (med dnevi)	1. dan: 1 umeritvena krivulja in kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 3). 2. dan: 1 umeritvena krivulja in kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 3). 3. dan: 1 umeritvena krivulja in kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 3).	Kontrole kakovosti: $\% Dev \leq 15 \%$ in $KV \leq 15 \%$ .
Kratkoročna stabilnost formazana MTT v izvlečku tkiva rekonstruirane človeške pokožnice	Kontrole kakovosti v živih slepih vzorcih (n = 3), analiziranih na dan priprave in po 24 urah hrambe pri sobni temperaturi.	$\% Dev \leq 15 \%$ .
Dolgoročna stabilnost formazana MTT v izvlečku tkiva rekonstruirane človeške pokožnice, če je potrebno	Kontrole kakovosti v živih slepih vzorcih (n = 3), analiziranih na dan priprave in po več dneh hrambe pri določeni temperaturi (npr. 4 °C, -20 °C, -80 °C).	$\% Dev \leq 15 \%$ .

1LLOQ: spodnja meja določljivosti (Lower Limit of Quantification), opredeljena tako, da zajema 1–2-odstotno viabilnost tkiva, tj. 0,8 µg/ml.

2ULOQ: zgornja meja določljivosti (Upper Limit of Quantification), opredeljena tako, da je vsaj dvakrat višja od najvišje pričakovane koncentracije formazana MTT v izvlečkih izopropanola iz negativnih kontrol, tj. 200 µg/ml.“

(7) Poglavje B.46 dela B se nadomesti z naslednjim:

## **„B.46 PRESKUS DRAŽENJA KOŽE IN VITRO: PRESKUSNA METODA REKONSTRUIRANE ČLOVEŠKE POKOŽNICE**

### **UVOD**

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 439 (2015). Draženje kože pomeni nastanek povračljive poškodbe kože po nanosu preskusne kemikalije za največ 4 ure (kot je opredeljeno v globalno usklajenem sistemu Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN) (1) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (uredba CLP)<sup>1</sup>). Pri tej preskusni metodi se izvede postopek *in vitro*, ki se lahko uporablja za opredeljevanje nevarnosti dražilnih kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s kategorijo 2 po GHS ZN/uredbi CLP (2). V regijah, ki niso sprejele neobvezne kategorije 3 po GHS ZN (blage dražilne snovi), se lahko ta preskusna metoda uporabi tudi za opredelitev nerazvrščenih kemikalij. Zato se lahko – odvisno od regulativnega okvira in uporabljenega sistema razvrščanja – ta preskusna metoda uporablja za ugotavljanje dražilnosti kemikalij za kožo kot samostojen nadomestni preskus za preskušanje draženja kože *in vivo* ali kot delni nadomestni preskus v okviru strategije preskušanja (3).
2. Ocena draženja kože se je običajno izvajala z uporabo laboratorijskih živali (preskusna metoda B.4, enakovredna Smernici OECD za preskušanje 404, ki je bila prvotno sprejeta leta 1981 ter revidirana v letih 1992, 2002 in 2015) (4). Za preskušanje jedkosti so bile tri validirane preskusne metode *in vitro* sprejete kot preskusna metoda OECD B.40 (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 430), preskusna metoda B.40a (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 431) in preskusna metoda B.65 (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 435) (5) (6) (7). V dokumentu o smernici OECD za celostne pristope k testiranju in ocenjevanju (IATA) v zvezi z jedkostjo za kožo in draženjem kože je opisanih več modulov, v katerih so zbrani viri informacij in orodja za analizo, zagotovljene smernice o tem, (i) obstoječe podatke, pridobljene s preskušanjem, in podatke, ki ne temeljijo na preskušanju, združiti in uporabiti pri ocenjevanju potenciala kemikalij za draženje kože in jedkost za kožo, (ii) predlagan pa je tudi pristop, kadar je potrebno dodatno preskušanje (3).

---

<sup>1</sup> Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 13.12.2008, str. 1).

3. S to preskusno metodo se obravnava končna točka draženje kože z vidika zdravja ljudi. Temelji na preskusnem sistemu rekonstruirane človeške pokožnice *in vitro*, ki ima zelo podobne biokemijske in fiziološke značilnosti kot zgornji deli človeške kože, tj. pokožnica. Pri preskusnem sistemu rekonstruirane človeške pokožnice se netransformirani keratinociti pokožnice iz človeškega tkiva uporabijo kot vir celic za rekonstrukcijo modela pokožnice z reprezentativno histologijo in citoarhitekturo. Na voljo so standardi izvajanja, da se olajšata validacija in ocena podobnih in spremenjenih preskusnih metod, temelječih na rekonstruirani človeški pokožnici, v skladu z načeli iz Smernice OECD 34 (8) (9). Ustrezna smernica za preskušanje je bila prvotno sprejeta leta 2010, leta 2013 je bila posodobljena zaradi vključitve dodatnih modelov rekonstruirane človeške pokožnice, leta 2015 pa je bila posodobljena zaradi sklicevanja na dokument s smernicami IATA in uvedbe uporabe alternativnega postopka za merjenje viabilnosti.
4. Predvalidacijske, optimizacijske in validacijske študije so bile dokončane za štiri preskusne modele *in vitro*, ki so na voljo na trgu (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) in temeljijo na preskusnem sistemu rekonstruirane človeške pokožnice (80-odstotna občutljivost, 70-odstotna specifičnost in 75-odstotna točnost). Ti štiri preskusni modeli so vključeni v to smernico za preskušanje in navedeni v Dodatku 2, ki vsebuje tudi informacije o vrsti validacijske študije, uporabljeni za validacijo posamezne preskusne metode. Kot je opozorjeno v Dodatku 2, je bila za razvoj te preskusne metode in standardov izvajanja uporabljena validirana referenčna metoda (VRM) (8).
5. Medsebojno priznavanje podatkov OECD bo zagotovljeno le za preskusne modele, validirane v skladu s standardi izvajanja (8), če je te preskusne modele pregledala in sprejela OECD. Preskusni modeli, vključeni v to preskusno metodo, in ustrezne smernice OECD za preskušanje se lahko brez razlik uporabljajo za obravnavanje zahtev držav po rezultatih preskusov iz preskusnih metod dražilnosti za kožo *in vitro*, hkrati pa se izkoristi medsebojno priznavanje podatkov.
6. Opredelitve pojmov, uporabljenih v tem dokumentu, so navedene v Dodatku 1.

## **ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE**

7. Omejitev preskusne metode, kot jo je pokazala celovita prospektivna validacijska študija, s katero so se ocenile in opredelile preskusne metode rekonstruirane človeške pokožnice (16), je, da ne omogoča razvrščanja kemikalij v neobvezno kategorijo 3 po GHS ZN (blage dražilne snovi) (1). Tako bo način uporabe te preskusne metode odvisen od regulativnega okvira v državah članicah. Za EU v uredbi CLP ni bila uvedena kategorija 3. Za popolno vrednotenje lokalnih učinkov na kožo po enkratni izpostavljenosti kože je treba uporabiti smernico OECD v zvezi s celostnimi pristopi k testiranju in ocenjevanju

(IATA) (3). Razumljivo je, da se pri uporabi človeške kože upoštevajo nacionalna in mednarodna etična načela in pogoji.

8. S to preskusno metodo se obravnava končna točka draženje kože z vidika zdravja ljudi. Čeprav ta preskusna metoda ne zagotavlja ustreznih informacij o jedkosti za kožo, je treba opozoriti, da preskusna metoda B.40a (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 431) v zvezi z jedkostjo za kožo temelji na istem preskusnem sistemu rekonstruirane človeške pokožnice, čeprav uporablja drug protokol (6). Ta preskusna metoda temelji na modelih rekonstruirane človeške pokožnice, ki uporabljajo človeške keratinocite in tako predstavljajo *in vitro* ciljni organ zelene vrste. Poleg tega neposredno vključuje prvo stopnjo kaskadne reakcije vnetja/mehanizma delovanja (poškodba celic in tkiva, posledica pa je lokalizirana poškodba), do katere pride med draženjem *in vivo*. V validacijski študiji, na kateri temelji ta preskusna metoda, so bile preskušene številne kemikalije, v zbirko podatkov validacijske študije pa je skupno vključenih 58 kemikalij (16) (18) (23). Ta preskusna metoda se uporablja za trdne snovi, tekočine, poltrdne snovi in voske. Tekoče snovi so lahko vodne raztopine ali ne, trdne snovi so lahko topne ali netopne v vodi. Če je mogoče, je treba trdne snovi pred nanosom zmleti v fin prah; druga predhodna obdelava vzorca ni potrebna. Plini in aerosoli še niso bili ocenjeni v validacijski študiji (29). Čeprav se lahko preskusijo z uporabo tehnologije rekonstruirane človeške pokožnice, veljavna preskusna metoda ne dovoljuje preskušanja plinov in aerosolov.
9. Preden se preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni. Ker pa zmesi zajemajo širok spekter kategorij in sestave in ker so v zvezi s preskušanjem zmesi trenutno na voljo samo omejene informacije, se ta preskusna metoda v primerih, ko se lahko dokaže, da je ni mogoče uporabiti za posamezno kategorijo zmesi (npr. v skladu s strategijo, kot jo predlagajo Eskes *et al.*, 2012) (30), ne sme uporabljati za to posamezno kategorijo zmesi. Podobna previdnost je potrebna, če se za določene kemijske razrede ali fizikalno-kemijske lastnosti ugotovi, da se ne uporabljajo za to preskusno metodo.
10. Preskusne kemikalije, ki absorbirajo svetlobo v enakem razponu kot formazan MTT, in preskusne kemikalije, ki lahko povzročijo neposredno redukcijo vitalnega barvila MTT (glede na formazan MTT), lahko vplivajo na meritve viabilnosti celic, zato je treba za popravke uporabiti prilagojene kontrole (glej odstavke 28–34).
11. Kadar je razvrstitev nedvoumna, bi morale za preskusno kemikalijo zadoščati eno samo preskušanje, sestavljeno iz treh ponovljenih vzorcev tkiv. V primeru mejnih rezultatov, kot so neskladne ponovne meritve in/ali povprečni delež viabilnosti, enak  $50 \pm 5 \%$ , pa je morda treba preučiti drugo preskušanje in nato še tretje, če so rezultati prvih dveh preskušanj neskladni.

## NAČELO PRESKUSA

12. Preskusna kemikalija se lokalno nanese na tridimenzionalni model rekonstruirane človeške pokožnice, ki vključuje netransformirane keratinocite človeške pokožnice, gojene za večplastni, zelo raznolik model človeške pokožnice. Sestavljajo ga organizirane bazalne, spinalne in zrnate plasti ter večplastna rožena plast, ki vključuje medcelične lamelarne maščobne plasti, ki predstavljajo glavne razrede maščob in so podobni strukturi *in vivo*.
13. S kemikalijami izzvano draženje kože, ki se pokaže predvsem v obliki rdečine in oteklina, je rezultat kaskadnih reakcij, ki se začnejo s prodiranjem kemikalij skozi roženo plast, kjer lahko poškodujejo spodaj ležeče plasti keratinocitov in drugih kožnih celic. Poškodovane celice bodisi sprostijo vnetne posrednike bodisi sprožijo kaskadne reakcije vnetja, ki deluje tudi na celice v usnjici, zlasti na celice strome in endotelne celice krvnih žil. Zaradi razširitve in povečane prepustnosti endotelnih celic nastane opazna rdečina in oteklina (29). S preskusnimi metodami na podlagi rekonstruirane človeške pokožnice se zaradi neobstoja kakršne koli vaskularizacije v preskusnem sistemu *in vitro* merijo zlasti začetni dogodki v kaskadni reakciji, npr. poškodbe celic/tkiv (16) (17), pri čemer se kot odčitek uporablja celična viabilnost.
14. Viabilnost celic v modelih rekonstruirane človeške pokožnice se meri z encimsko pretvorbo vitalnega barvila MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid, tiazolil modro; številka CAS 298–93-1) v sol modrega formazana, količina katere se izmeri po ekstrakciji iz tkiv (31). Dražilne kemikalije se opredelijo glede na njihovo zmožnost zmanjšanja viabilnosti celic pod opredeljene vrednosti praga (tj.  $\leq 50\%$ , za kategorijo 2 po GHS ZN/uredbi CLP). Odvisno od regulativnega okvira in uporabnosti preskusne metode se lahko preskusne kemikalije, ki vplivajo na viabilnost celic nad opredeljeno vrednostjo praga, štejejo za nedražilne snovi (tj.  $> 50\%$ , brez kategorije).

## DOKAZOVANJE USPOSOBLJENOSTI

15. Pred redno uporabo katerega koli od štirih validiranih preskusnih modelov, ki izpolnjujejo zahteve te preskusne metode (Dodatek 2), morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost, tako da uporabijo deset snovi za preverjanje usposobljenosti, navedenih v preglednici 1. V primerih, ko snov s seznama na primer ni na voljo, se lahko uporabi druga snov, za katero so na voljo ustrezni referenčni podatki *in vivo* in *in vitro* (npr. s seznama referenčnih kemikalij (8)), če se uporabijo enaka merila za izbor, kot so opisana v preglednici 1. Uporabo druge snovi za preverjanje usposobljenosti je treba utemeljiti.
16. V okviru preskušanja usposobljenosti je priporočljivo, da uporabniki po prejetju preverijo pregrado tkiv, kakor to določa proizvajalec modela rekonstruirane človeške pokožnice. To je zlasti pomembno, če tkiva potujejo na dolge razdalje/dalj časa. Potem ko je preskusna metoda uspešno vzpostavljena ter je pridobljena in dokazana usposobljenost za njeno

uporabo, tako redno preverjanje ni več potrebno. Vendar je priporočljivo, da se ob redni uporabi metode še naprej ocenjujejo značilnosti pregrade tkiv v rednih časovnih razmikih.

**Preglednica 1:** Snovi za preverjanje usposobljenosti<sup>1</sup>

Snov	ŠT. CAS	Rezultat preskusa <i>in vivo</i> <sup>2</sup>	Agregatno stanje	Kategorija po GHS ZN
<b>NERAZVRŠČENE SNOVI (brez kategorije po GHS ZN)</b>				
Naftalen očetna kislina	86-87-3	0	trdno	brez kat.
Izopropanol	67-63-0	0,3	tekoče	brez kat.
Metil stearat	112-61-8	1	trdno	brez kat.
Heptil butirat	5870-93-9	1,7	tekoče	brez kat. (neobvezna kat. 3) <sup>3</sup>
Heksil salicilat	6259-76-3	2	tekoče	brez kat. (neobvezna kat. 3) <sup>3</sup>
<b>RAZVRŠČENE SNOVI (kategorija 2 po GHS ZN)</b>				
Ciklamen aldehid	103-95-7	2,3	tekoče	kat. 2
1-bromoheksan	111-25-1	2,7	tekoče	kat. 2
Kalijev hidroksid (5-odstotni vodni)	1310-58-3	3	tekoče	kat. 2
1-metil-3-fenil-1-piperazin	5271-27-2	3,3	trdno	kat. 2
Heptanal	111-71-7	3,4	tekoče	kat. 2

1 Snovi za preverjanje usposobljenosti so podskupina snovi, ki se uporabljajo v validacijski študiji, njihova izbira pa temelji na naslednjih merilih: (i) kemikalije so na voljo na trgu; (ii) predstavljajo celoten niz rezultatov Draizovega preskusa draženja kože (od nedražilnih do zelo dražilnih); (iii) njihova kemična struktura je natančno opredeljena; (iv) predstavljajo kemijsko delovanje, ki je uporabljeno v validacijskem postopku; (v) zagotovile so ponovljive rezultate *in vitro* pri večkratnih preskušanjih in v več laboratorijih; (vi) pravilno so bile napovedane *in vitro* ter (vii) se ne povezujejo z zelo toksičnim profilom (npr. rakotvornim ali toksičnim za reprodukcijski sistem) ali previsokimi stroški odstranjevanja.

2 Rezultat *in vivo* v skladu s preskusno metodo B.4 (4).

3 V okviru te preskusne metode se neobvezna kategorija 3 po GHS ZN (blage dražilne snovi) (1) šteje kot „Brez kategorije“.

## POSTOPEK

17. V nadaljevanju so opisani elementi in postopki za oceno razdraženosti kože s preskusno metodo rekonstruirane človeške pokožnice (glej tudi Dodatek 3 za parametre, povezane z vsakim preskusnim modelom). Na voljo so standardni delovni postopki za vse štiri modele, ki ustrezajo tej preskusni metodi (32) (33) (34) (35).

## ELEMENTI PRESKUSNE METODE REKONSTRUIRANE ČLOVEŠKE POKOŽNICE

### Splošni pogoji

18. Za rekonstrukcijo epitelija je treba uporabiti netransformirane človeške keratinocite. Pod funkcionalno roženo plastjo mora biti več slojev živih epiteljskih celic (bazalna plast,

trnasta plast, znata plast). Rožena plast mora biti razdeljena na več plasti in vsebovati lipidni profil za močno funkcionalno pregrado za zaustavitev hitre penetracije citotoksičnih primerjalnih kemikalij, npr. natrijevega dodecil sulfata (SDS) ali Tritona X-100. Pregradna funkcija mora biti dokazana in se lahko oceni z določitvijo koncentracije, pri kateri primerjalna kemikalija po določenem času izpostavljenosti zmanjša viabilnost tkiv za 50 % (IC<sub>50</sub>), ali z določitvijo časa izpostavljenosti, ki je potreben za zmanjšanje viabilnosti celic za 50 % (ET<sub>50</sub>) po nanosu določene stalne koncentracije primerjalne kemikalije. Zadrževalne značilnosti modela rekonstruirane človeške pokožnice morajo preprečevati prehod materiala okoli rožene plasti v živo tkivo, kar bi preprečilo učinkovitost modelov za raziskovanje v zvezi z izpostavljenostjo kože. V modelu rekonstruirane človeške pokožnice ne sme biti bakterij, virusov, mikoplazme ali gliv.

## Pogoji za funkcionalnost

### *Viabilnost*

19. Analiza, ki se uporablja za kvantifikacijo viabilnosti, je analiza MTT (31). Viabilne celice konstrukcije tkiva rekonstruirane človeške pokožnice lahko reducirajo vitalno barvilo MTT v oborino modrega formazana MTT, ki se nato ekstrahira iz tkiva z uporabo izopropanola (ali podobnega topila). Optična gostota (OD) izvlečka ekstrakcijskega topila mora biti dovolj majhna, tj.  $OD < 0,1$ . Ekstrahirani formazan MTT se lahko kvantificira bodisi z uporabo meritve standardne absorbance (OD) bodisi z uporabo postopka spektrofotometrije HPLC/UPLC (36). Uporabniki modela rekonstruirane človeške pokožnice morajo zagotoviti, da vsaka serija zadevnega modela izpolnjuje merila, določena za negativno kontrolo. Razpon sprejemljivosti (zgornja in spodnja meja) za vrednosti optične gostote pri negativni kontroli (v pogojih preskusne metode za draženje kože) določi razvijalec/dobavitelj modela rekonstruirane človeške pokožnice. Razponi sprejemljivosti za štiri validirane modele rekonstruirane človeške pokožnice, vključene v to preskusno metodo, so navedeni v preglednici 2. Uporabnik spektrofotometrije HPLC/UPLC mora razpone optične gostote pri negativni kontroli, navedene v preglednici 2, uporabiti kot merilo za sprejemljivost negativne kontrole. Evidentirati je treba, da so tkiva, tretirana z negativno kontrolo, obstojna v kulturi (meritve viabilnosti so podobne) med celotnim trajanjem preskusnega obdobja izpostavljenosti.

**Preglednica 2:** Razponi sprejemljivosti za vrednosti optične gostote pri negativni kontroli preskusnih modelov, vključenih v to preskusno metodo

	<b>Spodnja meja sprejemljivosti</b>	<b>Zgornja meja sprejemljivosti</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>	$\geq 0,7$	$\leq 2,5$

### Pregradna funkcija

20. Rožena plast in njena maščobna sestava morata zadostovati za zaustavitev hitre penetracije citotoksičnih primerjalnih kemikalij, npr. SDS ali Tritona X-100, kot se ocenjuje z IC<sub>50</sub> ali ET<sub>50</sub> (preglednica 3).

### Morfologija

21. Zagotovljen mora biti histološki pregled modela rekonstruirane človeške pokožnice za prikaz strukture, podobne človeški pokožnici (vključno z večplastno roženo plastjo).

### Obnovljivost

22. Rezultati pozitivnih in negativnih kontrol preskusne metode morajo dokazovati obnovljivost v daljšem časovnem obdobju.

### Kontrola kakovosti

23. Model rekonstruirane človeške pokožnice se lahko uporabi samo, če razvijalec/dobavitelj dokaže, da vsaka serija modela rekonstruirane človeške pokožnice izpolnjuje opredeljena merila za sprostitev proizvodnje, med katerimi so najpomembnejša merila za *viabilnost* (odstavek 19), *pregradno funkcijo* (odstavek 20) in *morfologijo* (odstavek 21). Te podatke je treba zagotoviti uporabnikom preskusne metode, da lahko te informacije vključijo v poročilo o preskusu. Razpon sprejemljivosti (zgornja in spodnja meja) za IC<sub>50</sub> ali ET<sub>50</sub> mora določiti razvijalec/dobavitelj modela rekonstruirane človeške pokožnice. Za zanesljivo napoved razvrstitve med dražilne snovi se lahko upoštevajo le rezultati, doseženi z ustreznimi tkivi. Razponi sprejemljivosti za štiri preskusne modele, vključene v to smernico za preskušanje, so navedeni v preglednici 3.

**Preglednica 3:** Merila za kontrolo kakovosti ob sprostitvi serij preskusnih modelov, vključenih v to preskusno metodo

	<b>Spodnja meja sprejemljivosti</b>	<b>Zgornja meja sprejemljivosti</b>
<b>EpiSkin™ (SM)</b> (18-urno tretiranje s SDS) (32)	IC <sub>50</sub> = 1,0 mg/ml	IC <sub>50</sub> = 3,0 mg/ml
<b>EpiDerm™ SIT (EPI-200)</b> (1-odstotni Triton X-100) (33)	ET <sub>50</sub> = 4,0 ure	ET <sub>50</sub> = 8,7 ure
<b>SkinEthic™ RHE</b> (1-odstotni Triton X-100) (34)	ET <sub>50</sub> = 4,0 ure	ET <sub>50</sub> = 10,0 ure
<b>LabCyte EPI-MODEL24 SIT</b> (18-urno tretiranje s SDS) (35)	IC <sub>50</sub> = 1,4 mg/ml	IC <sub>50</sub> = 4,0 mg/ml

### Nanos preskusne kemikalije in kontrolnih kemikalij

24. Za vsako preskusno kemikalijo in kontrole pri vsaki ponovitvi je treba uporabiti vsaj tri ponovljene vzorce. Pri tekočih in trdnih kemikalijah je treba nanesti zadostno količino preskusne kemikalije, da se enakomerno prekrije površina pokožnice, pri čemer mora biti

odmerek natančno določen, tj. od 26 do 83  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  ali  $\text{mg}/\text{cm}^2$  (glej Dodatek 3). Za boljši stik med preskusno kemikalijo in površino pokožnice je treba v primeru trdnih kemikalij površino pokožnice pred nanosom navlažiti z deionizirano ali destilirano vodo. Če je mogoče, je treba trdne snovi preskusiti v obliki finega prahu. V nekaterih primerih se lahko kot pomoč za porazdelitev uporabi najlonska mrežica (glej Dodatek 3). Ob koncu časa izpostavljenosti je treba preskusno kemikalijo skrbno sprati s površine pokožnice z vodnim pufrom ali 0,9-odstotnim NaCl. Odvisno od uporabljenih preskusnih modelov rekonstruirane človeške pokožnice čas izpostavljenosti traja 15–60 minut, inkubacijska temperatura pa znaša 20–37 °C. Ti časi in temperature izpostavljenosti so optimirani za vsako posamezno preskusno metodo rekonstruirane človeške pokožnice ter predstavljajo različne bistvene lastnosti preskusnih modelov (npr. pregradno funkcijo) (glej Dodatek 3).

25. V vsaki ponovitvi je treba uporabiti sočasno negativno (NC) in pozitivno kontrolo (PC), da se dokaže, da so viabilnost celic (pri NC), pregradna funkcija in posledična občutljivost tkiv (pri PC) v okviru opredeljenega območja sprejemljivosti iz preteklih preskusov. Predlagana snov za pozitivno kontrolo je 5-odstotni vodni SDS. Predlagani snovi za negativno kontrolo sta voda ali fosfatni pufer s soljo (PBS).

### **Meritve viabilnosti celic**

26. Glede na postopek preskušanja je bistveno, da se viabilnost celic ne meri takoj po izpostavljenosti preskusni kemikaliji, ampak v svežem gojišču po dovolj dolgi inkubacijski dobi po tretiranju izpranega tkiva. Ta čas omogoča izboljšanje stanja, kar zadeva šibke citotoksične vplive, in pojav jasnih citotoksičnih vplivov. Ugotovljeno je bilo, da je 42-urna inkubacijska doba po tretiranju optimalna med optimiranjem preskusa dveh od preskusnih modelov na podlagi rekonstruirane človeške pokožnice, na katerih temelji ta preskusna metoda (11) (12) (13) (14) (15).
27. Analiza MTT je standardizirana kvantitativna metoda, ki jo je treba v okviru te preskusne metode uporabljati za merjenje viabilnosti celic. Ustreza uporabi tridimenzionalne konstrukcije tkiva. Vzorec tkiva se za 3 ure potopi v ustrezno koncentracijo raztopine MTT (npr. 0,3–1 mg/ml). Viabilne celice MTT pretvorijo v modri formazan. S topilom (npr. izopropanolom, kislim izopropanolom) se iz tkiva pridobi oborina modrega formazana, potem pa se koncentracija formazana izmeri tako, da se določi optična gostota pri valovni dolžini 570 nm z uporabo filtrirane valovne dolžine največ  $\pm 30$  nm, ali s postopkom spektrofotometrije HPLC/UPLC (glej odstavek 34) (36).
28. Optične lastnosti preskusne kemikalije ali njenega kemijskega delovanja na MTT lahko ovirajo analizo (npr. kemikalije lahko preprečijo obarvanje ali povzročijo, da se razlikuje od običajnega, lahko pa ga tudi povzročijo), zaradi česar je lahko ocena viabilnosti celic nepravilna. To se lahko zgodi, če se določena preskusna kemikalija z izpiranjem ne odstrani s kože v celoti ali če prodre v pokožnico. Če preskusna kemikalija deluje

neposredno na MTT (npr. snov, ki neposredno zmanjša MTT), je običajne barve ali se obarva med tretiranjem tkiva, je treba izvesti dodatne kontrole, da se zaznajo in odpravijo interference preskusne kemikalije s tehniko za merjenje viabilnosti (glej odstavka 29 in 33). Za podrobnejši opis načina glede popravka neposrednega zmanjšanja MTT in vpliva barvil glej standardne operativne postopke za štiri validirane modele, vključene v to preskusno metodo (32) (33) (34) (35).

29. Za opredelitev snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, je treba vsako preskusno kemikalijo dodati v sveže pripravljeno raztopino MTT. Če se zmes MTT, ki vsebuje preskusno kemikalijo, obarva modro/vijolično, se šteje, da preskusna kemikalija neposredno zmanjšuje MTT, zato je treba izvesti dodatno funkcionalno preverjanje na neviabilnih tkivih rekonstruirane človeške pokožnice, in to neodvisno od uporabe meritve standardne absorbance (OD) ali postopka spektrofotometrije HPLC/UPLC. Pri tem dodatnem funkcionalnem preverjanju se uporabijo odmrla tkiva, ki imajo samo rezidualno presnovno aktivnost, vendar preskusno kemikalijo absorbirajo podobno kot viabilna tkiva. Vsaka preskusna kemikalija, ki zmanjšuje MTT, se nanese na vsaj dva ponovljena vzorca odmrla tkiva, na katerih se nato opravi celotni postopek preskušanja, da pride do nespecifične redukcije MTT (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Za vsako preskusno kemikalijo zadostuje ena sama kontrola NSMTT, ne glede na število izvedenih samostojnih preskusov/ponovitev. Dejanska viabilnost tkiva se nato izračuna kot delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi snovi, ki zmanjšuje MTT, od katerega se odšteje delež nespecifične redukcije MTT, dobljen z odmrlimi tkivi, izpostavljenimi isti snovi, ki zmanjšuje MTT, izračunan glede na negativno kontrolo, izvedeno sočasno s preskusom, ki se popravlja (% NSMTT).
30. Za opredelitev morebitnega vplivanja obarvanih preskusnih kemikalij ali preskusnih kemikalij, ki so se obarvale v stiku z vodo ali izopropanolom, in odločitev, ali so potrebne dodatne kontrole, je treba opraviti spektralno analizo preskusne kemikalije v vodi (okolje med izpostavljenostjo) in/ali izopropanolu (raztopina za ekstrahiranje). Če preskusna kemikalija v vodi in/ali izopropanolu absorbira svetlobo v razponu  $570 \pm 30$  nm, je treba izvesti dodatne kontrole z barvilom ali pa uporabiti postopek spektrofotometrije HPLC/UPLC, pri čemer v tem primeru te kontrole niso potrebne (glej odstavka 33 in 34). Pri izvajanju meritve standardne absorbance (OD) se vsaka moteča obarvana preskusna kemikalija nanese na vsaj dva ponovljena vzorca viabilnega tkiva, na katerih se izvede celotni postopek preskušanja, vendar se v fazi inkubacije MTT inkubirata z gojiščem namesto z raztopino MTT, da se dobi kontrola z nespecifično barvo (NSC<sub>živo</sub>). Kontrolo z nespecifično barvo (NSC<sub>živo</sub>) je treba izvesti sočasno s preskušanjem obarvane preskusne kemikalije, v primeru večkratnega preskušanja pa je treba zaradi inherentne biološke variabilnosti živih tkiv za vsak izvedeni preskus (pri vsaki ponovitvi) izvesti neodvisno kontrolo z nespecifično barvo (NSC<sub>živo</sub>). Dejanska viabilnost tkiv se nato izračuna kot delež viabilnosti tkiv, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi moteči preskusni kemikaliji in

inkubiranimi z raztopino MTT, od katerega se odšteje delež nespecifične barve, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi moteči preskusni kemikaliji in inkubiranimi z gojiščem brez MTT, pri čemer je bil ta preskus izveden sočasno s preskusom, ki se popravlja (% NSC<sub>živo</sub>).

31. Pri preskusnih kemikalijah, za katere je ugotovljeno, da neposredno zmanjšujejo MTT (glej odstavek 29) in povzročajo barvno interferenco (glej odstavek 30), je potreben tudi tretji niz kontrol poleg NSMTT in NSC<sub>živo</sub>, opisanih v prejšnjih odstavkih, ko se izvaja meritev standardne absorbance (OD). To po navadi velja za temno obarvane preskusne kemikalije, ki motijo analizo MTT (npr. modre, vijoličaste, črne), ker njihova lastna barva ovira presojo njihove zmožnosti za neposredno redukcijo MTT, kot je opisana v odstavku 29. Te preskusne kemikalije se lahko vežejo na živa in odmrta tkiva, zato se s kontrolo NSMTT ne le popravi potencialna neposredna redukcija MTT zaradi preskusne kemikalije, ampak tudi barvna interferenca, ki nastane zaradi vezave preskusne kemikalije na odmrta tkiva. To bi lahko vodilo do dvojnega popravka barvne interferenčne, saj se s kontrolo NSC<sub>živo</sub> že popravi barvna interferenca, ki jo povzroča vezava preskusne kemikalije na živa tkiva. Za preprečitev morebitnega dvojnega popravka barvne interferenčne je treba izvesti še tretjo kontrolo za nespecifično barvo v odmrlih tkivih (NSC<sub>odmrlo</sub>). Pri tej dodatni kontroli se preskusna kemikalija nanese na vsaj dva ponovljena vzorca odmrlega tkiva, na katerih se izvede celoten postopek preskušanja, vendar se v fazi inkubacije MTT inkubirata z gojiščem namesto z raztopino MTT. Za vsako preskusno kemikalijo zadostuje ena sama kontrola NSC<sub>odmrlo</sub> ne glede na število izvedenih neodvisnih preskusov/ponovitev, vendar jo je treba izvesti sočasno s kontrolo NSMTT in po možnosti z isto serijo tkiva. Dejanska viabilnost tkiva se nato izračuna kot delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi preskusni kemikaliji, od katerega se odštejeta % NSMTT in % NSC<sub>živo</sub>, prišteje pa se mu delež nespecifične barve, dobljen z odmrliimi tkivi, izpostavljenimi moteči preskusni kemikaliji in inkubiranimi z medijem brez MTT, izračunan glede na negativno kontrolo, izvedeno sočasno s preskusom, ki se popravlja (% NSC<sub>odmrlo</sub>).
32. Pomembno je poudariti, da se lahko zaradi nespecifične redukcije MTT in nespecifičnih barvnih interferenc povečajo odčitki izvlečka tkiva nad razponom linearnosti spektrofotometra. Na tej podlagi mora vsak laboratorij najprej določiti razpon linearnosti svojega spektrofotometra s formazanom MTT (št. CAS 57360-69-7) iz komercialnega vira, šele nato lahko začne preskušanje preskusnih kemikalij za regulativne namene. Meritev standardne absorbance (OD) z uporabo spektrofotometra je ustrezna za oceno snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, in preskusnih kemikalij, ki povzročajo barvno interferenco, ko so optične gostote izvlečkov tkiv, dobljene s preskusno kemikalijo brez kakršnega koli popravka za neposredno redukcijo MTT in/ali barvno interferenco, znotraj linearnega razpona spektrofotometra ali ko nepopravljeni delež viabilnosti, dobljen s preskusno kemikalijo, že znaša  $\leq 50\%$ . Vendar je treba rezultate za preskusne kemikalije, ki

povzročajo % NSMTT in/ali % NSC<sub>živo</sub>  $\geq$  50 % negativne kontrole, obravnavati previdno, saj je to mejna vrednost, ki se uporablja za razlikovanje med razvrščenimi in nerazvrščenimi kemikalijami (glej odstavek 36).

33. Za obarvane preskusne kemikalije, ki niso združljive z meritvijo standardne absorbance (OD) zaradi premočnega vplivanja na analizo MTT, se lahko uporabi alternativni postopek spektrofotometrije HPLC/UPLC za merjenje formazana MTT (glej odstavek 34) (36). S sistemom spektrofotometrije HPLC/UPLC je mogoče formazan MTT ločiti od preskusne kemikalije pred njegovo kvantifikacijo (36). Iz tega razloga kontrole NSC<sub>živo</sub> ali NSC<sub>odmrlo</sub> pri uporabi spektrofotometrije HPLC/UPLC niso nikoli potrebne, in to ne glede na to, katera kemikalija se preskuša. Kljub temu je treba kontrole NSMTT uporabiti v primeru suma, da preskusna kemikalija neposredno zmanjšuje MTT ali da njena barva ovira presojo zmožnosti za neposredno redukcijo MTT (kot je opisano v odstavku 29). Kadar se za merjenje formazana MTT uporabi spektrofotometrija HPLC/UPLC, se delež viabilnosti tkiva izračuna kot razmerje med površino vrha formazana MTT, dobljeno z živimi tkivi, izpostavljenimi preskusni kemikaliji, in površino vrha formazana MTT, dobljeno s sočasno negativno kontrolo. Za preskusne kemikalije, ki lahko neposredno zmanjšajo MTT, se dejanska viabilnost tkiva izračuna kot delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi preskusni kemikaliji, od katerega se odšteje % NSMTT. Nazadnje, opozoriti je treba, da snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT in lahko povzročijo tudi barvno interferenco ter ki ostanejo v tkivih po tretiranju in zmanjšujejo MTT tako močno, da optične gostote (z uporabo standardne meritve optične gostote) ali površine vrha (z uporabo spektrofotometrije UPLC/HPLC) preskušanih izvlečkov tkiv, ki presegajo razpon linearnosti spektrofotometra, ni mogoče oceniti, čeprav naj bi se to zgodilo samo v zelo redkih primerih.
34. Spektrofotometrija HPLC/UPLC se lahko uporabi tudi z vsemi vrstami preskusnih kemikalij (obarvanimi, neobarvanimi, kemikalijami, ki zmanjšujejo MTT, in tistimi, ki ne zmanjšujejo MTT) za merjenje formazana MTT (36). Zaradi raznovrstnosti sistemov spektrofotometrije HPLC/UPLC je treba usposobljenost sistema spektrofotometrije HPLC/UPLC dokazati pred njegovo uporabo za kvantifikacijo formazana MTT iz izvlečkov tkiv, tako da izpolnjuje merila za sprejemljivost za niz standardnih parametrov ustreznosti na podlagi tistih, ki so opisani v smernicah ameriške uprave za hrano in zdravila za industrijo v zvezi z bioanalitično metodo validacije (36) (37). Ti ključni parametri in njihova merila za sprejemljivost so prikazani v Dodatku 4. Ko so izpolnjena merila za sprejemljivost, opredeljena v Dodatku 4, se sistem spektrofotometrije HPLC/UPLC šteje za ustrezen in je pripravljen za merjenje formazana MTT v poskusnih pogojih, opisanih v tej preskusni metodi.

## **Merila za sprejemljivost**

35. Za vsako preskusno metodo, pri kateri se uporabljajo ustrezne serije modelov rekonstruirane človeške pokožnice (glej odstavek 23), morajo imeti tkiva, tretirana z negativno kontrolo, optično gostoto, iz katere je razvidna kakovost tkiv, pri katerih so se upoštevale zahtevane stopnje in vsi postopki protokola. Vrednosti kontrol optične gostote ne smejo biti nižje od v preteklosti postavljenih mej. Podobno mora biti iz tkiv, tretiranih s pozitivno kontrolo, tj. 5-odstotnim vodnim SDS, razvidna sposobnost, da se odzovejo na jedko kemikalijo v pogojih preskusne metode (glej Dodatek 3 in za več informacij standardne operativne postopke štirih preskusnih modelov, vključenih v to smernico za preskušanje (32) (33) (34) (35)). S tem povezane ustrezne meritve variabilnosti med ponovljenimi vzorci tkiv, tj. standardni odkloni, morajo biti znotraj meja sprejemljivosti, določenih za uporabljeni preskusni model (glej Dodatek 3).

### **Razlaga rezultatov in napovedni model**

36. Vrednosti optične gostote, pridobljene z vsako preskusno kemikalijo, se lahko uporabijo za izračun deleža viabilnosti, normaliziranega na negativno kontrolo, katere viabilnost znaša 100 %. Če se uporabi spektrofotometrija HPLC/UPLC, se delež viabilnosti tkiva izračuna kot delež površine vrha formazana MTT, dobljene z živimi tkivi, izpostavljenimi preskusni kemikaliji, glede na vrh formazana MTT, dobljen s sočasno negativno kontrolo. Mejna vrednost deleža viabilnosti celic, ki dražilne preskusne kemikalije loči od nerazvrščenih, in statistični postopki, ki se uporabljajo za ocenjevanje rezultatov ter določanje dražilnih kemikalij, morajo biti natančno opredeljeni in evidentirani ter dokazani kot ustrezni (za več informacij glej standardne operativne postopke preskusnih modelov). Mejne vrednosti za napoved draženja so podane v nadaljevanju.

- Za preskusno kemikalijo se šteje, da jo je treba razvrstiti in označiti v skladu z GHS ZN/uredbo CLP (kategorija 2 ali kategorija 1), če je povprečni delež viabilnosti tkiva po izpostavljenosti in inkubaciji po tretiranju manjši ali enak ( $\leq$ ) 50 %. Ker s preskusnimi modeli rekonstruirane človeške pokožnice, ki so zajeti s to preskusno metodo, ni mogoče razlikovati med kategorijama 1 in 2 po GHS ZN/uredbi CLP, je za končno razvrstitev preskusne kemikalije potrebnih več informacij o jedkosti za kožo (glej tudi smernico OECD za preskušanje v zvezi z IATA (3)). Če se za preskusno kemikalijo ugotovi, da ni jedka (npr. na podlagi preskusne metode B40, B.40a ali B.65), in je viabilnost tkiva po izpostavljenosti in inkubaciji po tretiranju manjša ali enaka ( $\leq$ ) 50 %, se za preskusno kemikalijo šteje, da je jedka za kožo v skladu s kategorijo 2 po GHS ZN/uredbi CLP.
- Odvisno od regulativnega okvira v državah članicah se lahko za preskusno kemikalijo šteje, da ni jedka za kožo, tj. ‚brez kategorije‘ po GHS ZN/uredbi CLP, če je viabilnost tkiva po izpostavljenosti in inkubaciji po tretiranju večja kot ( $>$ ) 50 %.

## **PODATKI IN POROČANJE**

### **Podatki**

37. Za vsako ponovitev je treba podatke o posameznih ponovljenih vzorcih tkiv (npr. vrednosti optične gostote in podatke o izračunanem deležu viabilnih celic za vsako preskusno kemikalijo, vključno z razvrščanjem) navesti v obliki preglednice, po potrebi vključno s podatki iz ponovljenih poskusov. To pomeni, da je treba za vsako ponovitev navesti srednje vrednosti  $\pm$  standardni odklon. Za vsako preskusno kemikalijo je treba navesti opažene interakcije med reagentom MTT in obarvanimi preskusnimi kemikalijami.

### **Poročilo o preskusu**

38. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

#### *Preskusna kemikalija in kontrolne kemikalije:*

- snov iz ene sestavine: kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi: čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin;
- fizični videz, topnost v vodi in morebitne dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti;
- vir, številka serije, če je na voljo;
- obdelava preskusnih/kontrolnih kemikalij pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, drobljenje);
- stabilnost preskusne kemikalije, rok uporabe ali datum za ponovno analizo, če je znan;
- pogoji skladiščenja.

Uporabljen model in protokol rekonstruirane človeške pokožnice (ter utemeljitev izbire, če je ustrezno).

#### *Preskusni pogoji:*

- uporabljeni model rekonstruirane človeške pokožnice (vključno s številko serije);
- podatki o umerjanju za merilno napravo (npr. spektrofotometer), valovna dolžina in filtrirana valovna dolžina (če je ustrezno), ki se uporabljajo za kvantifikacijo formazana MTT, ter razpon linearnosti merilne naprave; opis metode, uporabljene za kvantifikacijo formazana MTT;
- opis ustreznosti sistema spektrofotometrije HPLC/UPLC, če je ustrezno; popolne informacije v podporo specifičnemu uporabljenemu modelu rekonstruirane človeške pokožnice, vključno z njegovo učinkovitostjo. To mora med drugim vključevati:

- (i) viabilnost;
  - (ii) pregradno funkcijo;
  - (iii) morfologijo;
  - (iv) obnovljivost in napovedljivost;
  - (v) kontrole kakovosti modela;
- navedba podatkov o modelu iz preteklih preskusov. To mora med drugim vključevati sprejemljivost podatkov o kontroli kakovosti s sklicevanjem na podatke o seriji, pridobljene v preteklosti.
  - dokaz o usposobljenosti za izvajanje preskusne metode pred redno uporabo s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti.

*Preskusni postopek:*

- podrobnosti o uporabljenem preskusnem postopku (vključno s postopki spiranja, ki se uporabijo po obdobju izpostavljenosti); odmerki uporabljene preskusne kemikalije in kontrolnih kemikalij;
- trajanje in temperatura izpostavljenosti in obdobja inkubacije po izpostavljenosti;
- navedba kontrol, uporabljenih za snovi, ki neposredno zmanjšajo MTT, in/ali barvilnih preskusnih kemikalij, če je ustrezno;
- število ponovljenih vzorcev tkiv, uporabljenih za vsako preskusno kemikalijo in kontrole (pozitivna kontrola, negativna kontrola in NSMTT, NSC<sub>živo</sub> in NSC<sub>odmrlo</sub>, če je ustrezno);
- opis uporabljenih meril za odločanje/napovednega modela na podlagi uporabljenega modela rekonstruirane človeške pokožnice;
- opis morebitnih prilagoditev preskusnega postopka (vključno s postopki spiranja).

*Merila za sprejemljivost ponovitve in preskusa:*

- srednje vrednosti pozitivne in negativne kontrole ter razponi sprejemljivosti na podlagi podatkov iz preteklih preskusov; sprejemljiva variabilnost med ponovljenimi vzorci tkiv za pozitivne in negativne kontrole;
- sprejemljiva variabilnost med ponovljenimi vzorci tkiv za preskusno kemikalijo.

*Rezultati:*

- preglednice s podatki o posamezni preskusni kemikaliji za vsako ponovitev in vsako ponovljeno meritev, vključno z optično gostoto ali površino vrha formazana MTT, deležem viabilnosti tkiv, povprečnim deležem viabilnosti tkiv in standardnim odklonom;
- če je ustrezno, rezultati kontrol, uporabljenih za snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, in/ali barvilne preskusne kemikalije, vključno z optično gostoto ali površino vrha

formazana MTT, % NSMTT, % NSC<sub>živo</sub>, % NSC<sub>odmrlo</sub>, standardnim odklonom, končnim pravičnim deležem viabilnosti tkiv;

- rezultati, dobljeni s preskusnimi kemikalijami in kontrolami glede na opredeljena merila za sprejemljivost ponovitve in preskusa;
- opis drugih opaženih učinkov;
- izpeljana razvrstitev z navedbo uporabljenega napovednega modela/meril za odločitev.

*Razprava o rezultatih*

*Sklepne ugotovitve*

## VIRI

- (1) Združeni narodi (ZN) (2013). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS), druga revidirana izdaja, ZN New York in Ženeva, 2013. Na voljo na: [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', izdal ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 9. april 2009. Na voljo na: [https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31\\_skin-irritation-statement\\_20090922.pdf](https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf)
- (3) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 203), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (4) Poglavje B.4 te priloge, Akutno draženje kože, jedkost za kožo.
- (5) Poglavje B.40 te priloge, Jedkost za kožo *in vitro*: transkutana električna upornost (TER).
- (6) Poglavje B.40a te priloge, Jedkost za kožo *in vitro*: preskusna metoda rekonstruirane človeške pokožnice.
- (7) Poglavje B.65 te priloge, Preskusna metoda membranske pregrade *in vitro*.
- (8) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 220). Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 34), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (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., in Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57–93.

- (11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C., in Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765–770.
- (12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B., in Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, 107–114.
- (13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D., in Spielmann, H. (2005). The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351–367.
- (14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R., in Rubinstein, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, 329–349.
- (15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P. A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R. D., Elliot, G. R., Fentem, J. H., Heylings, J. R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J. J. M., Wiemann, C., in Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109–129.
- (16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I., in Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559–601.
- (17) Hoffmann, S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1- $\alpha$ .
- (18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I., in Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, 603–619.
- (19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonnaud, E., in Leclaire, J. (2007). *In Vitro* Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, *ALTEX*, 14, 351–358.

- (20) EURL-ECVAM (2007). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation, izdal ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27. april 2007. Na voljo na: [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. *Opomba: to so prvotni standardi izvajanja za validacijo dveh preskusnih metod. Ti standardi izvajanja se ne smejo več uporabljati, ker je zdaj na voljo posodobljena različica (8).*
- (22) EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, izdal ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5. november 2008. [https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC\\_Statement\\_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf](https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf)
- (23) OECD (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment (št. 137), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T., in Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol Sci*, 34, 327–334.
- (25) Katoh, M., in Hata, K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, 16, 111–122.
- (26) OECD (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 159), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (27) OECD (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 155), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (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., in Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33–50.

- (29) Welss, T., Basketter, D. A., in Schröder, K. R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In Vitro* 18, 231–243.
- (30) Eskes, C., *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62, 393–403.
- (31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- (32) EpiSkin™ (februar 2009). SOP, Version 1.8 ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals
- (33) EpiDerm™ (revidirano marca 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 (februar 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.
- (35) LabCyte (junij 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., in 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. Rokopis v pripravi.
- (37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Maj 2001. Na voljo na: [<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>].
- (38) Harvell, J. D., Lamminstausta, K., in Maibach, H. I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, v: Practical Contact Dermatitis, str. 7–18, (ur. Guin, J. D.). Mc Graw-Hill, New York.
- (39) EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *Opomba: to je trenutna različica standardov izvajanja ECVAM, posodobljena leta 2009 zaradi izvajanja GHS ZN. Ti standardi izvajanja se ne smejo več*

*uporabljati, ker je zdaj na voljo posodobljena različica (8), povezana s to smernico za preskušanje.*

- (40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, izdal ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8. julij 2009.
- (41) ES (2001). Direktiva Komisije 2001/59/ES z dne 6. avgusta 2001 o 28. prilagoditvi tehničnemu napredku Direktive Sveta 67/548/EGS o približevanju zakonov in drugih predpisov v zvezi z razvrščanjem, pakiranjem in označevanjem nevarnih snovi, *Uradni list Evropske unije*, L 225, str. 1–333.

## Dodatek 1

### OPREDELITVE POJMOV

**Točnost:** stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz ‚skladnost‘ se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusne metode (9).

**Viabilnost celic:** parameter za merjenje celotne dejavnosti celične populacije, npr. zmožnosti celičnih mitohondrijskih dehidrogenaz za redukcijo vitalnega barvila MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid, tiazolil modro), ki se glede na izmerjeno končno točko in uporabljeni načrt preskusa ujema s skupnim številom in/ali vitalnostjo živih celic.

**Kemikalija:** pomeni snov ali zmes.

**Skladnost:** je merilo učinkovitosti za preskusne modele, s katerimi se pridobijo kategorični rezultati, in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz točnost se včasih uporabljata kot sopomenki in pomenita delež vseh preskušanih kemikalij, ki so pravilno razvrščene kot pozitivne ali negativne. Skladnost je zelo odvisna od razširjenosti pozitivnih rezultatov v vrstah preučevane preskusne kemikalije (9).

**ET<sub>50</sub>:** lahko se oceni z določanjem časa izpostavljenosti, ki je potreben za zmanjšanje viabilnosti celic za 50 % po nanosu določene stalne koncentracije primerjalne kemikalije, glej tudi IC<sub>50</sub>.

**GHS (globalno usklajeni sistem Združenih narodov (ZN) za razvrščanje in označevanje kemikalij):** sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudi (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (1).

**HPLC:** tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (High Performance Liquid Chromatography).

**IATA:** Integrated Approach to Testing and Assessment (celostni pristop k testiranju in ocenjevanju).

**IC<sub>50</sub>:** lahko se oceni z določanjem koncentracije, pri kateri primerjalna kemikalija po določenem času izpostavljenosti zmanjša viabilnost tkiv za 50 % (IC<sub>50</sub>), glej tudi ET<sub>50</sub>.

**Prevelik odmerek:** količina na pokožnico nanesene preskusne kemikalije, ki je večja od količine, potrebne za celotno in enakomerno prekritje površine pokožnice.

**Zmes:** zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi.

**Snov iz ene sestavine:** snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je vsaj 80 mas. % glavne sestavine.

**MTT:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid; tiazolil modro tetrazol bromid.

**Snov z več sestavinami:** snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je več glavnih sestavin s koncentracijo  $\geq 10$  mas. % in  $< 80$  mas. %. Snov z več sestavinami je rezultat proizvodnega postopka. Razlika med zmesjo in snovjo z več sestavinami je v tem, da je zmes pridobljena z mešanjem dveh ali več snovi brez kemične reakcije. Snov z več sestavinami je rezultat kemične reakcije.

**NSC<sub>odmrlo</sub>:** nespecifična barva v odmrlih tkivih.

**NSC:** nespecifična barva v živih tkivih.

**NSMTT:** nespecifična redukcija MTT.

**Standardi izvajanja (SI):** standardi, ki temeljijo na validirani preskusni metodi in so podlaga za oceno primerljivosti predlagane preskusne metode, ki je funkcijsko in mehanistično podobna. Vključujejo: (i) nujne elemente preskusne metode; (ii) najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij, izbranih iz skupine kemikalij, ki se uporabljajo za dokazovanje sprejemljive učinkovitosti validirane preskusne metode, ter (iii) primerljive stopnje točnosti in zanesljivosti, ki temeljijo na rezultatih validirane preskusne metode, kar mora dokazati predlagana preskusna metoda pri ocenjevanju ob uporabi najkrajšega možnega seznama referenčnih kemikalij (9).

**PC:** pozitivna kontrola, ponovljen vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s kemikalijo, za katero je znano, da povzroči pozitiven odziv. Za zagotovitev, da se lahko variabilnost odziva pozitivne kontrole oceni v daljšem časovnem obdobju, pa stopnja pozitivnega odziva ne sme biti prevelika.

**Ustreznost:** opis razmerja med preskusom in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere se s preskusom pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Pri ustreznosti se upošteva tudi točnost (skladnost) preskusne metode (9).

**Zanesljivost:** stopnja obnovljivosti preskusne metode v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih (9).

**Nadomestni preskus:** preskus, ki nadomesti preskus, ki se redno uporablja in je uveljavljen za ugotavljanje nevarnosti in/ali oceno tveganja ter za katerega je bilo ugotovljeno, da v primerjavi z uveljavljenim preskusom v vseh mogočih okoliščinah preskušanja in za vse mogoče preskusne kemikalije zagotavlja enakovredno ali izboljšano varstvo zdravja ljudi ali živali ali okolja, kot je ustrezno (9).

**Ponovitev:** ponovitev zajema eno ali več preskusnih kemikalij, preskušeni sočasno z negativno in pozitivno kontrolo.

**Občutljivost:** delež vseh pozitivnih/aktivnih preskusnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (9).

**Draženje kože *in vivo*:** je nastanek povračljive poškodbe kože po nanosu preskusne kemikalije za največ 4 ure. Razdraženost kože je lokalna reakcija prizadetega kožnega tkiva, ki se pojavi kmalu po izpostavitvi kože draženju (38). Povzroči jo lokalna vnetna reakcija, v katero je vključen prirojeni (nespecifični) imunski sistem kožnega tkiva. Njena glavna lastnost je povračljiv proces, ki vključuje vnetne reakcije in večino značilnih kliničnih znakov razdraženosti (rdečino, oteklino, srbenje in bolečino), povezanih z vnetnim procesom.

**Specifičnost:** delež vseh negativnih/neaktivnih preskusnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (9).

**Snov:** kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo.

**Preskusna kemikalija:** vsaka snov ali zmes, preskušena z uporabo te preskusne metode.

**UPLC:** tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti (Ultra-High Performance Liquid Chromatography).

**UVCB:** snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

## Dodatek 2

### PRESKUSNI MODELI, VKLJUČENI V TO PRESKUSNO METODO

Št.	Ime preskusnega modela	Vrsta validacijske študije	Viri
1	<b>EpiSkin™</b>	Celovita prospektivna validacijska študija (2003–2007). Elementi tega modela so bili uporabljeni za opredelitev bistvenih elementov preskusne metode prvotnih in posodobljenih standardov izvajanja ECVAM (39) (40) (21)*. Poleg tega so bili podatki o metodi, ki se nanašajo na razlikovanje med nerazvrščenimi in razvrščenimi snovmi, glavna podlaga za opredelitev vrednosti specifičnosti in občutljivosti prvotnih standardov izvajanja*.	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	<b>EpiDerm™ SIT (EPI-200)</b>	<b>EpiDerm™ (prvotni)</b> : preskusni model je bil najprej predmet celovite prospektivne validacije skupaj s št. 1. iz obdobja 2003–2007. Elementi tega modela so bili uporabljeni za opredelitev bistvenih elementov preskusnih metod prvotnih in posodobljenih standardov izvajanja ECVAM (39) (40) (21)*. <b>EpiDerm™ SIT (EPI-200)</b> : prilagoditev prvotnega modela EpiDerm™ je bila validirana z uporabo prvotnih standardov izvajanja ECVAM (21) v letu 2008*.	(2) (10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40)  (2) (21) (22) (23) (33)
3	<b>SkinEthic™ RHE</b>	Validacijska študija na podlagi prvotnih standardov izvajanja ECVAM (21) v letu 2008*.	(2) (21) (22) (23) (31)
4	<b>LabCyte EPI-MODEL24 SIT</b>	Validacijska študija (2011–2012) na podlagi standardov izvajanja iz Smernice OECD za preskušanje 439 (8), ki temeljijo na posodobljenih standardih izvajanja ECVAM* (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) in standardi izvajanja te smernice za preskušanje (8)*

\* Prvotni standardi izvajanja ECVAM (21) so bili pripravljene leta 2007 po koncu prospektivne validacijske študije (16), s katero se je ocenila učinkovitost preskusnih modelov št. 1 in 2 glede na sistem razvrščanja, opisan v 28. spremembi direktive EU o nevarnih snoveh (41). Leta 2008 sta bila uvedena GHS ZN (1) in uredba CLP, s katerima se je mejna vrednost za razlikovanje med nerazvrščenimi in razvrščenimi snovmi na podlagi rezultata *in vivo* dejansko dvignila z 2,0 na 2,3. Zaradi prilagoditve tej spremenjeni regulativni zahtevi so bili v letu 2009 posodobljeni vrednosti točnosti in seznam referenčnih kemikalij iz standardov izvajanja ECVAM (2) (39) (40). Tako kot prvotni standardi izvajanja so tudi posodobljeni standardi izvajanja večinoma temeljili na podatkih iz modelov št. 1 in 2 (16), vendar so se dodatno uporabili tudi podatki o referenčnih kemikalijah iz modela št. 3. Leta 2010 so bili posodobljeni standardi izvajanja ECVAM uporabljeni za določitev standardov izvajanja, povezanih s temi smernicami za preskušanje (8). Za namen te preskusne metode se model EpiSkin™ šteje za VRM, ker je bil uporabljen za pripravo vseh meril standardov izvajanja. Podrobne informacije o validacijskih študijah, zbirka pridobljenih podatkov in ozadje nujnih prilagoditev standardov izvajanja zaradi izvajanja GHS ZN/uredbe CLP so na voljo v obrazložitenem referenčnem dokumentu ECVAM/BfR k ustreznim smernicam OECD za preskušanje 439 (23).

SIT: preskus draženja kože.

RHE: rekonstruirana človeška pokožnica.

### Dodatek 3

## PARAMETRI PROTOKOLA, SPECIFIČNI ZA VSAKEGA OD PRESKUSNIH MODELOV, VKLJUČENIH V TO PRESKUSNO METODO

Modeli rekonstruirane človeške pokožnice (RhE) dejansko prikazujejo zelo podobne protokole, zlasti vsi uporabljajo 42-urno obdobje po inkubaciji (32) (33) (34) (35). Razlike se nanašajo predvsem na tri parametre v zvezi z različnimi pregradnimi funkcijami preskusnih modelov, in sicer: (A) čas predhodne inkubacije in količina, (B) nanos preskusnih kemikalij in (C) količina po inkubaciji.

	<b>EpiSkin™ (SM)</b>	<b>EpiDerm™ SIT (EPI-200)</b>	<b>SkinEthicRHE™</b>	<b>LabCyteEPI- MODEL24 SIT</b>
<b>(A) Predhodna inkubacija</b>				
Čas inkubacije	18–24 ur	18–24 ur	< 2 uri	15–30 ur
Količina medija	2 ml	0,9 ml	0,3 ali 1 ml	0,5 ml
<b>(B) Nanos preskusne kemikalije</b>				
Za tekočine	10 µl (26 µl/cm <sup>2</sup> )	30 µl (47 µl/cm <sup>2</sup> )	16 µl (32 µl/cm <sup>2</sup> )	25 µl (83 µl/cm <sup>2</sup> )
Za trdne snovi	10 mg (26 mg/cm <sup>2</sup> ) + DV (5 µl)	25 mg (39 mg/cm <sup>2</sup> ) + DPBS (25 µl)	16 mg (32 mg/cm <sup>2</sup> ) + DV (10 µl)	25 mg (83 mg/cm <sup>2</sup> ) + DV (25 µl)
Uporaba najlonske mrežice	se ne uporablja	po potrebi	uporabljena	se ne uporablja
Skupni čas nanosa	15 minut	60 minut	42 minut	15 minut
Temperatura ob nanosu	ST	(a) 25 minut pri ST (b) 35 minut pri 37 °C	ST	ST
<b>(C) Količina po inkubaciji</b>				
Količina medija	2 ml	0,9 ml x 2	2 ml	1 ml
<b>(D) Največja sprejemljiva razlika</b>				
Standardni odklon med ponovljenimi vzorci tkiv	SO18	SO18	SO18	SO18

ST: sobna temperatura.

DV: destilirana voda.

DPBS: Dulbeccov fosfatni pufer s soljo.

#### Dodatek 4

### KLJUČNI PARAMETRI IN MERILA ZA SPREJEMLJIVOST ZA USTREZNOST SISTEMA SPEKTROFOTOMETRIJE HPLC/UPLC ZA MERJENJE FORMAZANA MTT, EKSTRAHIRANEGA IZ TKIV REKONSTRUIRANE ČLOVEŠKE POKOŽNICE (RHE)

Parameter	Protokol, izpeljan iz smernic FDA (36) (37)	Merila za sprejemljivost
Selektivnost	Analiza izopropanola, živega slepega vzorca (izvleček izopropanola iz živih tkiv rekonstruirane človeške pokožnice brez kakršnega koli tretiranja), odmrlega slepega vzorca (izvleček izopropanola iz odmrlih tkiv rekonstruirane človeške pokožnice brez kakršnega koli tretiranja).	$Površina_{interferenca} \leq 20 \% površine_{LLOQ}^1$ .
Natančnost	kontrola kakovosti (tj. formazan MTT pri 1,6 µg/ml, 16 µg/ml in 160 µg/ml) v izopropanolu (n = 5).	$KV \leq 15 \%$ ali $\leq 20 \%$ za LLOQ.
Točnost	kontrola kakovosti v izopropanolu (n = 5).	$\% Dev \leq 15 \%$ ali $\leq 20 \%$ za LLOQ.
Vpliv matriksa	Kontrola kakovosti v živem slepem vzorcu (n = 5).	$85 \% \leq$ vpliv matriksa $\% \leq 115 \%.$
Prenos	Analiza izopropanola po standardu ULOQ <sup>2</sup> .	$Površina_{interferenca} \leq 20 \% površine_{LLOQ}.$
Obnovljivost (znotraj dneva)	3 neodvisne umeritvene krivulje (na podlagi 6 zaporednih tretjinskih razredčin formazana MTT v izopropanolu, ki se začnejo pri ULOQ, tj. 200 µg/ml); kontrola kakovosti v izopropanolu (n = 5).	Umeritvene krivulje: $\% Dev \leq 15 \%$ ali $\leq 20 \%$ za LLOQ.
Obnovljivost (med dnevi)	1. dan: 1 umeritvena krivulja in kontrola kakovosti v izopropanolu (n = 3). 2. dan: 1 umeritvena krivulja in kontrola kakovosti v izopropanolu (n = 3). 3. dan: 1 umeritvena krivulja in kontrola kakovosti v izopropanolu (n = 3).	Kontrola kakovosti: $\% Dev \leq 15 \%$ in $KV \leq 15 \%.$
Kratkoročna stabilnost formazana MTT v izvlečku tkiva rekonstruirane človeške pokožnice	Kontrola kakovosti v živih slepih vzorcih (n = 3), analiziranih na dan priprave in po 24 urah hrambe pri sobni temperaturi.	$\% Dev \leq 15 \%.$
Dolgoročna stabilnost formazana MTT v izvlečku tkiva rekonstruirane človeške pokožnice, če je potrebno	Kontrola kakovosti v živih slepih vzorcih (n = 3), analiziranih na dan priprave in po več dneh hrambe pri določeni temperaturi (npr. 4 °C, -20 °C, -80 °C).	$\% Dev \leq 15 \%.$

<sup>1</sup> LLOQ: spodnja meja kvantifikacije (Lower Limit of Quantification), opredeljena tako, da zajema 1–2-odstotno viabilnost tkiva, tj. 0,8 µg/ml.

<sup>2</sup> ULOQ: zgornja meja kvantifikacije (Upper Limit of Quantification), opredeljena tako, da je vsaj dvakrat višja od najvišje pričakovane koncentracije formazana MTT v izvlečkih izopropanola iz negativnih kontrol, tj. 200 µg/ml.“

(8) V delu B se dodajo naslednja poglavja:

## **„B.63 PRESEJALNI PRESKUS TOKSIČNOSTI ZA RAZMNOŽEVANJE/RAZVOJ**

### **UVOD**

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 421 (2016). Smernice OECD za preskušanje kemikalij se redno pregledujejo ob upoštevanju znanstvenega napredka. Prvotna smernica za presejalni preskus 421 je bila sprejeta leta 1995 na podlagi protokola za ‚predhodni presejalni preskus toksičnosti za razmnoževanje‘, o katerem se je razpravljalo na dveh strokovnih srečanjih, in sicer leta 1990 v Londonu (1) in leta 1992 v Tokiu (2).
2. Ta preskusna metoda je bila posodobljena z ustreznimi končnimi točkami za endokrine motilce kot nadaljnji ukrep v okviru prednostne dejavnosti, ki jo je OECD začela izvajati leta 1998, da bi pregledala obstoječe smernice za preskušanje ter pripravila nove smernice za presejalne preskuse in preskušanje potencialnih endokrinih motilcev (3). Smernica OECD za preskušanje 407 (28-dnevna študija oralne toksičnosti s ponavljajočimi se odmerki na glodavcih, poglavje B.7 te priloge) je bila na primer leta 2008 izboljšana s parametri, primernimi za zaznavanje endokrinega delovanja preskusnih kemikalij. Namen posodobitve Smernice za preskušanje 421 je bil, da se v smernice za presejalno preskušanje vključijo nekatere ustrezne končne točke za endokrine motilce, kadar obdobja izpostavljenosti zajemajo nekatera občutljiva obdobja med razvojem (pred rojstvom ali malo po rojstvu).
3. Izbrane dodatne ustrezne končne točke za endokrine motilce, ki so tudi del Smernice za preskušanje 443 (razširjene študije toksičnosti za razmnoževanje na eni generaciji, poglavje B.56 te priloge), so bile v Smernico za preskušanje 421 vključene na podlagi študije izvedljivosti, s katero so se obravnavala znanstvena in tehnična vprašanja, povezana z njihovo vključitvijo, ter morebitne prilagoditve načrta preskusa, potrebne za njihovo vključitev (4).
4. Ta preskusna metoda naj bi zagotovila omejene informacije v zvezi z učinki preskusne kemikalije na sposobnost razmnoževanja pri samcih in samicah, kot so funkcija spolnih žlez, obnašanje pri parjenju, spočetje, razvoj zarodka in kotitev. Ni alternativa obstoječim preskusnim metodam B.31, B.34, B.35 ali B.56 niti jih ne nadomešča.

### **ZAČETNI PREUDARKI**

5. Ta metoda presejalnega preskusa se lahko uporablja za zagotovitev začetnih informacij o morebitnih učinkih na razmnoževanje in/ali razvoj bodisi v zgodnji fazi ocenjevanja toksikoloških lastnosti kemikalij bodisi v zvezi s kemikalijami, ki vzbujajo zaskrbljenost.

Uporabi se lahko tudi v okviru sklopa začetnih presejalnih preskusov za obstoječe kemikalije, za katere je na voljo malo ali nič toksikoloških informacij, kot študija za določanje območja odmerka za obsežnejše razmnoževalne/razvojne študije ali če se zdi pomembna kako drugače. Pri izvajanju študije je treba upoštevati vodilna načela in preudarke iz Smernice OECD 19 o prepoznavanju, oceni in uporabi kliničnih znakov kot humanih končnih točk za preskusne živali, ki se uporabljajo pri ocenah varnosti (5).

6. Ta preskusna metoda ne zagotavlja popolnih informacij o vseh vidikih razmnoževanja in razvoja. Zlasti zagotavlja samo omejene načine, kako po rojstvu zaznavati pojavnne oblike izpostavljenosti pred rojstvom ali učinke, ki jih lahko povzroči izpostavljenost po rojstvu. Zaradi (med drugim) razmeroma majhnega števila živali v skupinah, ki prejemajo odmerke, selektivnosti končnih točk in kratkotrajnosti študije ta metoda ne zagotavlja dokazov za dokončne trditve o neobstoju učinkov. Če ni podatkov iz drugih preskusov toksičnosti za razmnoževanje/razvoj, so poleg tega pozitivni rezultati koristni za začetno oceno nevarnosti in prispevajo k odločitvam v zvezi z nujnostjo in časovnim okvirom dodatnega preskušanja.
7. Rezultate, ki se dobijo s parametri, povezanimi z endokrinim sistemom, je treba obravnavati v okviru temeljnega okvira OECD za preskušanje in ocenjevanje kemikalij, ki povzročajo endokrine motnje (Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals) (6). V tem temeljnem okviru je izboljšana Smernica OECD za preskušanje 421 vključena na ravni 4 kot preskus *in vivo*, ki zagotavlja podatke o škodljivih učinkih na ustrezne končne točke za endokrini sistem. Vendar zgolj endokrinega signala ni mogoče šteti za zadosten dokaz, da je preskusna kemikalija endokrini motilec.
8. Pri tej preskusni metodi je predvideno oralno dajanje preskusne kemikalije. Če se uporabijo drugi načini izpostavljenosti, so morda potrebne prilagoditve.
9. Preden se preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni.
10. Opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

## **NAČELO PRESKUSA**

11. Preskusna kemikalija se daje v stopnjevanih odmerkih več skupinam samcev in samic. Samcem je treba dajati odmerke najmanj štiri tedne in do vključno dneva pred predvideno usmrtnitvijo (to vključuje vsaj dva tedna pred parjenjem, obdobje parjenja in približno dva tedna po parjenju). Glede na omejeno obdobje odmerjanja pred parjenjem pri samcih plodnost morda ni posebno občutljiv kazalnik toksičnosti za moda. Zato je bistven podroben histološki pregled mod. Kombinacija dvotedenskega obdobja odmerjanja pred

parjenjem in poznejših opazovanj parjenja/plodnosti s skupno vsaj štiritedenskim obdobjem odmerjanja, ki mu sledi podroben histopatološki pregled spolnih žlez samcev, se šteje za zadostno, da se lahko zazna večina učinkov na plodnost pri samcih in spermatogenezo.

12. Samicam je treba dajati odmerke med celotno študijo. To vključuje dva tedna pred parjenjem (da se zajameta vsaj dva popolna pojatvena cikla), različen čas do spočetja, trajanje brejosti in vsaj 13 dni po kotitvi, do vključno dneva pred predvideno usmrtnitvijo.
13. Trajanje študije (po aklimatizaciji in oceni pojatvenega cikla pred odmerjanjem) je odvisno od delovanja samice in traja približno 63 dni (vsaj 14 dni pred parjenjem, (do) 14 dni parjenja, 22 dni brejosti, 13 dni laktacije).
14. V obdobju dajanja odmerkov je treba živali vsak dan pozorno opazovati, ali kažejo znake zastrupitve. Na živalih, ki med preskusnim obdobjem poginejo ali so usmrčene, se opravi obdukcija, ob koncu preskusa pa se tudi preživele živali usmrtijo in obducirajo.

## **OPIS METODE**

### **Izbira živalskih vrst**

15. Pri tej preskusni metodi naj bi se uporabljale podgane. Če se parametri, določeni pri tej preskusni metodi, preiskujejo na drugi vrsti glodavcev, je treba to podrobno utemeljiti. V mednarodnem validacijskem programu za zaznavanje endokrinih motilcev v Smernicah OECD za preskušanje 407 (ustreza poglavju B.7 te priloge) je bila podgana edina uporabljena vrsta. Sevi z nizko plodnostjo ali dobro znano visoko pojavnostjo razvojnih napak se ne smejo uporabljati. Uporabiti je treba zdrave živali, ki se še niso parile in niso bile izpostavljene predhodnim preskusnim postopkom. Opredeliti je treba vrsto, sev, spol, težo in starost preskusnih živali. Na začetku študije morajo biti razlike v teži uporabljenih živali čim manjše in ne smejo presegati 20 % povprečne teže za vsak spol. Če se študija izvaja kot predhodna študija za dolgotrajno študijo ali študijo celotne generacije, je priporočljivo, da se v obeh študijah uporabijo živali iz istega seva in vira.

### **Nastanitev in hranjenje**

16. Vsi postopki morajo biti v skladu z lokalnimi standardi oskrbe laboratorijskih živali. Temperatura v prostoru s preskusnimi živalmi mora znašati 22 °C ( $\pm 3$  °). Čeprav mora biti relativna vlažnost vsaj 30-odstotna in po možnosti ne sme presegati 70 %, razen med čiščenjem prostora, si je treba prizadevati za 50–60-odstotno vlažnost. Osvetlitev mora biti umetna s svetlobnim ciklom 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja običajna laboratorijska hrana z neomejeno količino pitne vode. Na izbiro hrane lahko vpliva potreba po zagotovitvi ustrezne primesi preskusne kemikalije, če se daje po tej metodi.

17. Živali morajo biti nastanjene v majhnih skupinah istega spola; posamično so lahko nastanjene, če je to znanstveno utemeljeno. Pri skupinski nastanitvi je lahko v kletki največ pet živali. Parjenje se mora izvajati v kletkah, ki so primerne za ta namen. Breje samice morajo biti v svojih kletkah in imeti na voljo material za izdelavo gnezda. Samice v laktaciji so v svojih kletkah skupaj z mladiči.
18. Hrano je treba redno analizirati, da ne vsebuje kontaminantov. Vzorec hrane je treba hraniti, dokler poročilo ni končano.

### **Priprava živali**

19. Zdrave mlade odrasle živali se naključno dodelijo kontrolnim in tretiranim skupinam. Kletke je treba razporediti tako, da se čim bolj zmanjšajo morebitni učinki, ki nastanejo zaradi razporeditve kletk. Živali se označijo z enkratnimi oznakami in zadržijo v kletkah vsaj pet dni pred začetkom študije, da se prilagodijo na laboratorijske razmere.

### **Priprava odmerkov**

20. Priporoča se, da se preskusna kemikalija daje oralno, razen če se šteje drug način dajanja za primernejšega. Če se izbere oralni način, se preskusna kemikalija običajno daje z gavažo, lahko pa tudi s hrano ali pitno vodo.
21. Po potrebi se preskusna kemikalija raztopi ali suspendira v ustreznem vehiklu. Priporočljivo je, da se, če je mogoče, najprej preuči možnost uporabe vodne raztopine/suspenzije, nato raztopine/emulzije v olju (npr. koruznem), šele potem pa možnost raztopine v drugih vehiklih. V primeru vehiklov, ki niso voda, je treba poznati toksične lastnosti takega vehikla. Določiti je treba stabilnost in homogenost preskusne kemikalije v vehiklu.

## **POSTOPEK**

### **Število in spol živali**

22. Priporočljivo je, da se v vsaki skupini začne z vsaj 10 samci in 12–13 samicami. Pri samicah se pred izpostavitvijo oceni pojatvena cikličnost; živali, ki nimajo značilnih 4–5-dnevnih ciklusov, se ne vključijo v študijo; zato se priporočajo dodatne samice za zagotovitev, da je v vsaki skupini 10 samic. Razen v primeru izrazitih toksičnih učinkov naj bi se tako dobilo vsaj 8 brejih samic na skupino, kar je običajno najnižje sprejemljivo število brejih samic na skupino. Cilj je dobiti dovolj brejih samic in mladičev, da je zagotovljeno smiselno ovrednotenje potenciala preskusne kemikalije za vplivanje na plodnost, brejost in materinsko obnašanje ter sesanje, rast in razvoj potomcev F<sub>1</sub> od spočetja do 13. dne po skotitvi.

### **Odmerjanje**

23. Običajno je treba uporabiti najmanj tri preskusne skupine in eno kontrolno skupino. Velikosti odmerkov lahko temeljijo na informacijah iz preskusov akutne toksičnosti ali rezultatih študij s ponavljajočimi se odmerki. Razen tretiranja s preskusno kemikalijo je treba živali v kontrolni skupini obravnavati enako kot živali v preskusni skupini. Če se pri dajanju preskusne kemikalije uporablja vehikel, mora kontrolna skupina prejeti največjo uporabljeno količino vehikla.
24. Pri izbiri velikosti odmerkov je treba upoštevati vse obstoječe podatke o toksičnosti in (toksiko-)kinetiki, ki so na voljo. Upoštevati je treba tudi, da lahko obstajajo razlike v občutljivosti med brejimi in nebregimi živalmi. Izbrati je treba največjo velikost odmerka, da se povzročijo toksični učinki, ne pa tudi pogin ali hudo trpljenje. Nato je treba izbrati padajoče zaporedje velikosti odmerkov, da se pokažejo vsi odzivi, ki so odvisni od odmerjanja, in ugotovi najmanjša velikost odmerka, pri kateri ni opaženih škodljivih učinkov (NOAEL). Za določanje padajočih velikosti odmerkov je velikokrat najbolje uporabiti dva- do štirikratne intervale, namesto zelo velikih intervalov (npr. večjih od desetkratnika) med odmerjanji pa je pogosto primerneje dodati še četrto preskusno skupino.
25. Če se ugotovijo splošna toksičnost (npr. zmanjšana telesna teža, učinki na jetra, srce, pljuča ali ledvice itd.) ali druge spremembe, ki morda niso toksične reakcije (npr. zmanjšan vnos hrane, povečanje jeter), je potrebna previdnost pri razlagi ugotovljenih učinkov na endokrine občutljive končne točke.

### **Mejni preskus**

26. Če pri oralni študiji pri odmerku, velikem najmanj 1 000 mg/kg telesne teže/dan, ali pri enakovrednem deležu v hrani ali pitni vodi pri vnosu s hrano ali pitno vodo, pri katerem so uporabljeni postopki, opisani za to študijo, ne nastanejo opazni toksični učinki in če na podlagi podatkov o strukturno sorodnih snoveh toksičnost ni pričakovana, popolna študija z več velikostmi odmerkov morda ni potrebna. Mejni preskus se uporabi, razen če izpostavljenost človeka nakazuje potrebo po uporabi večjega oralnega odmerka. Pri drugih načinih dajanja, na primer pri vdihavanju ali dermalni aplikaciji, lahko fizikalno-kemijske lastnosti preskusne kemikalije pogosto določajo največjo dosegljivo koncentracijo.

### **Dajanje odmerkov**

27. Živalim se dajejo odmerki preskusne kemikalije sedem dni na teden. Če se preskusna kemikalija daje z gavažo, jo je treba živali dati v enkratnem odmerku z uporabo želodčne sonde ali primerne intubacijske kanile. Največja količina tekočine, ki se lahko da naenkrat, je odvisna od velikosti preskusne živali. Količina ne sme presegati 1 ml/100 g telesne teže, razen v primeru vodnih raztopin, pri katerih se lahko uporabi 2 ml/100 g telesne teže. Razen pri dražilnih ali jedkih preskusnih kemikalijah, ki pri večjih koncentracijah navadno povzročijo močnejše učinke, je treba s prilagajanjem koncentracije čim bolj zmanjšati

spremenljivost preskusne količine, da se zagotovi stalna količina pri vseh velikostih odmerkov.

28. Pri preskusnih kemikalijah, ki se dajejo s hrano ali pitno vodo, je treba zagotoviti, da količine uporabljene preskusne kemikalije ne vplivajo na normalno prehranjevanje ali vodno ravnotežje. Če se preskusna kemikalija daje s hrano, se lahko uporabi konstantna koncentracija v hrani (ppm) ali pa konstantna velikost odmerka glede na telesno težo živali; uporabljeni način je treba navesti. Če se preskusna kemikalija daje z gavažo, je treba odmerke dajati vsak dan ob približno istem času in jih najmanj enkrat tedensko prilagajati, da se vzdržuje konstantna velikost odmerka glede na telesno težo živali.

### **Načrt za poskus**

29. Odmerjanje obema spoloma se mora začeti vsaj 2 tedna pred parjenjem, potem ko so se živali aklimatizirale vsaj pet dni in so bile samice pregledane, ali imajo normalen pojavni cikel (v dvotedenskem obdobju pred tretiranjem). Študija mora biti načrtovana tako, da se ocenjevanje pojatvenega ciklusa začne kmalu potem, ko živali dosežejo polno spolno zrelost. To se lahko pri različnih sevih podgan v različnih laboratorijih nekoliko razlikuje, npr. pri podganah seva Sprague Dawley se zgodi pri 10 tednih starosti, pri podganah seva Wistar pa pri približno 12 tednih starosti. Matere s potomci je treba usmrtiti 13. dan po porodu ali kmalu zatem. Dan rojstva (tj. ko je končana kotitev) je opredeljen kot poporodni dan 0. Samice, za katere ni dokazov o kopulaciji, se usmrtijo 24–26 dni po zadnjem dnevu obdobja parjenja. Odmerjanje se pri obeh spolih nadaljuje še v obdobju parjenja. Po obdobju parjenja je treba samcem dajati odmerke še vsaj toliko časa, dokler ni doseženo najkrajše skupno obdobje odmerjanja 28 dni. Nato se usmrtijo ali pa se ohranijo pri življenju in se jim še naprej dajejo odmerki za morebitno drugo parjenje, če se šteje za ustrezno.
30. Dnevno dajanje odmerkov starševskim samicam se mora nadaljevati skozi celotno brejost in vsaj do vključno 13. dne po porodu ali dneva pred usmrtitvijo. Pri študijah, pri katerih se preskusna kemikalija prejema z vdihavanjem ali po dermalni poti, se mora odmerjanje nadaljevati vsaj do vključno 19. dne brejosti, pri čemer je treba odmerjanje znova začeti takoj, ko je to mogoče, in najpozneje 4. dne po porodu.
31. Diagram načrta poskusa je prikazan v Dodatku 2.

### **Postopek parjenja**

32. Običajno je treba pri tej študiji uporabiti parjenje 1 : 1 (en samec na eno samico). Izjeme so možne v primeru občasnih poginov samcev. Samica mora biti nastanjena z istim samcem, dokler ni dokazov o kopulaciji ali dokler ne pretečeta dva tedna. Vsako jutro je treba samice pregledati za prisotnost semenčic ali vaginalnega zamaška. Dan brejosti 0 je opredeljen kot dan, na katerega so potrjeni dokazi o parjenju (opažen je vaginalni čep ali

semenčice). Če parjenje ni uspešno, se lahko razmisli o ponovnem parjenju samic z dokazanimi samci iste skupine.

### **Velikost legla**

33. Četrty dan po skotitvi se lahko velikost posameznega legla prilagodi z naključno izločitvijo odvečnih mladičev, tako da so po možnosti v vsakem leglu štirje ali pet mladičev vsakega spola, odvisno od običajne velikosti legla pri uporabljenem sevu podgan. Dvema od odvečnih mladičev je treba odvzeti vzorce krvi, jih združiti in uporabiti za določitev ravni T4 v serumu. Selektivno izločanje mladičev, npr. na podlagi telesne teže ali zadnjično-genitalne razdalje, ni ustrezno. Kadar zaradi števila mladih samcev in samic ni mogoče, da bi bili v vsakem leglu štirje ali pet mladičev na spol, je sprejemljiva tudi delna prilagoditev (na primer šest samcev in štiri samice). Mladiči se ne izločijo, če velikost legla pade pod ciljno vrednost za izločitev (8 ali 10 mladičev/leglo). Če je nad ciljno vrednostjo za izločitev na voljo samo en mladič, se izloči samo en mladič, ki se mu odvzame vzorec krvi za morebitne ocene T4 v serumu.
34. Če velikost legla ni prilagojena, se 4. dan po porodu usmrtita dva mladiča na leglo, ki se jima odvzamejo vzorci krvi za meritve serumskih koncentracij hormona ščitnice. Če je mogoče, naj bosta dva mladiča na leglo samici, da se mladi samci prihranijo za ocene razvitosti prsnih bradavic, razen če z izločitvijo teh mladičev ne bi bilo več na voljo samic za oceno ob usmrtitvi. Mladiči se ne izločijo, če velikost legla pade pod ciljno vrednost za izločitev 8 ali 10 mladičev na leglo (odvisno od običajne velikosti legla pri uporabljenem sevu podgan). Če je glede na običajno velikost legla na voljo en sam mladič, se izloči samo en mladič, ki se mu odvzame vzorec krvi za morebitne ocene T4 v serumu.

### **Opazovanja živih živali**

#### *Klinična opazovanja*

35. Med preskusnim obdobjem so splošna klinična opazovanja potrebna vsaj enkrat na dan, če se opazijo znaki toksičnosti, pa tudi pogosteje. Po možnosti jih je treba opraviti vsak dan ob istem času in ob upoštevanju obdobja največje intenzivnosti pričakovanih učinkov po vnosu odmerka. Evidentirati je treba pomembne vedenjske spremembe, znake težke ali podaljšane kotitve in vse znake toksičnosti, vključno s smrtnostjo. Pri znakih toksičnosti je treba evidentirati njihov čas nastanka, jakost in trajanje.

#### *Telesna teža in poraba hrane/vode*

36. Samce in samice je treba tehtati prvi dan dajanja odmerka, nato pa vsaj enkrat tedensko in ob usmrtitvi. Med brejostjo je treba samice tehtati na dneve 0, 7, 14 in 20, v 24 urah po kotitvi (dan 0 ali 1. dan po porodu) ter vsaj 4. in 13. dan po porodu. O teh opažanjih je treba posebej poročati za vsako odraslo žival.

37. Porabo hrane je treba v obdobju pred parjenjem, med brejostjo in laktacijo meriti vsaj enkrat na teden. Med parjenjem merjenje porabe hrane ni obvezno. V teh obdobjih je treba meriti tudi porabo vode, če se preskusna kemikalija daje s pitno vodo.

#### *Pojatveni ciklusi*

38. Pojavne cikluse je treba spremljati pred začetkom tretiranja, da se za študijo izberejo samice z rednimi ciklusi (glej odstavek 22). Dnevno je treba spremljati tudi vaginalne brise, in sicer od začetka obdobja tretiranja do dokazov o parjenju. Če obstajajo pomisleki glede učinkov akutnega stresa, zaradi katerih bi se lahko z začetkom odmerjanja spremenili pojavni ciklusi, lahko laboratoriji preskusne živali izpostavijo za 2 tedna in nato odvzamejo vaginalne brise, da dnevno spremljajo pojavni cikel vsaj dva tedna v obdobju pred parjenjem, pri čemer se spremljanje nadaljuje, dokler ni dokazov o parjenju. Med jemanjem celic nožnice/materničnega vratu je treba paziti, da ne pride do poškodb sluznice in posledično do psevdogavidnosti (7) (8).

#### *Parametri pri potomcih*

39. Evidentirati je treba trajanje brejosti, ki se računa od dneva brejosti 0. Vsako leglo je treba pregledati čim prej po skotitvi, da se ugotovijo število in spol mladičev, mrtvorojenih, živorojenih in spačkov (mladičev, ki so znatno manjši od ustreznih kontrolnih mladičev) ter večje nepravilnosti.

40. Žive mladiče je treba prešteti in določiti njihov spol, legla pa je treba stehtati v 24 urah po kotitvi (dan 0 ali 1. dan po porodu) ter vsaj 4. in 13. dan po porodu. Poleg opažanj, opisanih v odstavku 35, je treba evidentirati vsako nenavadno vedenje potomcev.

41. Zadnjično-genitalno razdaljo vsakega mladiča je treba izmeriti na isti poporodni dan, in sicer med poporodnim dnem 0 in 4. dnem po porodu. Podatke o telesni teži mladičev je treba zbrati na dan, ko se meri zadnjično-genitalna razdalja, slednjo pa je treba normirati na mero velikosti mladiča, po možnosti kubični koren telesne teže (9). Število prsnih bradavic/areol pri mladih samcih je treba prešteti 12. ali 13. dan po porodu, kot je priporočeno v Smernici OECD 151 (10).

#### **Klinična biokemija**

42. Vzorci krvi z določenega mesta se vzamejo po naslednjem razporedu:

- vsaj dvema mladičema na leglo 4. dan po porodu, če število mladičev to omogoča (glej odstavka 33 in 34);
- vsem materam in vsaj dvema mladičema na leglo ob usmrčitvi 13. dan ter
- vsem odraslim samcem ob usmrčitvi.

Vsi vzorci krvi se shranijo v ustreznih pogojih. V vzorcih krvi mladičev, starih 13 dni, in odraslih samcev se ocenijo serumske koncentracije hormonov ščitnice (T4). Dodatna ocena

T4 v vzorcih krvi mater in mladičev, starih 4 dni, se izvede po potrebi. Po potrebi se lahko izmerijo tudi drugi hormoni. Za analize hormonov ščitnice se lahko kri mladičev združi po leglih. Hormona ščitnice (T4 in TSH) je treba po možnosti meriti ‚skupaj‘.

43. Na spremenljivost in absolutne koncentracije pri določanju hormonov lahko vplivajo naslednji dejavniki:
- čas usmrtitve zaradi spreminjanja koncentracij hormonov preko dneva;
  - način usmrtitve, da se prepreči nepotreben stres pri živalih, ki lahko vpliva na koncentracije hormonov;
  - preskusni kompleti, ki se uporabljajo za določanje hormonov in se lahko razlikujejo po standardnih krivuljah.
44. Vzorce plazme, ki so predvideni posebej za določanje hormonov, je treba odvzeti ob primerljivih urah dneva. Številčne vrednosti, pridobljene pri analiziranju koncentracij hormonov, so pri različnih kompletih za analize, ki so na voljo na trgu, različne.

## **Patologija**

### *Makroskopska obdukcija*

45. Ob usmrtitvi ali poginu med študijo je treba odrasle živali makroskopsko pregledati za kakršne koli anomalije ali patološke spremembe. Posebno pozornost je treba posvetiti organom reproduktivnega sistema. Evidentirati je treba število ugnездitev. Zjutraj na dan obdukcije je treba pregledati vaginalne brise, da se ugotovi faza pojatvenega ciklusa in omogoči korelacija s histopatološkimi preiskavami jajčnikov.
46. Z mod, nadmodkov ter prostate in semenskih mešičkov s koagulacijskimi žlezami kot celote je treba pri vseh odraslih samcih, kot je ustrezno, odstraniti vsa priraščena tkiva in nato čim prej po disekciji izmeriti njihovo mokro težo, da se ne izsušijo. Poleg tega lahko teža neobveznih organov vključuje sistem mišice *levator ani* z bulbokavernozno mišico, Cowperjevi žlezi in glavico penisa pri samcih ter oba jajčnika (mokra teža) in maternico (vključno z vratom) pri samicah; če se navedeno vključi, je treba te teže zbrati čim prej po disekciji.
47. Pri poginulih mladičih in mladičih, usmrčenih 13. dan po porodu ali kmalu zatem, je treba skrbno pregledati vsaj zunanost, da se odkrijejo večje nepravilnosti. Posebno pozornost je treba posvetiti zunanjim reproduktivnim genitalijam, pri katerih je treba pregledati, ali so se pojavili znaki spremenjenega razvoja. Na 13. dan je treba shraniti ščitnico enega mladega samca in ene mlade samice na leglo.
48. Pri vseh odraslih živalih je treba shraniti jajčnike, moda, pomožne spolne organe (maternico in maternični vrat, nadmodke, prostato, semenska mešička s koagulacijskimi žlezami), ščitnico in vse organe, na katerih se kažejo makroskopske lezije. Za redni

pregled mod in nadmodkov fiksacija v formalinu ni priporočljiva. Sprejemljiva metoda za ta tkiva je uporaba Bouinovega ali prilagojenega Davidsonovega fiksativa (11). Tunico albugineo je dovoljeno nežno in plitvo punktirati na obeh polih organa z iglo, da lahko fiksativ hitro prodre v tkivo.

### *Histopatologija*

49. Podrobno histopatološko preiskavo je treba izvesti na jajčnikih, modih in nadmodkih (s posebnim poudarkom na fazah spermatogeneze in histopatologiji intersticijske celične strukture mod) živali iz skupine z največjim odmerkom in kontrolne skupine. Drugi shranjeni organi, vključno s ščitnicami mladičev in odraslih živali, se lahko pregledajo po potrebi. Teža ščitnice se lahko določi po fiksaciji. Pri odstranjevanju priraščenih tkiv je prav tako potrebna velika previdnost, opravi pa se lahko šele po fiksaciji, da se preprečijo poškodbe tkiv, ki lahko ogrozijo histopatološko analizo. Preiskave je treba razširiti na živali iz skupin z drugimi odmerjanji, če se v skupini z največjim odmerkom opazijo spremembe. Več informacij o disekciji, fiksaciji, sekciji in histopatologiji endokrinih tkiv je na voljo v napotkih o histopatologiji (11).

## **PODATKI IN POROČANJE**

### **Podatki**

50. Podatke je treba navesti za vsako žival posebej. Poleg tega je treba vse podatke povzeti v obliki preglednice, ki za vsako preskusno skupino prikazuje število živali na začetku preskusa, število živali, poginulih med preskusom ali usmrčenih iz humanih razlogov, čas pogina ali usmrčitve iz humanih razlogov, število plodnih živali, število brejih samic, število živali, ki kažejo znake toksičnosti, opis znakov zaznane toksičnosti, vključno s časom začetka, trajanjem in resnostjo morebitnih toksičnih učinkov, vrsto histopatoloških sprememb in vse ustrezne podatke o leglu. Format zbirnega poročila v obliki preglednice, ki se je izkazal kot zelo koristen za oceno učinkov na razmnoževanje/razvoj, je naveden v Dodatku 3.
51. Zaradi omejenega obsega študije imajo statistične analize v obliki preskusov ‚pomembnosti‘ omejeno vrednost za številne končne točke, zlasti končne točke razmnoževanja. Če se uporabijo statistične analize, mora biti izbrana metoda ustrezna za porazdelitev preučevane spremenljivke, izbrati pa jo je treba pred začetkom študije. Statistična analiza zadnjično-genitalne razdalje in razvitosti prsnih bradavic mora temeljiti na podatkih za posameznega mladiča, pri čemer se upoštevajo učinki legla. Kadar je ustrezno, je enota analize leglo. Statistična analiza telesne teže mladičev mora temeljiti na podatkih za posameznega mladiča, pri čemer se upošteva velikost legla. Zaradi majhnosti skupine je lahko uporaba podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov (npr. za velikost legla), če so na voljo, prav tako koristna kot pomoč pri razlagi študije.

### **Vrednotenje rezultatov**

52. Ugotovitve te toksikološke študije je treba ovrednotiti glede na opažene učinke, obdukcijo in mikroskopske ugotovitve. Vrednotenje vključuje razmerje med odmerkom preskusne kemikalije in navzočnostjo ali odsotnostjo pojava in resnosti anomalij, vključno z makroskopskimi lezijami, ugotovljenimi ciljnim organi, neplodnostjo, kliničnimi anomalijami, prizadeto zmogljivostjo reproduktivnosti in legla, spremembami telesne mase, učinki na smrtnost in drugimi toksičnimi učinki.
53. Zaradi kratkotrajnega tretiranja samca je treba pri ocenjevanju učinkov na razmnoževanje pri samcih histopatologijo mod in nadmodkov obravnavati skupaj s podatki o plodnosti. Kot pomoč pri razlagi študije je lahko koristna tudi uporaba podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov, ki se nanašajo na razmnoževanje/razvoj (npr. za velikost legla, zadnjično-genitalno razdaljo, razvitost prsnih bradavic, ravni T4 v serumu), če so na voljo.
54. Za kontrolo kakovosti se predlagata zbiranje podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov in izračun koeficientov variacije za številčne podatke, zlasti za parametre, povezane z zaznavanjem endokrinih motilcev. Ti podatki se lahko uporabijo za primerjave, ko se vrednotijo dejanske študije.

### **Poročilo o preskusu**

55. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

#### *Preskusna kemikalija:*

- vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;
- stabilnost preskusne kemikalije, če je znana.

snov iz ene sestavine:

- fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;
- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

- čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

#### *Vehikel (po potrebi):*

- utemeljitev izbire vehikla, če ta ni voda.

#### *Preskusne živali:*

- uporabljena vrsta/sev;

- število, starost in spol živali;
- izvor, nastanitvene razmere, prehrana itd.;
- teža posamezne živali na začetku preskusa.
- utemeljitev vrste, če to ni podgana.

*Preskusni pogoji:*

- utemeljitev izbire velikosti odmerkov;
- podrobni podatki o formulaciji preskusne kemikalije in pripravi hrane, doseženih koncentracijah, stabilnosti in homogenosti pripravka;
- podrobnosti o dajanju preskusne kemikalije;
- preračunavanje koncentracije preskusne kemikalije v hrani ali vodi (ppm) v dejanski odmerek (mg/kg telesne teže/dan), če je ustrezno;
- podrobnosti o kakovosti hrane in vode;
- podroben opis postopka naključnega izbiranja mladičev za izločitev, če se izločijo.

*Rezultati:*

- telesna teža/spremembe telesne teže;
- poraba hrane, in če je na voljo, poraba vode;
- podatki o toksičnem odzivu po spolu in odmerku, vključno s plodnostjo in brejostjo, ter drugi znaki toksičnosti;
- trajanje brejosti;
- toksični ali drugi učinki na razmnoževanje, potomce, poporodno rast itd.;
- vrsta, resnost in trajanje kliničnih opažanj (s podatki o povračljivosti);
- število odraslih samic z normalnim ali nenormalnim pojatvenim ciklusom in trajanje ciklusa;
- število živorojenih in izgub po ugnezditvi;
- podatki o telesni teži mladičev;
- zadnjično-genitalna razdalja vseh mladičev (in telesna teža na dan meritve zadnjično-genitalne razdalje);
- razvitost prsnih bradavic pri mladih samcih;
- ravni ščitničnega hormona pri mladičih, starih 13 dni, in odraslih samcih (ter materah in mladičih, starih 4 dni, če se merijo);

- število mladičev z večjimi vidnimi anomalijami, splošna ocena zunanjih genitalij, število spačkov;
- čas pogina med študijo oziroma ali so živali preživele do zaključka študije;
- število ugnezditev, velikost legla in teže legla ob evidentiranju;
- telesna teža ob usmrčitvi in podatki o teži organov za starševske živali;
- izsledki obdukcije;
- podroben opis ugotovitev histopatoloških preiskav;
- podatki o absorpciji (če so na voljo);
- statistična obdelava rezultatov, če je to primerno.

*Obravnava rezultatov.*

*Sklepne ugotovitve.*

### **Razlaga rezultatov**

56. Študija bo zagotovila vrednotenje toksičnosti za razmnoževanje/razvoj, povezane z dajanjem ponovljenih odmerkov (glej odstavka 5 in 6). Pokazala bo lahko na potrebo po dodatnih preiskavah in zagotovila smernice za zasnovo poznejših študij. Za pomoč pri razlagi rezultatov o razmnoževanju in razvoju glej Smernico OECD 43 (12). Smernica OECD 106 o histološkem vrednotenju preskusov endokrinega in razmnoževalnega sistema pri glodavcih (11) zagotavlja informacije o pripravi in ocenjevanju (endokrinih) organov in vaginalnih brisov, ki so lahko koristne za to smernico za preskušanje.

## VIRI

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

Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 151), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

- (11) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 106), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 43), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

## Dodatek 1

### **OPREDELITVE POJMOV (GLEJ TUDI SMERNICO OECD 150 (6))**

Androgenost je zmožnost kemikalije, da deluje tako kot naravni androgeni hormon (npr. testosteron) v sesalskem organizmu.

Antiandrogenost je zmožnost kemikalije, da zavira delovanje naravnega androgenega hormona (npr. testosterona) v sesalskem organizmu.

Antiestrogenost je zmožnost kemikalije, da zavira delovanje naravnega estrogenega hormona (npr. 17  $\beta$ -estradiola) v sesalskem organizmu.

Protiščitnično delovanje je zmožnost kemikalije, da zavira delovanje naravnega ščitničnega hormona (npr. T<sub>3</sub>) v sesalskem organizmu.

Kemikalija je snov ali zmes.

Toksičnost za razvoj: pojavna oblika toksičnosti za razmnoževanje, ki se pri potomcih kaže kot pred-, ob- in porodna strukturna ali funkcionalna motnja.

Odmerjanje je splošen izraz, ki vključuje odmerek ter pogostnost in trajanje dajanja odmerka.

Odmerek je količina dane preskusne kemikalije. Izražen je kot masa preskusne kemikalije na enoto telesne teže preskusne živali na dan (npr. mg/kg telesne teže/dan) ali kot konstantna koncentracija v hrani.

Očitna toksičnost je splošni izraz, ki opisuje jasne znake zastrupitve po dajanju preskusne kemikalije. Ti morajo zadostovati za oceno nevarnosti in biti takšni, da bi povečanje danega odmerka najverjetneje povzročilo razvoj resnih znakov toksičnosti in verjetno smrt.

Škodovanje plodnosti pomeni motnje razmnoževalnih funkcij ali sposobnosti za razmnoževanje pri samcih ali samicah.

Toksičnost pri materi: škodljivi učinki na breje samice, ki se pojavijo bodisi specifično (neposredni učinek) bodisi nespecifično (posredni učinek).

NOAEL je kratica za raven brez opaženih škodljivih učinkov (no-observed-adverse-effect level). To je največji odmerek, pri katerem ni opaženih škodljivih učinkov zaradi tretiranja.

Estrogenost je zmožnost kemikalije, da deluje tako kot naravni estrogeni hormon (npr. 17  $\beta$ -estradiola) v sesalskem organizmu.

Toksičnost za razmnoževanje pomeni škodljive učinke na potomstvo in/ali poškodovane razmnoževalne funkcije ali prizadete sposobnosti za razmnoževanje pri samcih in samicah.

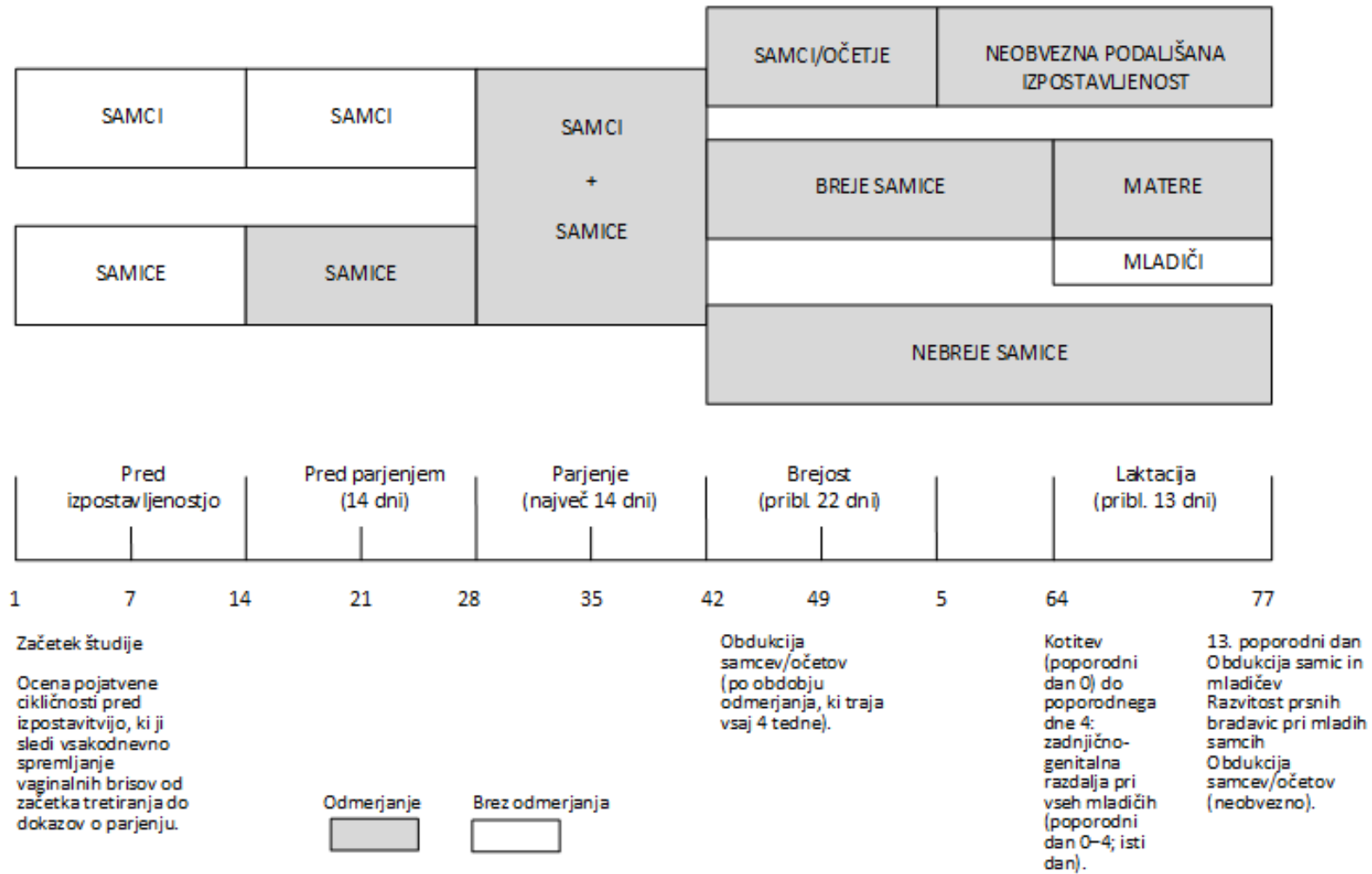
Preskusna kemikalija je vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

Ščitnično delovanje je zmožnost kemikalije, da deluje tako kot naravni ščitnični hormon (npr. T<sub>3</sub>) v sesalskem organizmu.

Validacija je znanstveni postopek, oblikovan za določanje zahtev glede delovanja in omejitev preskusne metode ter za prikaz njene zanesljivosti in ustreznosti za določen namen.

## Dodatek 2

### DIAGRAM NAČRTA ZA POSKUSE Z NAVEDBO NAJDALJŠEGA TRAJANJA ŠTUDIJE NA PODLAGI POLNEGA 14-DNEVNEGA OBDOBJA PARJENJA



### Dodatek 3

## ZBIRNO POROČILO O UČINKIH NA RAZMNOŽEVANJE/RAZVOJ V OBLIKI PREGLEDNICE

OPAŽANJA	VREDNOSTI				
	0 (kontrola )	.. .	.. .	.. .	.. .
Odmerjanje (enote)					
Začetni pari (N)					
Ciklus estrusa (vsaj srednja dolžina in pogostnost nerednih ciklusov)					
Samice, ki kažejo znake kopulacije (N)					
Samice, ki so dosegle brejost (N)					
Dnevi spočetja 1–5 (N)					
Dnevi spočetja 6–... <sup>(1)</sup> (N)					
Brejost ≤ 21 dni (N)					
Brejost = 22 dni (N)					
Brejost ≥ 23 dni (N)					
Matere z živimi novorojenimi mladiči (N)					
Matere z živimi mladiči 4. dan po porodu (N)					
Ugnezditve/mati (srednja vrednost)					
Živi mladiči/mati ob rojstvu (srednja vrednost)					
Živi mladiči/mati 4. dan (srednja vrednost)					
Razmerje med spoloma (m/ž) ob rojstvu (srednja vrednost)					
Razmerje med spoloma (m/ž) 4. dan (srednja vrednost)					
Teža legla ob rojstvu (srednja vrednost)					

<sup>(1)</sup>Zadnji dan obdobja parjenja.

Teža legla 4. dan (srednja vrednost)					
Teža mladičev ob rojstvu (srednja vrednost)					
Teža mladičev ob meritvi zadnjično-genitalne razdalje (srednja vrednost pri samcih, srednja vrednost pri samicah)					
Zadnjično-genitalna razdalja pri mladičih na isti dan po porodu, od rojstva do 4. dne (srednja vrednost pri samcih, srednja vrednost pri samicah, označi dan po porodu)					
Teža mladičev 4. dan (srednja vrednost)					
Razvitost prsnih bradavic pri mladih samcih 13. dan (srednja vrednost)					
Teža mladičev 13. dan (srednja vrednost)					
<b>MLADIČI Z ANOMALIJAMI</b>					
Matere z 0					
Matere z 1					
Matere z $\geq 2$					
<b>IZGUBA POTOMSTVA</b>					
<b>Predporodna/po ugnezditvi (ugnezditve minus živorojeni)</b>					
Samice z 0					
Samice z 1					
Samice z 2					
Samice s $\geq 3$					
<b>Poporodna (živorojeni minus živi 13. dan po porodu)</b>					
Samice z 0					
Samice z 1					
Samice z 2					
Samice s $\geq 3$					

## **B.64 KOMBINIRANA ŠTUDIJA TOKSIČNOSTI S PONAVLJAJOČIMI SE ODMERKI S PRESEJALNIM PRESKUSOM TOKSIČNOSTI ZA RAZMNOŽEVANJE/RAZVOJ**

### **UVOD**

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 422 (2016). Smernice OECD za preskušanje kemikalij se redno pregledujejo ob upoštevanju znanstvenega napredka. Prvotna smernica za presejalni preskus 422 je bila sprejeta leta 1996 na podlagi protokola za ‚kombinirani presejalni preskus s ponavljajočimi se odmerki za razmnoževanje/razvoj‘, o katerem se je razpravljalo na dveh strokovnih srečanjih, in sicer leta 1990 v Londonu (1) in leta 1992 v Tokiu (2).
2. Ta preskusna metoda združuje del, ki vključuje presejalni preskus toksičnosti za razmnoževanje/razvoj in ki temelji na izkušnjah, pridobljenih v državah članicah z uporabo prvotne metode na obstoječih kemikalijah, ki se proizvajajo v velikih količinah, in pri raziskovalnih preskusih s snovmi za pozitivno kontrolo (3) (4), ter del, ki vključuje preskus toksičnosti s ponavljajočimi se odmerki, v skladu s Smernico OECD za preskušanje 407 (28-dnevna študija oralne toksičnosti s ponavljajočimi se odmerki na glodavcih, ki ustreza poglavju B.7 te priloge).
3. Ta preskusna metoda je bila posodobljena z ustreznimi končnimi točkami za endokrine motilce kot nadaljnji ukrep v okviru prednostne dejavnosti, ki jo je OECD začela izvajati leta 1998, da bi pregledala obstoječe smernice za preskušanje ter pripravila nove smernice za presejalne preskuse in preskušanje potencialnih endokrinih motilcev (5). V tem okviru je bila Smernica za preskušanje 407 (ki ustreza poglavju B.7 te priloge) leta 2008 izboljšana s parametri, primernimi za zaznavanje endokrinega delovanja preskusnih kemikalij. Namen posodobitve Smernice za preskušanje 422 je bil vključitev nekaterih ustreznih končnih točk za endokrine motilce v smernice za presejalno preskušanje, pri katerih obdobja izpostavljenosti zajemajo nekatera občutljiva obdobja med razvojem (pred rojstvom in malo po rojstvu).
4. Izbrane dodatne končne točke, pomembne za endokrine motilce, ki so tudi del Smernice za preskušanje 443 (razširjene študije toksičnosti za razmnoževanje na eni generaciji, ki ustreza poglavju B.56 te priloge), so bile v Smernico za preskušanje 422 vključene na podlagi študije izvedljivosti, s katero so se obravnavala znanstvena in tehnična vprašanja njihove vključitve ter morebitne prilagoditve načrta preskusa, potrebne za njihovo vključitev (6).
5. Ta preskusna metoda naj bi zagotovila omejene informacije v zvezi z učinki preskusne kemikalije na sposobnost razmnoževanja pri samcih in samicah, kot so funkcija spolnih žlez, obnašanje pri parjenju, spočetje, razvoj zarodka in kotitev. Ni alternativa obstoječim preskusnim metodam B.31, B.34, B.35 ali B.56 niti jih ne nadomešča.

## ZAČETNI PREUDARKI

6. Pri ocenjevanju in vrednotenju toksičnih lastnosti preskusne kemikalije se lahko metoda s ponavljanjem odmerkov uporabi za določitev oralne toksičnosti, potem ko se s preskusi akutne toksičnosti že pridobijo začetne informacije o toksičnosti. Ta študija zagotavlja informacije o morebitnih nevarnostih za zdravje, ki jih lahko povzroči večkratna izpostavljenost v razmeroma omejenem obdobju. Metoda obsega osnovno študijo toksičnosti s ponavljajočimi se odmerki, ki se lahko uporabi za kemikalije, za katere ni upravičena 90-dnevna študija (npr. če obseg proizvodnje ne presega določenih mej), ali pa se izvede kot predhodna študija za dolgoročno študijo. Pri izvajanju študije je treba upoštevati vodilna načela in premisleke iz Smernice OECD 19 o prepoznavanju, oceni in uporabi kliničnih znakov kot humanih končnih točk za preskusne živali, ki se uporabljajo pri ocenah varnosti (7).
7. Poleg tega vključuje presejalni preskus toksičnosti za razmnoževanje/razvoj, zato se lahko uporabi za zagotovitev začetnih informacij o morebitnih učinkih na sposobnost razmnoževanja pri samcih in samicah, kot so funkcija spolnih žlez, obnašanje pri parjenju, spočetje, razvoj zarodka in kotitev, bodisi v zgodnji fazi ocenjevanja toksikoloških lastnosti preskusnih kemikalij bodisi v zvezi s kemikalijami, ki vzbujajo zaskrbljenost. Ta preskusna metoda ne zagotavlja popolnih informacij o vseh vidikih razmnoževanja in razvoja. Zlasti zagotavlja samo omejene načine, kako po rojstvu zaznati pojavne oblike izpostavljenosti pred rojstvom ali učinke, ki jih lahko povzroči izpostavljenost po rojstvu. Zaradi (med drugim) selektivnosti končnih točk in kratkotrajnosti študije ta metoda ne zagotavlja dokazov za dokončne trditve o neobstoju učinkov na razmnoževanje/razvoj. Če ni podatkov iz drugih preskusov toksičnosti za razmnoževanje/razvoj, so poleg tega pozitivni rezultati koristni za začetno oceno nevarnosti in prispevajo k odločitvam v zvezi z nujnostjo in časovnim okvirom dodatnega preskušanja.
8. Rezultate, ki se dobijo s parametri, povezanimi z endokrinim sistemom, je treba obravnavati znotraj temeljnega okvira OECD za preskušanje in ocenjevanje kemikalij, ki povzročajo endokrine motnje (Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals) (8). V tem temeljnem okviru je izboljšana Smernica OECD za preskušanje 422 vključena na ravni 4 kot preskus *in vivo*, ki zagotavlja podatke o škodljivih učinkih na ustrezne končne točke za endokrini sistem. Vendar zgolj endokrinega signala ni mogoče šteti za zadosten dokaz, da je preskusna kemikalija endokrini motilec.
9. Pri preskusni metodi je poudarek tudi na nevroloških učinkih kot specifični končni točki, poudarjena je tudi potreba po pozornem kliničnem opazovanju živali, da se pridobi čim več informacij. S to metodo naj bi se opredelile kemikalije z nevrotoksičnim potencialom, zaradi česar je morda upravičena dodatna poglobljena raziskava tega vidika. Poleg tega lahko metoda v osnovi nakaže imunološke učinke.

10. Če ni podatkov iz drugih študij sistemske toksičnosti, toksičnosti za razmnoževanje/razvoj, nevrotoksičnosti in/ali imunotoksičnosti, so pozitivni rezultati koristni za začetno oceno tveganj in prispevajo k odločitvam v zvezi z nujnostjo in časom dodatnega preskušanja. Preskus je lahko še zlasti koristen v okviru osnovnega pregleda OECD v zvezi s podatki o kemikaliji (SIDS) za oceno obstoječih kemikalij, o katerih je na voljo malo ali nič toksikoloških informacij, in se lahko uporabi namesto dveh ločenih preskusov toksičnosti pri ponovljenih odmerkih (Smernica OECD za preskušanje 407, ki ustreza poglavju B.7 te priloge) oziroma toksičnosti za razmnoževanje/razvoj (Smernica OECD za preskušanje 421, ki ustreza poglavju B.63 te priloge). Uporabi se lahko tudi kot študija za določanje območja odmerka za obsežnejše razmnoževalne/razvojne študije ali če se zdi pomembna kako drugače.
11. Na splošno se domneva, da obstajajo razlike v občutljivosti med brejimi in nebregimi živalmi. Posledično je lahko pri tem kombiniranem preskusu bolj zapleteno določiti velikosti odmerkov, ki so ustrezni za oceno tako splošne sistemske toksičnosti kot specifične toksičnosti za razmnoževanje/razvoj, kot pa če se posamezni preskusi izvedejo ločeno. Poleg tega je lahko razlaga rezultatov preskusa v zvezi s splošno sistemsko toksičnostjo težja, kot če se izvede ločena študija s ponavljajočimi se odmerki, zlasti če serumski in histopatološki parametri v študiji niso ocenjeni hkrati. Zaradi teh tehničnih težav so za izvajanje tega kombiniranega presejalnega preskusa potrebne bogate izkušnje s preskušanjem toksičnosti. Po drugi strani pa lahko kombinirani preskus, poleg tega da vključuje manjše število živali, zagotovi tudi boljši način za razlikovanje med neposrednimi učinki na razmnoževanje/razvoj in učinki, ki so glede na druge (sistemske) učinke drugotnega pomena.
12. Pri tem preskusu je obdobje odmerjanja daljše kot pri običajni 28-dnevni študiji s ponavljajočimi se odmerki. Vendar se pri njem uporabi manj živali vsakega spola na skupino, kot če se običajna 28-dnevna študija s ponavljajočimi se odmerki izvede poleg presejalnega preskusa toksičnosti za razmnoževanje/razvoj.
13. Pri tej preskusni metodi je predvideno oralno dajanje preskusne kemikalije. Če se uporabijo drugi načini izpostavljenosti, so morda potrebne prilagoditve.
14. Preden se preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni.
15. Opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

## **NAČELO PRESKUSA**

16. Preskusna kemikalija se daje v stopnjevanih odmerkih več skupinam samcev in samic. Samcem je treba dajati odmerke najmanj štiri tedne, do vključno dneva pred predvideno usmrtnitvijo (to vključuje vsaj dva tedna pred parjenjem, obdobje parjenja in približno dva tedna po parjenju). Glede na omejeno obdobje odmerjanja pred parjenjem pri samcih plodnost morda ni posebno občutljiv kazalnik toksičnosti za moda. Zato je bistven podroben histološki pregled mod. Kombinacija dvotedenskega obdobja odmerjanja pred parjenjem in poznejših opazovanj parjenja/plodnosti s skupno vsaj štiritedenskim obdobjem odmerjanja, ki mu sledi podroben histopatološki pregled spolnih žlez samcev, se šteje za zadostno, da se lahko zazna večina učinkov na plodnost pri samcih in spermatogenezo.
17. Samicam je treba dajati odmerke med celotno študijo. To vključuje dva tedna pred parjenjem (da se zajameta vsaj dva popolna pojatvena cikla), različen čas do spočetja, trajanje brejosti in vsaj 13 dni po kotitvi, do vključno dneva pred predvideno usmrtnitvijo.
18. Trajanje študije po aklimatizaciji in oceni pojatvenega cikla pred odmerjanjem je odvisno od delovanja samice in traja približno 63 dni (vsaj 14 dni pred parjenjem, (do) 14 dni parjenja, 22 dni brejosti, 13 dni laktacije).
19. V obdobju dajanja odmerkov je treba živali vsak dan pozorno opazovati, ali kažejo znake zastrupitve. Na živalih, ki med preskusom poginejo ali so usmrčene, se opravi obdukcija, ob koncu preskusa pa se tudi preživele živali usmrtnijo in se na njih opravi obdukcija.

## **OPIS METODE**

### **Izbira živalskih vrst**

20. Pri tej preskusni metodi naj bi se uporabljale podgane. Če se parametri, določeni v tej smernici za preskušanje 422, preiskujejo na drugi vrsti glodavcev, je treba to podrobno utemeljiti. V mednarodnem validacijskem programu za zaznavanje endokrinih motilcev na podlagi Smernice OECD za preskušanje 407 je bila podgana edina uporabljena vrsta. Sevi z nizko plodnostjo ali dobro znano visoko pojavnostjo razvojnih napak se ne smejo uporabljati. Uporabiti je treba zdrave živali, ki se še niso parile in niso bile izpostavljene predhodnim preskusnim postopkom. Opredeliti je treba vrsto, sev, spol, težo in starost preskusnih živali. Na začetku študije morajo biti razlike v teži uporabljenih živali čim manjše in ne smejo presegati  $\pm 20\%$  povprečne teže za vsak spol. Če se študija izvaja kot predhodna študija za dolgotrajno študijo ali študijo celotne generacije, je priporočljivo, da se v obeh študijah uporabijo živali iz istega seva in vira.

### **Nastanitev in hranjenje**

21. Vsi postopki morajo biti v skladu z lokalnimi standardi oskrbe laboratorijskih živali. Temperatura v prostoru s preskusnimi živalmi mora znašati  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Relativna vlažnost mora biti vsaj 30-odstotna in po možnosti ne sme presegati 70 %, razen med

čiščenjem prostora. Osvetlitev mora biti umetna s svetlobnim ciklom 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja običajna laboratorijska hrana z neomejeno količino pitne vode. Na izbiro hrane lahko vpliva potreba po zagotovitvi ustrezne primesi preskusne kemikalije, če se daje po tej metodi.

22. Živali morajo biti nastanjene v majhnih skupinah istega spola; posamično so lahko nastanjene, če je to znanstveno utemeljeno. Pri skupinski nastanitvi je lahko v kletki največ pet živali. Parjenje se mora izvajati v kletkah, ki so primerne za ta namen. Breje samice morajo biti v svojih kletkah in imeti na voljo material za izdelavo gnezda. Samice v laktaciji so v svojih kletkah skupaj z mladiči.
23. Hrano je treba redno analizirati, da ne vsebuje kontaminantov. Vzorec hrane je treba hraniti, dokler poročilo ni končano.

### **Priprava živali**

24. Zdrave mlade odrasle živali se naključno izberejo ter dodelijo tretiranim skupinam in kletkam. Kletke je treba razporediti tako, da se čim bolj zmanjšajo morebitni učinki, ki nastanejo zaradi razporeditve kletk. Živali se označijo z enkratnimi oznakami in zadržijo v kletkah vsaj pet dni pred začetkom študije, da se prilagodijo na laboratorijske razmere.

### **Priprava odmerkov**

25. Priporoča se, da se preskusna kemikalija daje oralno, razen če se šteje drug način dajanja za primernejšega. Če se izbere oralni način, se preskusna kemikalija običajno daje z gavažo, lahko pa tudi s hrano ali pitno vodo.
26. Po potrebi se preskusna kemikalija raztopi ali suspendira v ustreznem vehiklu. Priporočljivo je, da se, če je mogoče, najprej preuči možnost uporabe vodne raztopine/suspenzije, nato raztopine/suspenzije v olju (npr. koruznem), šele potem pa možnost raztopine v drugih vehiklih. Pri nevodnih vehiklih je treba poznati njihove toksične lastnosti. Določiti je treba stabilnost in homogenost preskusne kemikalije v vehiklu.

## **POSTOPEK**

### **Število in spol živali**

27. Priporočljivo je, da se v vsaki skupini začne z vsaj 10 samci in 12–13 samicami. Pri samicah se pred izpostavitvijo oceni pojavna cikličnost; živali, ki nimajo značilnih 4–5-dnevnih ciklusov, se ne vključijo v študijo; zato se priporočajo dodatne samice za zagotovitev, da je v vsaki skupini 10 samic. Razen v primeru izrazitih toksičnih učinkov naj bi se tako dobilo vsaj 8 brejih samic na skupino, kar je običajno najnižje sprejemljivo število brejih samic na skupino. Cilj je dobiti dovolj brejih samic in mladičev, da je zagotovljeno smiselno ovrednotenje potenciala preskusne kemikalije za vplivanje na

plodnost, brejost in materinsko obnašanje ter sesanje, rast in razvoj potomcev F<sub>1</sub> od spočetja do 13. dne po skotitvi. Če so med potekom študije načrtovane usmrtitve, je treba število povečati za število živali, predvidenih za usmrtitev pred zaključkom študije. Razmisliti je treba o dodatni satelitski skupini petih živali vsakega spola v kontrolni skupini in skupini, tretirani z največjim odmerkom, na katerih bi se vsaj 14 dni po tretiranju opazovale popravljivost, obstojnost ali zapoznelost nastopa sistemskih toksičnih učinkov. Živali iz satelitske skupine se ne parijo, zato se ne uporabijo za oceno toksičnosti za razmnoževanje/razvoj.

## **Odmerjanje**

28. Običajno je treba uporabiti najmanj tri preskusne skupine in eno kontrolno skupino. Če niso na voljo ustrezni podatki o splošni toksičnosti, se lahko opravi študija za določanje območja (na živalih istega seva in izvora), s pomočjo katere se določijo odmerki, ki bodo uporabljeni. Razen tretiranja s preskusno kemikalijo je treba živali v kontrolni skupini obravnavati enako kot živali v preskusni skupini. Če se pri dajanju preskusne kemikalije uporablja vehikel, mora kontrolna skupina prejeti največjo uporabljeno količino vehikla.
29. Pri izbiri velikosti odmerkov je treba upoštevati vse obstoječe podatke o toksičnosti in (toksiko-)kinetiki, ki so na voljo. Upoštevati je treba tudi, da lahko obstajajo razlike v občutljivosti med brejimi in nebregimi živalmi. Izbrati je treba največjo velikost odmerka, ki povzroči toksične učinke, ne pa tudi pogina ali očitnega trpljenja. Nato je treba izbrati padajoče zaporedje velikosti odmerkov, da se pokažejo vsi odzivi, ki so odvisni od odmerjanja, in ugotovi največja velikost odmerka, pri kateri ni škodljivih učinkov. Velikokrat je najbolje uporabiti dva- do štirikratne intervale, namesto zelo velikih intervalov (npr. večjih od desetkratnika) med odmerjanji pa je pogosto primerneje dodati še četrto preskusno skupino.
30. Če se ugotovijo splošna toksičnost (npr. zmanjšana telesna teža, učinki na jetra, srce, pljuča ali ledvice itd.) ali druge spremembe, ki morda niso toksične reakcije (npr. zmanjšan vnos hrane, povečanje jeter), je potrebna previdnost pri razlagi ugotovljenih učinkov na endokrine občutljive končne točke.

## **Mejni preskus**

31. Če oralna študija pri odmerku, velikem najmanj 1 000 mg/kg telesne teže/dan, ali pri enakovrednem deležu v hrani ali pitni vodi pri vnosu s hrano ali pitno vodo (na podlagi telesne teže), pri katerem so uporabljeni postopki, opisani za to študijo, ne povzroči opaznih toksičnih učinkov in če na podlagi podatkov o strukturno sorodnih snoveh toksičnost ni pričakovana, popolna študija z več velikostmi odmerkov morda ni potrebna. Mejni preskus se uporabi, razen če izpostavljenost človeka nakazuje potrebo po uporabi večjega odmerka. Pri drugih vrstah prejemanja, na primer pri vdihavanju ali dermalni

aplikaciji, lahko fizikalno-kemijske lastnosti preskusne kemikalije pogosto določajo največjo dosegljivo izpostavljenost.

### **Dajanje odmerkov**

32. Živalim se dajejo odmerki preskusne kemikalije sedem dni na teden. Če se preskusna kemikalija daje z gavažo, jo je treba živali dati v enkratnem odmerku z uporabo želodčne sonde ali primerne intubacijske kanile. Največja količina tekočine, ki se lahko da naenkrat, je odvisna od velikosti preskusne živali. Količina ne sme presežati 1 ml/100 g telesne teže, razen v primeru vodnih raztopin, za katere se lahko uporabi 2 ml/100 g telesne teže. Razen pri dražilnih ali jedkih preskusnih kemikalijah, ki pri večjih koncentracijah navadno povzročijo močnejše učinke, je treba s prilagajanjem koncentracije čim bolj zmanjšati spremenljivost preskusne količine, da se zagotovi stalna količina pri vseh velikostih odmerkov.
33. Pri preskusnih kemikalijah, ki se dajejo s hrano ali pitno vodo, je treba zagotoviti, da količine uporabljene preskusne kemikalije ne vplivajo na normalno prehranjevanje ali vodno ravnotežje. Če se preskusna kemikalija daje s hrano, se lahko uporabi konstantna koncentracija v hrani (ppm) ali pa konstantna velikost odmerka glede na telesno težo živali; uporabljeni način je treba navesti. Če se preskusna kemikalija daje z gavažo, je treba odmerke dajati vsak dan ob približno istem času in jih najmanj enkrat tedensko prilagajati, da se vzdržuje konstantna velikost odmerka glede na telesno težo živali. Če se kombinirana študija izvaja kot predhodna študija za dolgoročno študijo toksičnosti ali popolno študijo toksičnosti za razmnoževanje, je treba v obeh študijah uporabiti podobno hrano.

### **Načrt za poskus**

34. Odmerjanje obema spoloma se mora začeti dva tedna pred parjenjem, potem ko so se živali aklimatizirale vsaj pet dni in ko so bile samice pregledane, ali imajo normalen pojavni cikel (v dvotedenskem obdobju pred tretiranjem). Študija mora biti načrtovana tako, da se ocenjevanje pojatvenega ciklusa začne kmalu potem, ko živali dosežejo polno spolno zrelost. To se lahko pri različnih sevih podgan v različnih laboratorijih nekoliko razlikuje, npr. pri podganah seva Sprague Dawley se zgodi pri 10 tednih starosti, pri podganah seva Wistar pa pri približno 12 tednih starosti. Matere s potomci je treba usmrtiti 13. dan po porodu ali kmalu zatem. Da se omogoči postenje mater čez noč pred odvzemom krvi (če je zaželena ta možnost), mater in njihovega potomstva ni treba nujno usmrtiti isti dan. Dan rojstva (tj. ko je končana kotitev) je opredeljen kot poporodni dan 0. Samice, za katere ni dokazov o kopulaciji, se usmrtijo 24–26 dni po zadnjem dnevu obdobja parjenja. Odmerjanje se pri obeh spolih nadaljuje še v obdobju parjenja. Po obdobju parjenja je treba samcem dajati odmerke še vsaj toliko časa, dokler ni doseženo najkrajše skupno obdobje odmerjanja 28 dni. Nato se usmrtijo ali pa se ohranijo pri življenju in se jim še naprej dajejo odmerki za morebitno drugo parjenje, če se šteje za ustrezno.

35. Dnevno dajanje odmerkov starševskim samicam se mora nadaljevati skozi celotno brejost in vsaj do vključno 13. dne po porodu ali dneva pred usmrtnitvijo. Pri študijah, pri katerih se preskusna kemikalija prejema z vdihavanjem ali po dermalni poti, se mora odmerjanje nadaljevati vsaj do vključno 19. dne brejosti, pri čemer je treba odmerjanje znova začeti takoj, ko je to mogoče, in najpozneje 4. dan po porodu.
36. Če so vključene živali iz satelitske skupine, predvidene za nadaljnja opazovanja, se ne pariyo. Ohraniti jih je treba še vsaj 14 dni po prvi predvideni usmrtnitvi mater, in sicer brez kakršnega koli tretiranja, da se zazna zapoznel nastop, obstojnost ali izginotje toksičnih učinkov.
37. Diagram načrta poskusa je prikazan v Dodatku 2.

### **Pojatveni ciklusi**

38. Pojavne cikle je treba spremljati pred začetkom tretiranja, da se za študijo izberejo samice z rednimi ciklusi (glej odstavek 27). Dnevno je treba spremljati tudi vaginalne brise, in sicer od začetka obdobja tretiranja do dokazov o parjenju. Če obstajajo pomisleki glede učinkov akutnega stresa, zaradi katerega bi se lahko z začetkom odmerjanja spremenili pojavni ciklusi, lahko laboratoriji preskusne živali izpostavijo za 2 tedna in nato odvzamejo vaginalne brise, da spremljajo pojavni cikel vsaj dva tedna v obdobju pred parjenjem, dokler ni dokazov o parjenju. Med jemanjem celic nožnice/materničnega vratu je treba paziti, da ne pride do poškodb sluznice in posledično do psevdogavidnosti (8) (9).

### **Postopek parjenja**

39. Običajno je treba pri tej študiji uporabiti parjenje 1 : 1 (en samec na eno samico). Izjeme so možne v primeru občasnih poginov samcev. Samica mora biti nastanjena z istim samcem, dokler ni dokazov o kopulaciji ali dokler ne pretečeta dva tedna. Vsako jutro je treba samice pregledati za prisotnost semenčic ali vaginalnega čepa. Dan brejosti 0 je opredeljen kot dan, na katerega so potrjeni dokazi o parjenju (opažen je vaginalni čep ali semenčice). Če parjenje ni bilo uspešno, se lahko razmisli o ponovnem parjenju samic z dokazanimi samci iste skupine.

### **Velikost legla**

40. Četrty dan po skotitvi se lahko velikost posameznega legla prilagodi z naključno izločitvijo odvečnih mladičev, tako da so po možnosti v vsakem leglu štirje ali pet mladičev vsakega spola, odvisno od običajne velikosti legla pri uporabljenem sevu podgan. Dvema od odvečnih mladičev je treba odvzeti vzorce krvi, jih združiti in uporabiti za določitev ravni T4 v serumu. Selektivno izločanje mladičev, npr. na podlagi telesne teže ali zadnjično-genitalne razdalje, ni ustrezno. Kadar zaradi števila mladih samcev in samic ni mogoče, da bi bili v vsakem leglu štirje ali pet mladičev na spol, je sprejemljiva tudi delna prilagoditev

(na primer šest samcev in štiri samice). Mladiči se ne izločijo, če velikost legla pade pod ciljno vrednost za izločitev (8 ali 10 mladičev/leglo). Če je nad ciljno vrednostjo za izločitev na voljo samo en mladič, se izloči samo en mladič, ki se mu odvzame vzorec krvi za morebitne ocene T4 v serumu.

41. Če velikost legla ni prilagojena, se 4. dan po porodu usmrtita dva mladiča na leglo, ki se jima odvzamejo vzorci krvi za meritve serumskih koncentracij hormona ščitnice. Če je mogoče, naj bosta dva mladiča na leglo samici, da se mladi samci prihranijo za ocene razvitosti prsnih bradavic, razen če izločitev teh mladičev pomeni, da ni več na voljo samic za oceno ob usmrtitvi. Mladiči se ne izločijo, če velikost legla pade pod ciljno vrednost 8 ali 10 mladičev na leglo za izločitev (odvisno od običajne velikosti legla pri uporabljenem sevu podgan). Če je glede na običajno velikost legla na voljo en sam mladič, se izloči samo en mladič, ki se mu odvzame vzorec krvi za morebitne ocene T4 v serumu.

## **Opazanja**

42. Splošna klinična opazovanja je treba opraviti vsaj enkrat na dan, po možnosti vsak dan ob istem času in ob upoštevanju obdobja največje intenzivnosti pričakovanih učinkov po odmerjanju. Evidentirati je treba podatke o zdravstvenem stanju živali. Živali je treba vsaj dvakrat na dan opazovati za odkrivanje obolenosti in smrtnosti.
43. Enkrat pred prvo izpostavljenostjo (da se omogočijo primerjave na istem osebku) in nato vsaj enkrat na teden je treba opraviti natančna klinična opazovanja vseh starševskih živali. Ta opazovanja je treba opraviti zunaj kletk, v katerih živali bivajo, na standardnem mestu in po možnosti vsak dan ob istem času. Opazanja je treba skrbno dokumentirati, po možnosti s pomočjo točkovanj, ki jih izrecno določi preskuševalni laboratorij. Prizadevati si je treba, da se preskusni pogoji čim manj spreminjajo in da opazovanja po možnosti opravijo opazovalci, ki s tretiranjem niso seznanjeni. Pozornost je med drugim treba nameniti vsem spremembam na koži, kožuhu, očeh in sluznicah, pojavu sekrecije in ekskrecije ter delovanju avtonomnega živčevja (npr. solzenju, piloerekciji, velikosti zenic in nenavadnemu vzorcu dihanja). Prav tako je treba evidentirati spremembe v hoji, drži in odzivu na ravnanje z živalmi, pa tudi prisotnost kloničnih ali toničnih gibov, stereotipij (npr. prekomernega čiščenja, ponavljajočega se vrtenja v krogu), težke ali podaljšane kotitve ali nenormalnega vedenja (npr. samopohabe, vzvratne hoje) (10).
44. Enkrat med študijo je treba pri petih samcih in petih samicah, naključno izbranih iz vsake skupine, oceniti senzorično reaktivnost na različne vrste dražljajev (npr. slušni, vizualni in propioceptivni dražljaji) (8) (9) (11), moč prijema (12) in motorično aktivnost (13). Nadaljnje podrobnosti glede mogočih postopkov so na voljo v navedenih virih. Uporabiti je mogoče tudi druge postopke, ki v njih niso opisani. Pri samcih je treba ta funkcionalna opazovanja izvesti proti koncu njihovega obdobja odmerjanja, malo pred predvideno usmrtitvijo, vendar pred vzorčenjem krvi za hematološke ali kliničnokemijske preiskave (glej odstavke 53–56, vključno z opombo 1). Samice morajo biti med temi funkcionalnimi

preskusi v fiziološko podobnem stanju, po možnosti pa je treba preskuse izvesti enkrat v zadnjem tednu laktacije (npr. LD 6-13), malo pred predvideno usmrtnitvijo. Čas ločitve mater od mladičev naj bo čim krajši.

45. Funkcionalna opazovanja, izvedena proti koncu študije, se lahko izpustijo, če je študija izvedena kot predhodna študija za poznejšo (90-dnevno) študijo subkronične toksičnosti ali dolgoročno študijo. V takem primeru je treba funkcionalna opazovanja vključiti v to dopolnilno študijo. Po drugi strani pa lahko podatki o funkcionalnih opazovanjih, pridobljeni v tej študiji s ponavljajočimi se odmerki, pomagajo pri določanju velikosti odmerkov za poznejšo študijo subkronične toksičnosti ali dolgoročno študijo.
46. Izjemoma se lahko funkcionalna opazovanja izpustijo tudi za skupine, ki sicer kažejo znake zastrupitve v tolikšnem obsegu, da bi to močno oviralo izvedbo funkcionalnega preskusa.
47. Evidentirati je treba trajanje brejosti, ki se računa od dneva brejosti 0. Vsako leglo je treba pregledati čim prej po skotitvi, da se ugotovijo število in spol mladičev, mrtvorojenih, živorojenih in spačkov (mladičev, ki so znatno manjši od ustreznih kontrolnih mladičev) ter večje nepravilnosti.
48. Žive mladiče je treba prešteti in določiti njihov spol, legla pa je treba stehtati v 24 urah po kotitvi (dan 0 ali 1. dan po porodu) ter vsaj na 4. in 13. dan po porodu. Poleg opažanj glede staršev (glej odstavka 43 in 44) je treba evidentirati vsako nenavadno vedenje potomcev.
49. Zadnjično-genitalno razdaljo vsakega mladiča je treba izmeriti na isti poporodni dan, in sicer med poporodnim dnem 0 in 4. dnem po porodu. Podatke o telesni teži mladičev je treba zbrati na dan, ko se meri zadnjično-genitalna razdalja, slednjo pa je treba normirati na mero velikosti mladiča, po možnosti kubični koren telesne teže (14). Število prsnih bradavic/areol pri mladih samcih je treba prešteti 12. ali 13. dan po porodu, kot je priporočeno v Smernici OECD 151 (15).

### **Telesna teža in poraba hrane/vode**

50. Samce in samice je treba stehtati prvi dan dajanja odmerka, nato pa vsaj enkrat tedensko in ob usmrtnitvi. Med brejostjo je treba samice stehtati na dneve 0, 7, 14 in 20 ter v 24 urah po kotitvi (dan 0 ali 1. dan po porodu) in vsaj 4. in 13. dan po porodu. O teh opažanjih je treba posebej poročati za vsako odraslo žival.
51. Porabo hrane je treba v obdobju pred parjenjem, med brejostjo in laktacijo meriti vsaj enkrat na teden. Med parjenjem merjenje porabe hrane ni obvezno. V teh obdobjih je treba meriti tudi porabo vode, če se preskusna kemikalija daje s tem medijem.

### **Hematologija**

52. Enkrat med študijo je treba pri petih samcih in petih samicah, naključno izbranih iz vsake skupine, opraviti naslednje hematološke preiskave: hematokrit, koncentracija hemoglobina, število eritrocitov, retikulociti, skupno in diferencialno število levkocitov, število trombocitov ter čas/zmožnost koagulacije. Druge preiskave, ki jih je treba opraviti, če imajo preskusna kemikalija ali njeni domnevni metaboliti oksidativne lastnosti oziroma če obstaja sum, da jih imajo, vključujejo koncentracijo methemoglobina in Heinzova telesca.
53. Vzorce krvi je treba vzeti na imenovanem mestu. Samice morajo biti med vzorčenjem v fiziološko podobnem stanju. Da se preprečijo praktične težave, povezane z različnim nastopom brejosti, se lahko vzorci krvi samicam odvzamejo ob koncu obdobja pred parjenjem, namesto da se vzorčijo neposredno pred postopkom evtanazije živali ali med njim. Vzorce krvi samcev je treba po možnosti odvzeti neposredno pred postopkom evtanazije živali ali med njim. Druga možnost je, da se samcem kri odvzame tudi ob koncu obdobja pred parjenjem, če je bila za samice izbrana ta časovna točka.
54. Vzorce krvi je treba shraniti v ustreznih pogojih.

### **Klinična biokemija**

55. Klinične biokemične preiskave za ugotavljanje glavnih toksičnih učinkov v tkivih in zlasti učinkov na ledvice in jetra je treba opraviti na vzorcih krvi, pridobljenih od izbranih petih samcev in petih samic iz vsake skupine. Priporočeno je, da živali pred jemanjem vzorcev krvi čez noč postimo<sup>1</sup>. Preiskave plazme ali seruma morajo vključevati določanje natrija, kalija, glukoze, skupnega holesterola, sečnine, kreatinina, skupnih proteinov in albumina, najmanj dveh encimov, ki sta kazalnika hepatoceličnih učinkov (kot so alanin-aminotransferaza, aspartat-aminotransferaza in sorbitol-dehidrogenaza), in žolčnih kislin. Meritve dodatnih encimov (jetrnega ali drugega izvora) in bilirubina lahko v nekaterih okoliščinah zagotovijo koristne informacije.
56. Vzorci krvi z določenega mesta se vzamejo po naslednjem razporedu:

---

<sup>1</sup> Za številne preiskave seruma in plazme, zlasti za določanje glukoze, se priporoča postenje čez noč. Glavni razlog za to je, da bi povečana spremenljivost, ki bi se zagotovo pojavila, če se žival ne bi postila, lahko prikrila manj opazne učinke in otežila razlago. Po drugi strani pa postenje čez noč lahko vpliva na splošno presnovo (brejih) živali, zmoti laktacijo in vedenje med dojenjem, zlasti v študijah, pri katerih se kemikalija daje s hrano, pa lahko zmoti dnevno izpostavljenost preskusni kemikaliji. Če se uporabi postenje čez noč, je treba klinične biokemične preiskave izvesti po zaključku funkcionalnih opazovanj v četrtem tednu študije pri samcih. Samice je treba ohraniti pri življenju še dodaten dan po odstranitvi mladičev, na primer na 13. dan po porodu. Matere je treba postiti čez noč na 13.–14. dan laktacije, kri, odvzeta ob usmrtni, pa se uporabi za kliničnokemijske parametre.

- vsaj dvema mladičema na leglo 4. dan po porodu, če število mladičev to omogoča (glej odstavka 40 in 41);
- vsem materam in vsaj dvema mladičema na leglo ob usmrtitvi 13. dan ter
- vsem odraslim samcem ob usmrtitvi.

Vsi vzorci krvi se shranijo v ustreznih pogojih. V vzorcih krvi mladičev, starih 13 dni, in odraslih samcev se ocenijo serumske koncentracije hormonov ščitnice (T4). Dodatna ocena T4 v vzorcih krvi mater in mladičev, starih 4 dni, se izvede po potrebi. Po potrebi se lahko izmerijo tudi drugi hormoni. Za analize hormonov ščitnice se lahko kri mladičev združi po leglih. Hormona ščitnice (T4 in TSH) je treba po možnosti meriti ‚skupaj‘.

- Po želji se lahko v zadnjem tednu študije pri petih naključno izbranih samcih iz vsake skupine opravijo naslednje analize urina, dobljenega z zbiranjem v določenih časovnih obdobjih: videz, količina, osmolalnost ali specifična teža, pH, proteini, glukoza in kri/krvne celice.
- Poleg tega je treba razmisliti o študijah za preiskovanje serumskih označevalcev splošnih poškodb tkiva. Druge preiskave, ki jih je treba opraviti, če obstaja možnost ali sum, da bodo znane lastnosti preskusne kemikalije vplivale na povezane metabolične profile, vključujejo kalcij, fosfat, trigliceride na tešče in glukoza na tešče, posebne hormone, methemoglobin in holinesterazo. Te je treba opredeliti za vsak primer posebej.
- Na spremenljivost in absolutne koncentracije pri določanju hormonov lahko vplivajo naslednji dejavniki:
  - čas usmrtitve zaradi spreminjanja koncentracij hormonov preko dneva;
  - način usmrtitve, da se prepreči nepotreben stres pri živalih, ki lahko vpliva na koncentracije hormonov;
  - preskusni kompleti, ki se uporabljajo za določanje hormonov in se lahko razlikujejo po standardnih krivuljah.
- Vzorci plazme, ki so predvideni posebej za določanje hormonov, je treba odvzeti ob primerljivih urah dneva. Številčne vrednosti, pridobljene pri analiziranju koncentracij hormonov, so pri različnih kompletih za analize, ki so na voljo na trgu, različne.
- Če pretekli izhodiščni podatki niso ustrezni, je treba razmisliti o določitvi hematoloških in kliničnih biokemičnih spremenljivk pred začetkom dajanja odmerkov ali po možnosti pri sklopu živali, ki niso vključene v preskusne skupine. Za samice je treba podatke pridobiti od doječih živali.

## **PATOLOGIJA**

## Makroskopska obdukcija

62. Na vseh odraslih živalih iz študije je treba opraviti popolno in natančno makroskopsko obdukcijo, ki obsega natančen pregled zunanje površine telesa, vseh odprtin, lobanjske, prsne in trebušne votline ter njihove vsebine. Posebno pozornost je treba posvetiti organom reproduktivnega sistema. Evidentirati je treba število ugnezditev. Vaginalne brise je treba pregledati na dan obdukcije, da se ugotovi faza pojatvenega ciklusa in omogoči korelacija s histopatološkimi preiskavami reproduktivnih organov samic.
63. Z mod, nadmodkov ter prostate in semenskih mešičkov s koagulacijskimi žlezami kot celote je treba pri vseh odraslih samcih, kot je ustrezno, odstraniti vsa priraščena tkiva in nato čim prej po disekciji izmeriti njihovo mokro težo, da se ne izsušijo. Poleg tega lahko teža neobveznih organov vključuje sistem mišice *levator ani* z bulbokavernozno mišico, Cowperjevi žlezi in glavico penisa pri samcih ter oba jajčnika (mokra teža) in maternico (vključno z materničnim vratom) pri samicah; če se navedeno vključi, je treba te teže zbrati čim prej po disekciji. Pri vseh odraslih živalih je treba shraniti jajčnike, moda, nadmodke, pomožne spolne organe in vse organe, na katerih se kažejo makroskopske lezije.
64. Ščitnične žleze vseh odraslih samcev in samic ter enega mladega samca in samice, starih 13 dni, iz vsakega legla je treba shraniti v fiksacijskem sredstvu, ki je najprimernejše za predvidene nadaljnje histopatološke preiskave. Teža ščitnice se lahko določi po fiksaciji. Pri odstranjevanju priraščenih tkiv je prav tako potrebna velika previdnost, opravi pa se lahko šele po fiksaciji, da se preprečijo poškodbe tkiv, ki lahko ogrozijo histopatološko analizo. Vzorce krvi je treba odvzeti na imenovanem mestu neposredno pred postopkom evtanazije živali ali med njim in jih hraniti v ustreznih pogojih (glej odstavek 56).
65. Poleg tega je treba vsaj petim odraslim samcem in samicam, naključno izbranim iz vsake skupine (to ne velja za živali, ki so najdene poginjajoče in/ali so evtanazirane pred koncem študije), z jeter, ledvic, nadledvičnih žlez, priželjca, vranice, možganov in srca, kot je ustrezno, odstraniti vsa priraščena tkiva, nato pa čim prej po disekciji določiti njihovo mokro težo, da se ne izsušijo. Naslednja tkiva je treba shraniti v fiksacijskem sredstvu, ki je najprimernejše za vrsto tkiva in predvideno poznejšo histopatološko preiskavo: vse velike lezije, možgane (reprezentativne regije, vključno z velikimi in malimi možgani ter mostom), hrbtenjačo, oko, želodec, tanko in debelo črevo (vključno s Peyerjevimi ploščami), jetra, ledvice, nadledvične žleze, vranico, srce, priželjc, sapnik in pljuča (shranijo se tako, da se napihnejo s fiksativom in nato potopijo), spolne žleze (moda in jajčnike), pomožne spolne organe (maternico in maternični vrat, nadmodek, prostato in semenske mešičke s koagulacijskimi žlezami), vagino, sečni mehur, bezgavke (poleg najbližje drenažne bezgavke je treba vzeti še eno bezgavko v skladu z izkušnjami laboratorija (16)), periferni živec (ishiadčni ali tibialni), po možnosti v neposredni bližini mišice, skeletno mišico in kost s kostnim mozgom (rezina ali sveže prepariran punktast kostnega mozga). Priporočljivo je, da se moda fiksirajo s potopitvijo v Bouinov ali prilagojen Davidsonov fiksativ (16) (17) (18); fiksacija v formalinu za ta tkiva ni

priporočljiva. Tunico albugineo je dovoljeno nežno in plitvo punktirati na obeh polih organa z iglo, da lahko fiksativ hitro prodre v tkivo. Na podlagi kliničnih in drugih izsledkov se lahko pokaže potreba po preiskavah dodatnih tkiv. Poleg tega je treba shraniti vse organe, ki bi lahko bili ciljni organi glede na znane lastnosti preskusne kemikalije.

66. Z naslednjimi tkivi je mogoče pridobiti koristne informacije o endokrinih učinkih: spolnimi žlezami (jajčniki in modi), pomožnimi spolnimi organi (maternico, vključno z materničnim vratom, nadmodkom, semenskimi mešički s koagulacijskimi žlezami ter dorzolateralno in ventralno prostato), vagino, hipofizo, mlečno žlezo samcev in nadledvično žlezo. Spremembe v mlečnih žlezah samcev niso bile zadostno dokumentirane, vendar je lahko ta parameter zelo občutljiv za snovi z estrogenim delovanjem. Opazovanje organov/tkiv, ki niso navedeni v odstavku 65, je neobvezno.
67. Pri poginulih mladičih in mladičih, usmrčenih 13. dan po porodu ali kmalu zatem, je treba skrbno pregledati vsaj zunanost, da se odkrijejo večje nepravilnosti. Posebno pozornost je treba posvetiti zunanjim reproduktivnim genitalijam, pri katerih je treba pregledati, ali so se pojavili znaki spremenjenega razvoja.

## **Histopatologija**

68. V celoti je treba opraviti histopatološke preiskave shranjenih organov in tkiv izbranih živali iz kontrolne skupine in skupine z velikim odmerkom (s posebnim poudarkom na fazah spermatogeneze v spolnih žlezah samcev in histopatologiji intersticijske celične strukture mod). Ščitnične žleze mladičev in preostalih odraslih živali se lahko pregledajo po potrebi. Te preiskave je treba razširiti na živali iz skupin, tretiranih z drugimi odmerjanji, če se v skupini, tretirani z velikim odmerkom, opazijo spremembe, povezane s tretiranjem. Več informacij o disekciji, fiksaciji, sekciji in histopatologiji endokrinih tkiv je na voljo v napotkih za histopatologijo (10).
69. Pregledati je treba vse velike lezije. Da se lažje pojasnijo vrednosti brez opaženih škodljivih učinkov, je treba pregledati ciljne organe v skupinah z drugimi odmerki, zlasti v skupinah, v katerih naj ne bi bili opaženi škodljivi učinki.
70. Če se uporablja satelitska skupina, je treba opraviti histopatološko preiskavo na tkivih in organih, na katerih so bili opaženi učinki v tretiranih skupinah.

## **PODATKI IN POROČANJE**

### **Podatki**

71. Podatke je treba navesti za vsako žival posebej. Poleg tega je treba vse podatke povzeti v obliki preglednice, ki za vsako preskusno skupino prikazuje število živali na začetku preskusa, število živali, poginulih med preskusom ali evtanaziranih iz humanih razlogov, čas pogina ali evtanazije, število plodnih živali, število brejih samic, število živali, ki

kažejo znake toksičnosti, opis znakov zaznane toksičnosti, vključno s časom začetka, trajanjem in resnostjo morebitnih toksičnih učinkov, vrsto histopatoloških sprememb in vse ustrezne podatke o leglu. Format zbirnega poročila v obliki preglednice, ki se je izkazal kot zelo koristen za oceno učinkov na razmnoževanje/razvoj, je naveden v Dodatku 3.

72. Če je mogoče, je treba številčne rezultate ocenjevati na podlagi primerne in splošno priznane statistične metode. Pri primerjavah učinka vzdolž območja odmerka se je treba izogibati večkratnim preskusom t. Statistične metode je treba izbrati med zasnovo študije. Statistična analiza zadnjično-genitalne razdalje in razvitosti prsnih bradavic mora temeljiti na podatkih za posameznega mladiča, pri čemer se upoštevajo učinki legla. Kadar je ustrezno, je enota analize leglo. Statistična analiza telesne teže mladičev mora temeljiti na podatkih za posameznega mladiča, pri čemer se upošteva velikost legla. Zaradi omejenega obsega študije imajo statistične analize v obliki preskusov ‚pomembnosti‘ omejeno vrednost za številne končne točke, zlasti končne točke razmnoževanja. Nekatere najpogosteje uporabljene metode, zlasti parametrični testi za meritve centralne tendence, niso ustrezne. Če se uporabijo statistične analize, mora biti izbrana metoda ustrezna za porazdelitev preučevane spremenljivke, izbrati pa jo je treba pred začetkom študije.

### **Vrednotenje rezultatov**

73. Ugotovitve te toksikološke študije je treba ovrednotiti glede na opažene učinke, obdukcijo in mikroskopske ugotovitve. Vrednotenje vključuje razmerje med odmerkom preskusne kemikalije in navzočnostjo ali odsotnostjo pojava in resnosti anomalij, vključno z velikimi lezijami, ugotovljenimi ciljnim organi, neplodnostjo, kliničnimi anomalijami, prizadeto zmogljivostjo reproduktivnosti in legla, spremembami telesne mase, učinki na smrtnost in drugimi toksičnimi učinki.
74. Zaradi kratkotrajnega tretiranja samca je treba pri vrednotenju učinkov na razmnoževanje pri samcih histopatologijo mod in nadmodkov obravnavati skupaj s podatki o plodnosti. Kot pomoč pri razlagi študije je lahko koristna tudi uporaba podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov glede razmnoževanja/razvoja (npr. za velikost legla, zadnjično-genitalno razdaljo, razvitost prsnih bradavic, ravni T4 v serumu), če so na voljo.
75. Za kontrolo kakovosti se predlagata zbiranje podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov in izračun koeficientov variacije za številčne podatke, zlasti za parametre, povezane z zaznavanjem endokrinih motilcev. Ti podatki se lahko uporabijo za primerjave, ko se vrednotijo dejanske študije.

### **Poročilo o preskusu**

76. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

#### *Preskusna kemikalija:*

- vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;

- stabilnost preskusne kemikalije, če je znana.

Snov iz ene sestavine:

- fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;
- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

- čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

*Vehikel (po potrebi):*

- utemeljitev izbire vehikla, če to ni voda.

*Preskusne živali:*

- uporabljena vrsta/sev;
- število, starost in spol živali;
- izvor, nastanitvene razmere, prehrana itd.;
- teža posamezne živali na začetku preskusa;
- utemeljitev vrste, če to ni podgana.

*Preskusni pogoji:*

- utemeljitev izbire velikosti odmerkov;
- podrobni podatki o formulaciji preskusne kemikalije in pripravi hrane, doseženi koncentraciji, stabilnosti in homogenosti pripravka;
- podrobnosti o dajanju preskusne kemikalije;
- preračunavanje koncentracije preskusne kemikalije v hrani ali vodi (ppm) v dejanski odmerek (mg/kg telesne teže/dan), če je ustrezno;
- podrobnosti o kakovosti hrane in vode;
- podroben opis postopka naključnega izbiranja mladičev za izločitev, če se izločijo.

*Rezultati:*

- telesna teža/spremembe telesne teže;
- poraba hrane, in če je ustrezno, poraba vode;

- podatki o toksičnem odzivu po spolu in odmerku, vključno s plodnostjo, brejestjo in drugimi znaki
- toksičnosti;
- trajanje brejosti;
- toksični ali drugi učinki na razmnoževanje, potomce, poporodno rast itd.;
- vrsta, resnost in trajanje kliničnih opažanj (s podatki o povračljivosti);
- ocene senzorične aktivnosti, moči oprijema in motorične aktivnosti;
- hematološki preskusi z ustreznimi referenčnimi vrednostmi;
- klinični biokemijski preskusi z ustreznimi referenčnimi vrednostmi;
- število odraslih samic z normalnim ali nenormalnim pojavnim ciklusom in trajanje ciklusa;
- število živorojenih in izgub po ugnezditvi;
- število mladičev z večjimi vidnimi anomalijami; splošna ocena zunanjih genitalij, število spačkov;
- čas pogina med študijo oziroma ali so živali preživele do zaključka študije;
- število ugnezditev, velikost legla in teže legla ob evidentiranju;
- podatki o telesni teži mladičev;
- zadnjično-genitalna razdalja vseh mladičev (in telesna teža na dan meritve zadnjično-genitalne razdalje);
- razvitost prsnih bradavic pri mladih samcih;
- ravni ščitničnega hormona, mladiči, stari 13 dni, in odrasli samci (ter matere in mladiči, stari 4 dni, če se
- merijo);
- telesna teža ob usmrtni in podatki o teži organov za starševske živali;
- izsledki obdukcije;
- podroben opis ugotovitev histopatoloških preiskav;
- podatki o absorpciji (če so na voljo);
- statistična obdelava rezultatov, če je to primerno.

*Obravnava rezultatov.*

*Sklepne ugotovitve.*

## **Razlaga rezultatov**

77. S študijo bo zagotovljeno vrednotenje toksičnosti za razmnoževanje/razvoj, povezane z dajanjem ponovljenih odmerkov. Zlasti ker je poudarek tako na splošni toksičnosti kot na toksičnosti za razmnoževanje/razvoj končnih točk, rezultati študije omogočajo razlikovanje med učinki na razmnoževanje/razvoj, ki se pojavijo v odsotnosti splošne toksičnosti, in učinki, ki so izraženi samo na stopnjah, ki so toksične tudi za starše (glej odstavke 7–11). Pokazala bi lahko potrebo po dodatnih preiskavah in zagotovila smernice za zasnovo poznejših študij. Za pomoč pri razlagi rezultatov o razmnoževanju in razvoju glej Smernico OECD 43 (19). Smernica OECD 106 o histološkem vrednotenju preskusov endokrinega in razmnoževalnega sistema pri glodavcih (16) zagotavlja informacije o pripravi in ocenjevanju (endokrinih) organov in vaginalnih brisov, ki so lahko koristne za to preskusno metodo.

## VIRI

- (1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Na voljo na zahtevo pri Organizaciji za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokio, 27.–29. oktober 1992. . Na voljo na zahtevo pri Organizaciji za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (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., in Hayashi, Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). *J. Toxicol, Sci.*, 19, 141–149.
- (4) Tanaka, S., Kawashima, K., Naito, K., Usami, M., Nakadate, M., Imaida, K., Takahashi, M., Hayashi, Y., Kurokawa, Y., in Tobe, M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 18, 89–95.
- (5) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10.–11. marec 1998, na voljo na zahtevo pri Organizaciji za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (6) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 217), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 19.), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (8) Goldman, J. M., Murr, A. S., Buckalew, A. R., Ferrell, J. M., in Cooper, R. L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, del B, 80 (2), 84–97.

- (9) Sadleir, R. M. F. S. (1979). Cycles and Seasons, v: Auston, C. R., in Short, R. V. (ur.). *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.
- (10) IPCS (1986). *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals*. Environmental Health Criteria Document (št. 60).
- (11) Moser, V. C., McDaniel, K. M., in Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108, 267–283.
- (12) Meyer, O. A., Tilson, H. A., Byrd, W. C., in Riley, M. T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, 233–236.
- (13) Crofton, K. M., Howard, J. L., Moser, V. C., Gill, M. W., Reiter, L. W., Tilson, H. A., MacPhail, R. C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 599–609.
- (14) Gallavan, R. H., Jr., Holson, J. F., Stump, D. G., Knapp, J. F., in Reynolds, V. L. (1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, *Reproductive Toxicology*, 13: 383–390.
- (15) OECD (2013). *Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study*. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 151). Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (16) OECD (2009). *Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents*. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 106), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (17) Hess, R. A., in Moore, B. J. (1993). *Histological Methods for the Evaluation of the Testis. V: Methods in Reproductive Toxicology*, Chapin, R. E., in Heindel, J. J. (ur.). Academic Press: San Diego, Kalifornija, str. 52–85.
- (18) Latendresse, J. R., Warbritton, A. R., Jonassen, H., in Creasy, D. M. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol.* 30, 524–533.
- (19) OECD (2008). *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*. Environment, Health and Safety Publications,

Series on Testing and Assessment (št. 43), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(20) OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (št. 150), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

## Dodatek 1

### **OPREDELITVE POJMOV (GLEJ TUDI (20) SMERNICO OECD 150)**

Androgenost je zmožnost kemikalije, da deluje tako kot naravni androgeni hormon (npr. testosteron) v sesalskem organizmu.

Antiandrogenost je zmožnost kemikalije, da zavira delovanje naravnega androgenega hormona (npr. testosterona) v sesalskem organizmu.

Antiestrogenost je zmožnost kemikalije, da zavira delovanje naravnega estrogenega hormona (npr. 17  $\beta$ -estradiola) v sesalskem organizmu.

Protiščitnično delovanje je zmožnost kemikalije, da zavira delovanje naravnega ščitničnega hormona (npr. T<sub>3</sub>) v sesalskem organizmu.

Kemikalija je snov ali zmes.

Toksičnost za razvoj: pojavna oblika toksičnosti za razmnoževanje, ki se pri potomcih kaže kot pred-, ob- in poporodna strukturna ali funkcionalna motnja.

Odmerek je količina dane preskusne kemikalije. Izražen je kot masa preskusne kemikalije na enoto telesne teže preskusne živali na dan (npr. mg/kg telesne teže/dan) ali kot konstantna koncentracija v hrani.

Odmerjanje je splošen izraz, ki vključuje odmerek ter pogostnost in trajanje dajanja odmerka.

Očitna toksičnost je splošen izraz, ki opisuje jasne znake toksičnosti po dajanju preskusne kemikalije. Ti morajo zadostovati za oceno nevarnosti in biti takšni, da bi povečanje danega odmerka najverjetneje povzročilo razvoj resnih znakov toksičnosti in verjetno smrt.

Škodovanje plodnosti pomeni motnje razmnoževalnih funkcij ali sposobnosti za razmnoževanje pri samcih ali samicah.

Toksičnost pri materi: škodljivi učinki na breje samice, ki se pojavijo bodisi specifično (neposredni učinek) bodisi nespecifično (posredni učinek) in so povezani z brejostjo.

NOAEL je kratica za raven brez opaženih škodljivih učinkov (no-observed-adverse-effect level). To je največji odmerek, pri katerem ni opaženih škodljivih učinkov zaradi tretiranja.

Estrogenost je zmožnost kemikalije, da deluje tako kot naravni estrogeni hormon (npr. 17  $\beta$ -estradiol) v sesalskem organizmu.

Toksičnost za razmnoževanje pomeni škodljive učinke na potomstvo in/ali poškodovane razmnoževalne funkcije ali prizadete sposobnosti za razmnoževanje pri samcih in samicah.

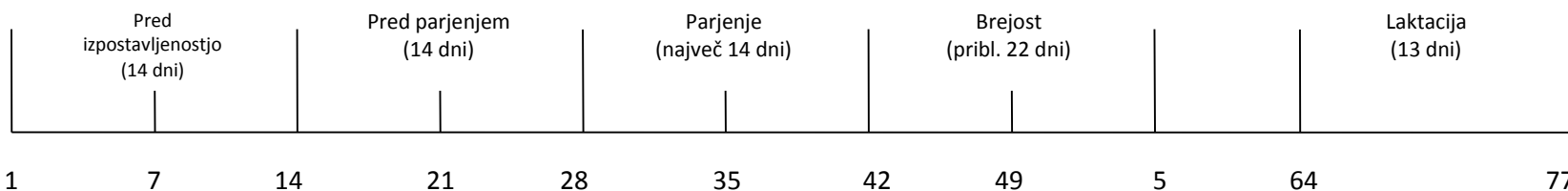
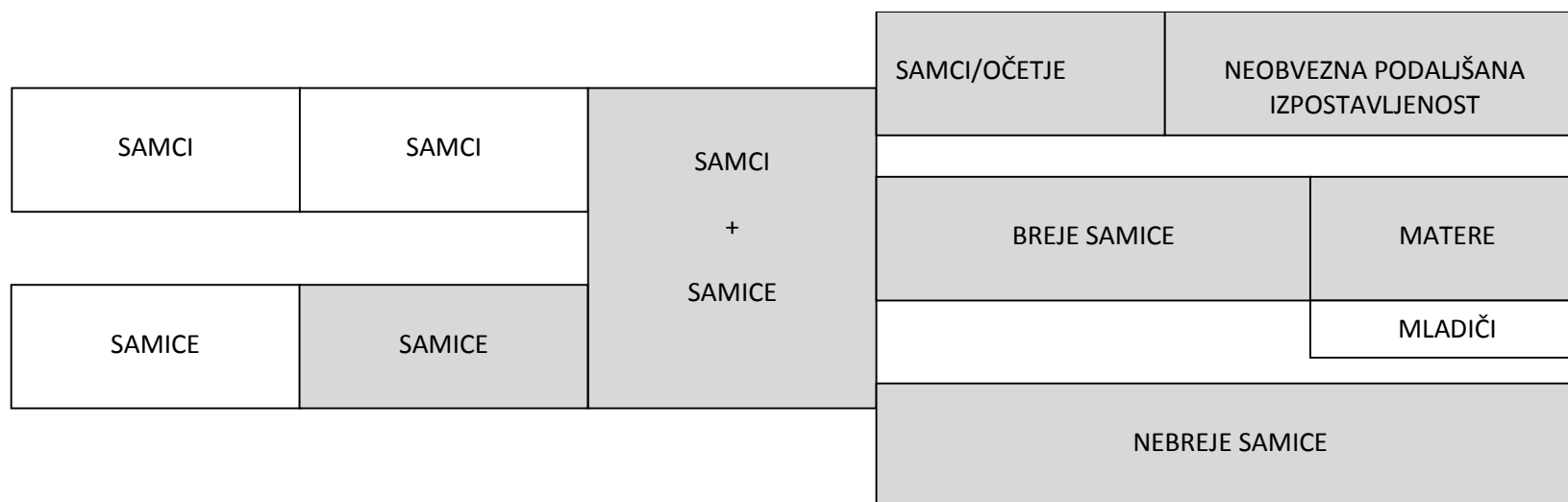
Preskusna kemikalija je vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

Ščitnično delovanje je zmožnost kemikalije, da deluje tako kot naravni ščitnični hormon (npr. T<sub>3</sub>) v sesalskem organizmu.

Validacija je znanstveni postopek, oblikovan za določanje zahtev glede delovanja in omejitev preskusne metode ter za prikaz njene zanesljivosti in ustreznosti za določen namen.

## **Dodatek 2**

**DIAGRAM NAČRTA POSKUSA Z NAVEDBO NAJDALJŠEGA TRAJANJA ŠTUDIJE NA PODLAGI POLNEGA 14-DNEVNEGA OBDOBJA PARJENJA**



Začetek študije

Ocena pojativne cikličnosti pred izpostavitvijo, ki ji sledi vsakodnevno spremljanje vaginalnih brisov od začetka tretiranja do dokazov o parjenju.

Hematološke/klinično kemijske preiskave pri samcih in samicah (neobvezno).

Obdukcija samcev/očetov. Funkcionalna opazovanja pri samcih (neobvezno). Hematološke/kliničnokemijske preiskave pri samcih ob usmrnitvi (po obdobju odmerjanja, ki traja vsaj 4 tedne).

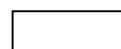
Kotitev (poporodni dan 0) do 4. poporodnega dne: zadnjično-genitalna razdalja pri vseh mladičih (poporodni dan 0 do 4; isti dan). Usmrnitev 2 mladičev na leglo za T4 (4. poporodni dan).

13. poporodni dan Obdukcija samic in mladičev. Obdukcija samcev/očetov (neobvezno). Funkcionalna opazovanja pri samcih (neobvezno) in samicah. Hematološke/kliničnokemijske preiskave pri samcih in samicah (neobvezno). Razvitost prsnih bradavic pri mladih samcih.

Odmerjanje



Brez odmerjanja





### Dodatek 3

## ZBIRNO POROČILO O UČINKIH NA RAZMNOŽEVANJE/RAZVOJ V OBLIKI PREGLEDNICE

OPAŽANJA	VREDNOSTI				
Odmerjanje (enote).....	0 (kontrola)	...	...	...	...
Začetni pari (N)					
Ciklus estrusa (vsaj srednja dolžina in pogostnost nerednih ciklusov)					
Samice, ki kažejo znake kopulacije (N)					
Samice, ki so dosegle brejost (N)					
Dnevi spočetja 1–5 (N)					
Dnevi spočetja 6– . . . <sup>(1)</sup> (N)					
Brejost ≤ 21 dni (N)					
Brejost = 22 dni (N)					
Brejost ≥ 23 dni (N)					
Matere z živimi novorojenimi mladiči (N)					
Matere z živimi mladiči 4. dan po porodu (N)					
Ugnezditve/mati (srednja vrednost)					
Živi mladiči/mati ob rojstvu (srednja vrednost)					
Živi mladiči/mati 4. dan (srednja vrednost)					
Razmerje med spoloma (m/ž) ob rojstvu (srednja vrednost)					
Razmerje med spoloma (m/ž) 4. dan (srednja vrednost)					
Teža legla ob rojstvu (srednja vrednost)					
Teža legla 4. dan (srednja vrednost)					
Teža mladičev ob rojstvu (srednja vrednost)					
Teža mladičev ob meritvi zadnjično-genitalne razdalje (srednja vrednost pri samcih, srednja vrednost pri samicah)					
Zadnjično-genitalna razdalja pri mladičih na isti dan po porodu, od rojstva do 4. dne (srednja vrednost pri samcih, srednja vrednost pri samicah, označi dan po porodu)					
Teža mladičev 4. dan (srednja vrednost)					
Teža mladičev 13. dan (srednja vrednost)					
Razvitost prsnih bradavic pri mladih samcih 13. dan (srednja					

<sup>(1)</sup> Zadnji dan obdobja parjenja.

vrednost)					
<b>MLADIČI Z ANOMALIJAMI</b>					
Matere z 0					
Matere z 1					
Matere z $\geq 2$					
<b>IZGUBA POTOMSTVA</b>					
<b>Predporodna (ugnezditve minus živorojeni)</b>					
Samice z 0					
Samice z 1					
Samice z 2					
Samice z $\geq 3$					
<b>Poporodna (živorojeni minus živi 13. dan po porodu)</b>					
Samice z 0					
Samice z 1					
Samice z 2					
Samice z $\geq 3$					

## B.65 PRESKUSNA METODA MEMBRANSKE PREGRADE *IN VITRO* V ZVEZI Z JEDKOSTJO ZA KOŽO

### UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje 435 (2015). Jedkost za kožo pomeni nastanek nepovračljive poškodbe kože, ki se kaže kot vidno odmiranje prek povrhnjice v usnjico po nanosu preskusne kemikalije, kot je opredeljeno v globalno usklajenem sistemu Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN) (1) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (uredba CLP)<sup>1</sup>. Ta preskusna metoda, enakovredna posodobljeni Smernici OECD za preskušanje 435, določa preskusno metodo membranske pregrade *in vitro*, ki se lahko uporabi za opredelitev jedkih kemikalij. Pri tej preskusni metodi se uporablja umetna membrana, zasnovana tako, da se na jedke kemikalije odzove podobno kot živalska koža *in situ*.
2. Jedkost za kožo se tradicionalno ocenjuje tako, da se preskusna kemikalija nanese na kožo živih živali, po določenem času pa se oceni obseg poškodb tkiva (2). Poleg te preskusne metode je bilo še več drugih preskusnih metod *in vitro* sprejetih kot alternative (3) (4) standardnemu postopku *in vivo* na koži kuncev (poglavje B.4 te priloge, enakovredno Smernici OECD za preskušanje 404), ki se uporablja za opredelitev jedkih kemikalij (2). V večstopenjski strategiji preskušanja in vrednotenja GHS ZN za oceno in razvrstitev jedkosti za kožo ter smernici OECD za celostne pristope k testiranju in ocenjevanju (IATA) v zvezi z draženjem kože/jedkostjo za kožo se priporoča uporaba validiranih in sprejetih preskusnih metod *in vitro* v okviru modulov 3 in 4 (1) (5). S pristopi IATA se opisuje več modulov, v katerih so zbrani viri informacij in orodja za analizo, ter ki (i) zagotavljajo smernice o tem, kako obstoječe podatke, pridobljene s preskušanjem, in podatke, ki ne temeljijo na preskušanju, združiti in uporabiti pri ocenjevanju potenciala kemikalij za draženje kože in jedkost za kožo, ter (ii) predlagajo pristop, kadar je potrebno dodatno preskušanje, med drugim kadar so dobljeni negativni rezultati (5). Pri tem modularnem pristopu se lahko pozitivni rezultati iz preskusnih metod *in vitro* uporabijo za razvrstitev kemikalije kot jedke, ne da bi bilo potrebno preskušanje na živalih, s čimer se

---

<sup>1</sup> Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 13.12.2008, str. 1).

zmanjša in izpopolni uporaba živali ter preprečita bolečina in trpljenje, ki ju lahko povzroči uporaba živali za ta namen.

- Validacijske študije so bile dokončane za model membranske pregrade *in vitro*, ki je na trgu na voljo kot Corrositex® (6) (7) (8) ter za podatkovno zbirko 163 snovi in zmesi kaže 79-odstotno splošno točnost pri napovedi jedkosti za kožo (128/163), 85-odstotno splošno točnost pri občutljivosti (76/89) in 70-odstotno splošno točnost pri specifičnosti (52/74) (7). Na podlagi njene priznane veljavnosti se je uporaba te validirane referenčne metode (VRM) priporočala v okviru večstopenjske strategije preskušanja za oceno potenciala nevarnosti kemikalij v zvezi z jedkostjo za kožo (5) (7). Preden se omogoči uporaba modela membranske pregrade *in vitro* v zvezi z jedkostjo za kožo za regulativne namene, je treba določiti njegovo zanesljivost, ustreznost (točnost) in omejitve, kar zadeva predlagano uporabo, da se zagotovi njegova primerljivost z VRM (9) v skladu s predhodno določenimi standardi izvajanja (10). Medsebojno priznavanje podatkov OECD bo zagotovljeno šele, ko bo predlagana nova ali posodobljena metoda v skladu s standardi izvajanja pregledana in vključena v enakovredno smernico OECD za preskušanje. Trenutno je s Smernico OECD za preskušanje 435 in to preskusno metodo zajeta samo ena metoda *in vitro*, tj. model Corrositex®, ki je na voljo na trgu.
- Druge preskusne metode za preskušanje jedkosti za kožo temeljijo na uporabi rekonstituirane človeške kože (Smernica OECD 431) (3) in izolirane kože podgan (Smernica OECD 430) (4). Ta smernica za preskušanje omogoča tudi razvrstitev jedkih kemikalij v tri podkategorije jedkosti po GHS ZN in tri skupine transportne embalaže ZN v zvezi z nevarnostjo za jedkost. Ta smernica za preskušanje je bila prvotno sprejeta leta 2006, leta 2015 pa je bila posodobljena zaradi sklicevanja na dokument s smernicami IATA in posodobitve seznama snovi za preverjanje usposobljenosti.

## **OPREDELITVE POJMOV**

- Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku.

## **ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE**

- Preskus, opisan v tej preskusni metodi, omogoča opredelitev jedkih preskusnih kemikalij in njihovo razvrstitev v podkategorije v skladu z GHS ZN/uredbo CLP (preglednica 1). Poleg tega se lahko taka preskusna metoda uporabi za sprejemanje odločitev o jedkosti in nejedkosti določenih razredov kemikalij, npr. organskih in anorganskih kislin, kislinskih

derivatov<sup>1</sup>, in baz za namene preskušanja nekaterih oblik transporta (7)(11)(12). S to preskusno metodo je opisan splošen postopek, podoben validirani referenčni preskusni metodi (7). Čeprav ta preskusna metoda ne zagotavlja ustreznih informacij o dražilnosti za kožo, je treba opozoriti, da se s preskusno metodo B.46 (enakovredno Smernici OECD za preskušanje 439) izrecno obravnava učinek dražilnosti za kožo *in vitro* na zdravje (13). Za popolno vrednotenje lokalnih učinkov na kožo po enkratni izpostavljenosti kože je treba uporabiti smernico OECD v zvezi s celostnimi pristopi k testiranju in ocenjevanju (IATA) (5).

**Preglednica 1:** Kategorija in podkategorije snovi, ki so jedke za kožo, po GHS ZN (1)

Kategorija jedkih snovi (kategorija 1) (za organe, ki ne uporabljajo podkategorij)	Podkategorije potencialnih jedkih snovi <sup>2</sup> (za organe, ki uporabljajo podkategorije, vključno z uredbo CLP)	Jedko pri $\geq$ tretjini živali	
		Izpostavljenost	Opazanje
Jedka snov	Podkategorija jedkih snovi 1A	$\leq 3$ minute	$\leq 1$ ura
	Podkategorija jedkih snovi 1B	$> 3$ minute / $\leq 1$ ura	$\leq 14$ dni
	Podkategorija jedkih snovi 1C	$> 1$ ura / $\leq 4$ ure	$\leq 14$ dni

7. Validirana referenčna metoda (7) je omejena s tem, da številne nejedke kemikalije in nekatere jedke kemikalije na podlagi rezultatov začetnega preskusa združljivosti morda niso primerne za preskušanje (glej odstavek 13). V vodi raztopljene kemikalije s pH v razponu od 4,5 do 8,5 pogosto niso primerne za preskušanje; vendar 85 % kemikalij, preskušanih v tem razponu pH, pri preskušanju na živalih ni bilo jedkih (7). Metoda membranske pregrade *in vitro* se lahko uporabi za preskušanje trdnih snovi (topnih ali netopnih v vodi), tekočih snovi (vodnih raztopin ali ne) in emulzij. Vendar preskusnih kemikalij, ki ne povzročijo zaznavne spremembe pri preskusu združljivosti (tj. spremembe barve v sistemu za zaznavanje kemikalij validirane referenčne preskusne metode), ni mogoče preskusiti z metodo membranske pregrade in jih je treba preskusiti z uporabo drugih preskusnih metod.

## NAČELO PRESKUSA

<sup>1</sup> ‚Kislinski derivat‘ je nespecifično poimenovanje razreda in je na splošno opredeljen kot kislina, proizvedena iz kemikalije bodisi neposredno bodisi z modifikacijo ali delno substitucijo. Ta razred vključuje anhidride, halogenirane kisline, soli in druge vrste kemikalij.

<sup>2</sup> Za EU se v uredbi CLP uporabljajo tri podkategorije jedkosti za kožo, in sicer 1A, 1B in 1C.

8. Preskusni sistem je sestavljen iz dveh delov: sintetične makromolekularne biološke pregrade in sistema za zaznavanje kemikalij; pri tej preskusni metodi se s sistemom za zaznavanje kemikalij odkrije poškodba membranske pregrade, ki je nastala zaradi jedke preskusne kemikalije po nanosu preskusne kemikalije na površino sintetične makromolekularne membranske pregrade (7) z domnevno enakimi mehanizmi jedkosti, kot delujejo na živi koži.
9. Prehajanje skozi membransko pregrado (ali preboj) se lahko meri z različnimi postopki ali sistemi za zaznavanje kemikalij, vključno s spremembo barve barvila, ki je indikator pH, ali neke druge lastnosti raztopine indikatorja pod pregrado.
10. Membransko pregrado je treba določiti kot veljavno, tj. ustrezno in zanesljivo za predvideno uporabo. To vključuje zagotovitev, da so različni pripravki skladni glede lastnosti pregrade, npr. sposobni zadržati nejedke snovi, da se lahko jedke lastnosti kemikalij razvrstijo v različne podkategorije jedkosti po GHS ZN (1). Dodeljena razvrstitev temelji na času, ki ga kemikalija potrebuje za prehod skozi membransko pregrado do raztopine indikatorja.

## DOKAZOVANJE USPOSOBLJENOSTI

11. Pred redno uporabo metode membranske pregrade *in vitro*, ki je v skladu s to preskusno metodo, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost, tako da pravilno razvrstijo 12 snovi za preverjanje usposobljenosti, priporočenih v preglednici 2. Kadar snov s seznama ni na voljo ali kadar je to utemeljeno, se lahko uporabi druga snov, za katero so na voljo ustrezni referenčni podatki *in vivo* in *in vitro* (npr. s seznama referenčnih kemikalij (10)), če se uporabijo enaka merila za izbor, kot so opisana v preglednici 1.

**Preglednica 2:** Snovi za preverjanje usposobljenosti<sup>1</sup>

Snov <sup>2</sup>	Št. CAS	Kemijski razred	Podkategorija <i>in vivo</i> po GHS ZN <sup>3</sup>	Podkategorija <i>in vitro</i> po GHS ZN <sup>3</sup>
Borov trifluorid dihidrat	13319-75-0	anorganske kisline	1A	1A
Dušikova kislina	7697-37-2	anorganske kisline	1A	1A
Fosforjev pentaklorid	10026-13-8	prekurzorji anorganskih kislin	1A	1A
Valerilklorid	638-29-9	kislinski kloridi	1B	1B
Natrijev hidroksid	1310-73-2	anorganske baze	1B	1B
1-(2-aminoetil) piperazin	140-31-8	alifatski amini	1B	1B

Benzensulfonil klorid	98-09-9	kislinski kloridi	1C	1C
N,N-dimetil benzilamin	103-83-3	anilini	1C	1C
Tetraetilenpentamin	112-57-2	alifatski amini	1C	1C
Evgenol	97-53-0	fenoli	NJ	NJ
Nonil akrilat	2664-55-3	akrilati/metakrilati	NJ	NJ
Natrijev bikarbonat	144-55-8	anorganske soli	NJ	NJ

<sup>1</sup> 12 zgoraj navedenih snovi vsebuje tri snovi iz vsake od treh podkategorij po GHS ZN za jedke snovi in tri nejedke snovi, na voljo so pri komercialnih dobaviteljih, podkategorija po GHS ZN pa temelji na rezultatih visokokakovostnega preskušanja *in vivo*. Te snovi so s seznama 40 referenčnih snovi, ki so vključene na najkrajši možni seznam kemikalij, opredeljenih za dokazovanje točnosti in zanesljivosti preskusnih metod, ki so strukturno in funkcionalno podobne validiranim referenčnim preskusnim metodam, in so bile izbrane izmed 163 referenčnih kemikalij, ki so se prvotno uporabljale za validacijo referenčne preskusne metode (Corrositex®) (7) (10) (14). Cilj tega izbirnega postopka je bil vključiti čim več kemikalij, ki: so predstavljale razpon odzivov jedkosti (npr. snovi, ki niso jedke; jedke snovi iz embalažnih skupin ZN I, II in III), ki jih je mogoče izmeriti ali napovedati z validirano referenčno metodo; so predstavljale kemijske razrede, uporabljene v validacijskih postopkih; imajo dobro opredeljene kemijske strukture; so dale obnovljive rezultate v validirani referenčni preskusni metodi; so dale dokončne rezultate pri referenčnem preskusu *in vivo*; so bile na voljo na trgu; niso bile povezane s previsokimi stroški odstranjevanja (14).

<sup>2</sup> Snovi, preskušene nerazredčene ali z  $\geq 90$ -odstotno čistostjo.

<sup>3</sup> Ustrezne embalažne skupine ZN so I, II in III za kategorije 1A, 1B oziroma 1C po GHS ZN. NJ: nejedka snov.

## POSTOPEK

12. V naslednjih odstavkih so opisani elementi in postopki preskusne metode umetne membranske pregrade za oceno jedkosti (7) (15) na podlagi trenutne VRM, tj. metode Corrositex®, ki je na voljo na trgu. Membranska pregrada ter raztopine za preverjanje združljivosti/indikatorje in kategorizacijo se lahko izdelajo, pripravijo ali dobijo na trgu, tako kot v primeru VRM Corrositex®. Na voljo je vzorčni protokol preskusne metode za validirano referenčno preskusno metodo (7). Preskušanje je treba izvesti pri sobni temperaturi (17–25 °C), elementi pa morajo izpolnjevati naslednje pogoje.

### Preskus združljivosti preskusne kemikalije

13. Pred izvedbo preskusa membranske pregrade se izvede preskus združljivosti, da se ugotovi, ali je preskusna kemikalija zaznavna s sistemom za zaznavanje kemikalij. Če sistem za zaznavanje kemikalij ne zazna preskusne kemikalije, preskusna metoda membranske pregrade ni primerna za ocenjevanje morebitne jedkosti navedene preskusne kemikalije in je treba uporabiti drugo preskusno metodo. Pri sistemu za zaznavanje kemikalij in pogojih izpostavljenosti, ki se uporabljajo za preskus združljivosti, je treba upoštevati izpostavljenost pri poznejšem preskusu membranske pregrade.

### Preskus kategorizacije preskusne kemikalije glede na časovno merilo

14. Če je to ustrezno za preskusno metodo, je treba na preskusni kemikaliji, ki je glede na preskus združljivosti primerna, opraviti preskus kategorizacije glede na časovno merilo, tj. presejalni preskus za razlikovanje med šibkimi in močnimi kislinami ali bazami. Pri validirani referenčni preskusni metodi se na primer preskus kategorizacije glede na časovno merilo uporablja za ugotovitev, katerega od dveh časovnih meril bi bilo treba uporabiti glede na to, ali se zazna velika kislina ali alkalna rezerva. Za določitev jedkosti in podkategorije jedkosti za kožo po GHS ZN je treba uporabiti dva različna prebojna časa, odvisno od kislega ali alkalnega rezerve preskusne kemikalije.

## **ELEMENTI PRESKUSNE METODE MEMBRANSKE PREGRADA**

### **Membranska pregrada**

15. Membransko pregrado sestavljata dva elementa: proteinski makromolekularni vodni gel in prepustna podporna membrana. Proteinski gel mora biti neprepusten za tekoče in trdne snovi, vendar ga je mogoče korodirati in narediti prepustnega. Popolnoma zgrajeno membransko pregrado je treba hraniti pri vnaprej določenih pogojih, ki dokazano preprečujejo slabšanje gela, tj. sušenje, rast mikrobov, dvigovanje in pokanje, zaradi katerega bi se poslabšala njegova učinkovitost. Določiti je treba sprejemljivo obdobje shranjevanja, po poteku katerega se pripravki membranske pregrade ne smejo uporabljati.
16. Prepustna podporna membrana zagotavlja mehansko podporo proteinskemu gelu med postopkom želiranja in izpostavljenostjo preskusni kemikaliji. Preprečevati mora pogrezanje in dvigovanje gela ter biti takoj prepustna za vse preskusne kemikalije.
17. Proteinski gel, ki ga sestavlja protein, npr. keratin, kolagen, ali zmes proteinov, ki tvorijo gelasti matriks, se uporablja kot ciljna snov za preskusno kemikalijo. Proteinski material se nanese na površino podporne membrane in pusti želirati, preden se membranska pregrada namesti nad raztopino indikatorja. Proteinski gel mora biti enakomerno debel in gost, brez zračnih mehurčkov ali nepravilnosti, ki bi lahko vplivale na njegovo funkcionalno celovitost.

### **Sistem za zaznavanje kemikalij**

18. Raztopina indikatorja, ki je enaka raztopini, uporabljeni za preskus združljivosti, mora reagirati na prisotnost preskusne kemikalije. Uporabiti je treba barvilo, ki je indikator pH, ali kombinacijo barvil, npr. krezol rdeče in metil oranžno, ki na prisotnost preskusne kemikalije reagirajo s spremembo barve. Merilni sistem je lahko vizualni ali elektronski.
19. Pri sistemih za zaznavanje, razvitih za zaznavanje prehoda preskusne kemikalije skozi membransko pregrado, je treba oceniti njihovo ustreznost in zanesljivost, da se dokažejo razpon zaznavnih kemikalij in količinske omejitve zaznavanja.

## **IZVEDBA PRESKUSA**

### **Namestitev elementov preskusne metode**

20. Membranska pregrada se namesti v vialo (ali epruveto), v kateri je raztopina indikatorja, tako da je podporna membrana v celoti v stiku z raztopino indikatorja in ni zračnih mehurčkov. Paziti je treba, da pregrada ostane cela.

### **Nanašanje preskusne kemikalije**

21. Primerna količina preskusne kemikalije, npr. 500 µl tekoče snovi ali 500 mg fino uprašene trdne snovi (7), se previdno nanese na zgornjo plast membranske pregrade in enakomerno porazdeli. Za vsako preskusno kemikalijo in njene ustrezne kontrole se pripravi ustrezno število ponovljenih vzorcev, npr. štiri (7) (glej odstavke od 23 do 25). Evidentira se čas nanosa preskusne kemikalije na membransko pregrado. Za zagotovitev, da so kratka obdobja jedkosti točno evidentirana, se preskusna kemikalija v vialo s ponovljenimi vzorci nanese postopoma.

### **Meritve prehajanja skozi membransko pregrado**

22. Vsaka viala se ustrezno spremlja, evidentira se čas prve spremembe raztopine indikatorja, tj. prehoda skozi pregrado, in določi čas, ki je pretekel med nanosom in prehodom skozi membransko pregrado.

### **Kontrole**

23. Pri preskusih, ki vključujejo uporabo vehikla ali topila s preskusno kemikalijo, mora biti vehikel ali topilo združljivo s sistemom membranske pregrade, tj. ne sme spreminjati celovitosti navedenega sistema ali jedkosti preskusne kemikalije. Kadar se uporabi, je treba kontrolo s topilom (ali vehiklom) preskusiti sočasno s preskusno kemikalijo, da se dokaže združljivost topila s sistemom membranske pregrade.
24. Pozitivno kontrolo (z jedko snovjo) s srednje jedkim delovanjem, npr.  $110 \pm 15$  mg natrijevega hidroksida (podkategorija jedke snovi 1B po GHS ZN) (7), je treba preskusiti sočasno s preskusno kemikalijo, da se oceni, ali je delovanje preskusnega sistema sprejemljivo. Druga pozitivna kontrola, ki je iz istega kemijskega razreda kot preskusna kemikalija, je lahko koristna za oceno relativnega potenciala jedkosti jedke preskusne kemikalije. Izbrati je treba pozitivne kontrole s srednjo jedkostjo (npr. podkategorija 1B po GHS ZN), da se zaznajo spremembe v času prehajanja, ki je lahko nedopustno daljši ali krajši od določene referenčne vrednosti, kar lahko kaže, da preskusni sistem ne deluje pravilno. Za ta namen je uporabnost izredno jedkih (podkategorija 1A po GHS ZN) ali nejedkih kemikalij omejena. Z jedko kemikalijo iz podkategorije 1B po GHS ZN bi bilo mogoče zaznati prehiter ali prepočasen prebojni čas. Šibko jedka snov (podkategorija 1C po GHS ZN) bi se lahko uporabila kot pozitivna kontrola za merjenje zmoglosti preskusne metode, da dosledno razlikuje med šibko jedkimi in nejedkimi kemikalijami. Ne glede na uporabljeni pristop je treba sprejemljiv razpon odziva pozitivne kontrole razviti na podlagi razpona prebojnih časov iz preteklih preskusov za uporabljene pozitivne kontrole, kot je

srednja vrednost  $\pm 2-3$  standardni odkloni. Da se lahko zaznajo odkloni zunaj sprejemljivega razpona, je treba pri vsaki študiji določiti točen prebojni čas za pozitivno kontrolo.

25. Negativno (nejedko) kontrolo, npr. 10-odstotno citronsko kislino ali 6-odstotno propionsko kislino (7), je prav tako treba preskusiti sočasno s preskusno kemikalijo kot še en ukrep za kontrolo kakovosti, da se dokaže funkcionalna celovitost membranske pregrade.

### Merila za sprejemljivost študije

26. V skladu z uveljavljenimi časovnimi parametri za vsako od podkategorij jedkosti po GHS ZN se čas (v minutah), ki preteče od nanosa preskusne kemikalije na membransko pregrado do prehoda skozi pregrado, uporabi za napoved jedkosti preskusne kemikalije. Da se študija šteje za sprejemljivo, morajo sočasne pozitivne kontrole dati pričakovani čas odziva na prehajanje (npr. prebojni čas 8–16 min za natrijev hidroksid, če se uporabi kot pozitivna kontrola), sočasna negativna kontrola ne sme biti jedka, sočasna kontrola s topilom, če se vključi, pa ne sme biti niti jedka niti ne sme spremeniti potenciala jedkosti preskusne kemikalije. Pred redno uporabo metode, ki izpolnjuje zahteve te preskusne metode, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost tako, da uporabijo 12 snovi, priporočenih v preglednici 2. Za nove podobne preskusne metode, razvite v okviru te preskusne metode, ki so strukturno in funkcionalno podobne validirani referenčni metodi (14), je treba pred začetkom uporabe nove metode kot predpisanega preskušanja uporabiti predhodno določene standarde izvajanja, da se dokažeta njena zanesljivost in točnost (10).

### Razlaga rezultatov in razvrstitev preskusnih kemikalij glede na jedkost

27. Čas (v minutah), ki preteče od nanosa preskusne kemikalije na membransko pregrado do prehoda skozi pregrado, se uporabi za razvrstitev preskusne kemikalije v podkategorije jedkih snovi po GHS ZN (1) in po potrebi v embalažno skupino ZN (16). Mejne časovne vrednosti za vsako od treh podkategorij jedkih snovi so določene za vsako predlagano preskusno metodo. Pri končnih odločitvah o mejnih časih je treba upoštevati potrebo po zmanjšanju nevarnosti za razvrstitev jedke snovi v prenizko kategorijo (tj. lažno negativne rezultate). V tej smernici za preskušanje je treba uporabiti mejne čase modela Corrositex®, kot je opisan v preglednici 3, saj je to edina preskusna metoda, ki trenutno spada v okvir smernice za preskušanje (7).

**Preglednica 3:** Napovedni model Corrositex®

Povprečni prebojni čas (v min)		Napoved po GHS ZN <sup>3</sup>
Preskusne kemikalije iz kategorije 1 <sup>1</sup> (določene s preskusom kategorizacije, ki je del	Preskusne kemikalije iz kategorije 2 <sup>2</sup> (določene s preskusom kategorizacije, ki je del metode)	

<b>metode)</b>		
0–3 min	0–3 min	<b>jedka neobvezna podkategorija 1A</b>
> 3 do 60 min	> 3 do 30 min	<b>jedka neobvezna podkategorija 1B</b>
> 60 do 240 min	> 30 do 60 min	<b>jedka neobvezna podkategorija 1C</b>
> 240 min	> 60 min	<b>nejedka</b>

<sup>1</sup> Preskusne kemikalije z veliko kisló/alkalno rezervo (6).

<sup>2</sup> Preskusne kemikalije z majhno kisló/alkalno rezervo (6).

<sup>3</sup> Podkategorije 1A, 1B in 1C po GHS ZN ustrezajo embalažnim skupinam ZN I, II oziroma III.

## PODATKI IN POROČANJE

### Podatki

28. Čas (v minutah), ki preteče od nanosa preskusne kemikalije in njenega prehoda skozi pregrado, ter pozitivnih kontrol je treba prikazati v obliki preglednice kot posamezne podatke za ponovljene vzorce in srednjo vrednost  $\pm$  standardni odklon za vsak poskus.

### Poročilo o preskusu

29. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

*Preskusna kemikalija in kontrolne snovi:*

- Snov iz ene sestavine: kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.
- Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi: čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin;
- fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;
- vir, številka serije, če je na voljo;
- obdelava preskusnih/kontrolnih kemikalij pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, drobljenje);

- stabilnost preskusne kemikalije, rok uporabe ali datum za ponovno analizo, če je znan;
- pogoji skladiščenja.

*Vehikel:*

- identifikacija, koncentracija (kjer je ustrezno), uporabljena količina;
- utemeljitev izbire vehikla.

*Model membranske pregrade in vitro in uporabljeni protokol, vključno z dokazano točnostjo in zanesljivostjo.*

*Preskusni pogoji:*

- opis uporabljene naprave in pripravljanih postopkov;
- vir in sestava uporabljene membranske pregrade *in vitro*;
- sestava in lastnosti raztopine indikatorja;
- metoda zaznavanja;
- količina preskusne kemikalije in kontrolne snovi;
- število ponovljenih vzorcev;
- opis in utemeljitev preskusa kategorizacije glede na časovno merilo;
- metoda nanosa;
- časi opazovanja;
- opis uporabljenih meril vrednotenja in razvrščanja;
- dokaz o usposobljenosti za izvajanje preskusne metode pred redno uporabo s preskušanjem kemikalij za preverjanje usposobljenosti.

*Rezultati:*

- preglednice z neobdelanimi podatki iz posameznih preskusnih in kontrolnih vzorcev za vsak ponovljeni vzorec;
- opisi drugih opaženih učinkov;
- izpeljana razvrstitev z navedbo uporabljenega napovednega modela/meril za odločitev.

*Razprava o rezultatih*

*Sklepne ugotovitve*

## VIRI

- (1) Združeni narodi (ZN) (2013). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS), peta revidirana izdaja, ZN New York in Ženeva, 2013. Na voljo na: [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) Poglavje B.4 te priloge, Akutno draženje kože, jedkost za kožo.
- (3) Poglavje B.40a te priloge, Jedkost za kožo *in vitro*: preskusna metoda rekonstruirane človeške pokožnice.
- (4) Poglavje B.40 te priloge, Jedkost za kožo *in vitro*: transkutana električna upornost (TER).
- (5) OECD (2015). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 203). Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (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., in Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxicology In Vitro* 12, 483–524.
- (7) ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (št. 99-4495.)
- (8) Gordon, V. C., Harvell, J. D., in Maibach, H. I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. *Alternative Methods in Toxicology* 10, 37–45.
- (9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment (št. 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. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na: <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, Italija. ATLA 29, 96–97.
- (12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (peti pregled). (20. september 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.
- (13) Poglavje B.46 te priloge, Draženje kože *in vitro*: preskusna metoda rekonstruirane človeške pokožnice. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication št. 04-4510. Na voljo na: [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. Na voljo na: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf>.
- (15) Združeni narodi (ZN) (2013). Priporočila ZN o prevozu nevarnega blaga, Vzorčni predpisi, 18. revidirana izdaja (del, poglavje 2.8), ZN, 2013. Na voljo na: [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

### OPREDELITVE POJMOV

**Točnost:** stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz ‚skladnost‘ se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusne metode (9).

**Kemikalija:** snov ali zmes.

**Sistem za zaznavanje kemikalij:** vizualni ali elektronski merilni sistem z raztopino indikatorja, ki na prisotnost preskusne kemikalije reagira na primer s spremembo barve barvila, ki je indikator pH, ali kombinacije barvil, ki na prisotnost preskusne kemikalije reagirajo s spremembo barve ali z drugimi vrstami kemijskih ali elektrokemijskih reakcij.

**Skladnost:** je merilo učinkovitosti za preskusne metode, s katerimi se pridobijo kategorični rezultati, in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz točnost se včasih uporabljata kot sopomenki in pomenita delež vseh preskušanih kemikalij, ki so pravilno razvrščene kot pozitivne ali negativne. Skladnost je zelo odvisna od razširjenosti pozitivnih rezultatov v vrstah preučevane preskusne kemikalije (9).

**GHS (globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij):** sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudi (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (1).

**IATA:** Integrated Approach to Testing and Assessment (celostni pristop k testiranju in ocenjevanju).

**Zmes:** zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi.

**Snov iz ene sestavine:** snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je vsaj 80 mas. % glavne sestavine.

**Snov z več sestavinami:** snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je več glavnih sestavin s koncentracijo  $\geq 10$  mas. % in  $< 80$  mas. %. Snov z več sestavinami je rezultat proizvodnega postopka. Razlika med zmesjo in snovjo z več sestavinami je v tem, da je zmes pridobljena z mešanjem dveh ali več snovi brez kemične reakcije. Snov z več sestavinami je rezultat kemične reakcije.

**NJ:** nejedko.

**Standardi izvajanja:** standardi, ki temeljijo na validirani preskusni metodi in so podlaga za oceno primerljivosti predlagane preskusne metode, ki je funkcijsko in mehanistično

podobna. Vključujejo (i) nujne elemente preskusne metode; (ii) najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij, izbranih iz skupine kemikalij, ki se uporabljajo za dokazovanje sprejemljive učinkovitosti validirane preskusne metode, ter (iii) podobne stopnje zanesljivosti in točnosti, ki temeljijo na rezultatih validirane preskusne metode, ki jih mora dokazati predlagana preskusna metoda pri ocenjevanju ob uporabi najkrajšega možnega seznama referenčnih kemikalij (9).

**Ustreznost:** opis razmerja med preskusno metodo in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere preskusna metoda pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Pri ustreznosti se upošteva tudi točnost (skladnost) preskusne metode (9).

**Zanesljivost:** stopnja obnovljivosti preskusne metode v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih (9).

**Občutljivost:** delež vseh pozitivnih/aktivnih kemikalij, ki se s preskusno metodo pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (9).

**Jedkost za kožo *in vivo*:** nastanek nepovračljivih poškodb kože: zlasti vidnega odmiranja prek povrhnjice v usnjico po nanosu preskusne kemikalije za največ 4 ure. Za reakcije jedkosti so značilne razjede, krvavitve, krvave hraste in do konca 14-dnevnega opazovanja izguba barve zaradi beljenja kože, celi predeli alopecije in brazgotine. Dvournne lezije je morda treba preiskati histopatološko.

**Specifičnost:** delež vseh negativnih/neaktivnih kemikalij, ki se s preskusno metodo pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (9).

**Snov:** kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo.

**Preskusna kemikalija:** vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

**UVCB:** snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

## **B.66 PRESKUSI TRANSAKTIVACIJE S STABILNO TRANSFEKCIJO *IN VITRO* ZA ZAZNAVO AGONISTOV IN ANTAGONISTOV ESTROGENSKIH RECEPTORJEV**

### **SPLOŠNI UVOD**

#### **Smernica OECD za preskušanje na podlagi učinkovitosti**

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje 455 (2016). Smernica za preskušanje 455 temelji na učinkovitosti, z njo pa je opisana metodologija *in vitro* preskusov transaktivacije s stabilno transfekcijo za zaznavo agonistov in antagonistov estrogenskih receptorjev (v nadaljnjem besedilu: preskusi ER TA). Vključuje več mehanistično in funkcionalno podobnih preskusnih metod za opredelitev agonistov in antagonistov estrogenskih receptorjev (tj. ER $\alpha$  in/ali ER $\beta$ ) ter naj bi olajšala razvoj novih podobnih ali prilagojenih preskusnih metod v skladu z načeli za validacijo, določenimi v Smernici OECD za validacijo in mednarodno priznanje novih ali posodobljenih preskusnih metod za oceno nevarnosti (1). Popolnoma validirani referenčni preskusni metodi (Dodatek 2 in Dodatek 3), ki sta podlaga za to smernico za preskušanje na podlagi učinkovitosti, sta:
  - preskus transaktivacije s stabilno transfekcijo (STTA) (2) z uporabo celične linije (h) ER $\alpha$ -HeLa-9903 in
  - preskus ER TA VM7Luc (3) z uporabo celične linije VM7Luc4E2<sup>1</sup>, ki večinoma izraža hER $\alpha$  z določenim prispevkom hER $\beta$  (4) (5).

Za razvoj in validacijo podobnih preskusov za isto končno točko nevarnosti so na voljo standardi izvajanja (6) (7) in jih je tudi treba uporabiti. Omogočajo pravočasno spremembo na učinkovitosti temelječe Smernice za preskušanje 455, tako da je mogoče posodobljeni smernici za preskušanje, ki temelji na učinkovitosti, dodati nove podobne preskuse; podobni preskusi bodo sicer dodani šele, ko jih bo OECD pregledala in potrdila, da so v skladu s standardi izvajanja. Preskusi, vključeni v Smernico za preskušanje 455, se lahko brez razlik uporabljajo za obravnavanje

---

<sup>1</sup> Pred junijem 2016 se je ta celična linija imenovala BG1Luc. Celice BG-1 so prvotno opisali Geisinger *et al.* (1998) (35), pozneje pa so njihove lastnosti opredelili raziskovalci inštituta National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (36). Še ne tako daleč nazaj so odkrili, da obstajata dve varianti celic BG-1, ki ju uporabljajo raziskovalci, tj. BG-1 Fr in BG-1 NIEHS. Poglobljena analiza, ki je vključevala testiranje DNK, teh dveh variant celične linije BG-1, ki so jo izvedli Li in sodelavci (2014) (37), je pokazala, da je BG-1 Fr edinstvena in da BG-1 NIEHS, tj. prvotna celična linija, ki je bila uporabljena za razvoj preskusa, ni celična linija karcinoma jajčnikov pri človeku BG1, temveč je varianta celične linije raka dojke pri človeku, MCF7. Celična linija, uporabljena v preskusu, ki se je prvotno imenovala BG1Luc4E2 (38), se bo zdaj imenovala VM7Luc4E2 (V<sup>c</sup> = varianta; M7<sup>c</sup> = celice MCF7). Podobno se bo tudi preskus zdaj imenoval VM7Luc ER TA. Čeprav se s tem spremeni izvor celične linije, na kateri temelji preskus, to ne vpliva na objavljene validacijske študije niti na koristnost in uporabo tega preskusa za presejanje estrogenskih/antiestrogenskih kemikalij.

zahtev držav OECD po rezultatih preskusov v zvezi s transaktivacijo estrogenskih receptorjev, hkrati pa se izkoristi medsebojno priznavanje podatkov OECD.

### **Ozadje in načela preskusov, vključenih v to preskusno metodo**

2. OECD se je leta 1998 začela ukvarjati s prednostno nalogo revidiranja obstoječih smernic za preskušanje ter priprave novih smernic za presejalne preskuse in preskušanje kemikalij, ki bi lahko povzročale endokrine motnje. Temeljni okvir OECD za preskušanje in ocenjevanje kemikalij, ki bi lahko povzročale endokrine motnje, je bil revidiran leta 2012. Prvotni in revidirani temeljni okvir sta kot prilogi vključena v Smernice OECD za standardizirane smernice za preskušanje za ocenjevanje kemikalij glede lastnosti endokrinih motilcev (8). Temeljni okvir zajema pet ravni, pri čemer vsaka raven ustreza posamezni stopnji biološke kompleksnosti. Preskusi transaktivacije ER (TA), opisani v tej preskusni metodi, so raven 2, ki vključuje *preskuse in vitro, ki zagotavljajo podatke o izbranih endokrinih mehanizmih/poteh*. Ta preskusna metoda je za preskuse transaktivacije (TA) *in vitro*, s katerimi se opredelijo agonisti in antagonisti estrogenskih receptorjev (ER).
3. Interakcija med estrogeni in ER lahko vpliva na transkripcijo genov pod nadzorom estrogena, kar lahko povzroči indukcijo ali inhibicijo celičnih procesov, vključno s tistimi, ki so nujni za celično proliferacijo, normalen razvoj zarodka in razmnoževalno funkcijo (9) (10) (11). Motnja normalnih estrogenskih sistemov ima lahko škodljive učinke na normalen razvoj (ontogenezo), reproduktivno zdravje in celovitost razmnoževalnega sistema.
4. Preskusi TA *in vitro* temeljijo na neposredni ali posredni interakciji med snovmi in določenim receptorjem, ki uravnava transkripcijo produkta poročevalskega gena. Taki preskusi se obsežno uporabljajo za oceno izražanja genov, uravnavanega s posebnimi jedrnimi receptorji, kot so ER (12) (13) (14) (15) (16). Predlagani so bili za zaznavanje estrogenske transaktivacije, uravnavane z ER (17) (18) (19). Obstajata najmanj dve večji podvrsti jedrnih ER, tj.  $\alpha$  in  $\beta$ , ki sta kodirani z različnimi geni. Zadevni proteini imajo različne biološke funkcije ter različne afinitete za porazdelitev v tkivu in vezavo ligandov (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26). Jedrni ER $\alpha$  povzroči klasični estrogenski odziv (27) (28) (29) (30), zato je večina modelov, ki se trenutno razvijajo za merjenje aktivacije ali inhibicije ER, specifičnih za ER $\alpha$ . Preskusi se uporabljajo za opredelitev kemikalij, ki aktivirajo (ali zavirajo) ER po vezavi liganda, po kateri se kompleks receptor-ligand veže na specifične odzivne elemente DNK in transaktivira poročevalski gen, zaradi česar se poveča celično izražanje označevalnega proteina. Pri teh preskusih se lahko uporabljajo različni odzivi poročevalskega gena. V luciferaznih sistemih luciferazni encim pretvori substrat luciferin v bioluminiscenten produkt, ki ga je mogoče kvantitativno izmeriti z luminometrom. Drugi primeri pogostih poročevalskih genov so fluorescenčni protein in gen *LacZ*, ki kodira  $\beta$ -galaktozidazo, tj. encim, ki lahko pretvori brezbarvni substrat X-gal (5-bromo-4-kloro-indolil-galaktopiranozid) v moder produkt, ki ga je mogoče kvantificirati s spektrofotometrom. Te poročevalske

gene je mogoče hitro in poceni oceniti s preskusnimi kompleti, ki so na voljo na trgu.

5. Z validacijskimi študijami preskusov transaktivacije s stabilno transfekcijo (STTA) in VM7Luc TA sta bili dokazani njuna ustreznost in zanesljivost za predvideni namen (3) (4) (5) (30). Standardi izvajanja za preskuse ER TA, temelječe na luminiscenci, z uporabo celičnih linij dojčk so vključeni v ocenjevalno poročilo ICCVAM o preskusni metodi LUMI-CELL<sup>®</sup> ER (VM7Luc ER TA): Preskus *in vitro* za opredelitev agonističnega in antagonističnega delovanja kemikalij na človeške estrogenske receptorje (3). Ti standardi izvajanja so bili prilagojeni tako, da se lahko uporabljajo za preskusa STTA in VM7Luc TA (2).
6. Opredelitve pojmov in kratice, uporabljene pri tej preskusni metodi, so opisane v Dodatku 1.

### **Obseg in omejitve v zvezi s preskusi TA**

7. Ti preskusi so predlagani za namene presejanja in prednostnega razvrščanja, lahko pa zagotovijo tudi mehanistične podatke, ki se lahko uporabijo pri pristopu, temelječem na zanesljivosti dokazov. Z njimi se obravnava TA, povzročena z vezavo kemikalije na ER v sistemu *in vitro*. Tako se rezultati ne smejo neposredno ekstrapolirati na kompleksno signaliziranje in uravnavanje nedotaknjene endokrinega sistema *in vivo*.
8. TA, povzročena z ER, se šteje za enega od ključnih mehanizmov motenj endokrinega sistema, čeprav obstajajo še drugi mehanizmi, prek katerih lahko pride do takih motenj, vključno z (i) interakcijami z drugimi receptorji in encimskimi sistemi znotraj endokrinega sistema, (ii) sintezo hormonov, (iii) presnovno aktivacijo in/ali inaktivacijo hormonov, (iv) porazdelitvijo hormonov v tarčna tkiva in (v) očistkom hormonov iz telesa. Ti načini delovanja se ne obravnavajo z nobenim od preskusov v okviru te preskusne metode.
9. S to preskusno metodo se obravnava sposobnost kemikalije, da aktivira (tj. deluje kot agonist) in tudi zavira (tj. deluje kot antagonist) od ER odvisno transkripcijo. Nekatero kemikalije lahko, odvisno od vrste celic, delujejo kot agonisti in antagonisti ter so poznane kot selektivni modulatorji estrogenih receptorjev (SERM). Kemikalije, ki so pri teh preskusih negativne, bi se lahko ocenile pri preskusu vezave na ER, preden se ugotovi, da se kemikalija ne veže na receptor. Poleg tega preskusi verjetno dajejo samo informacije o delovanju matične molekule, saj je treba upoštevati omejene presnovne zmogljivosti celičnih sistemov *in vitro*. Glede na to, da so se med validacijo uporabile samo posamezne snovi, uporaba za preskušanje zmesi ni bila obravnavana. Kljub temu je preskusna metoda teoretično ustrezna tudi za preskušanje snovi z več sestavinami, UVCB in zmesi. Preden se ta preskusna metoda uporabi za snov z več sestavinami, UVCB ali zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj

lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni.

10. Informativno so v preglednici 1 navedeni rezultati preskusov agonistov za 34 snovi, ki so bile preskušene v obeh popolnoma validiranih referenčnih preskusnih metodah, opisanih v tej preskusni metodi. Od teh snovi jih je 26 razvrščenih med dokončne agoniste ER, 8 pa je negativnih na podlagi objavljenih poročil, vključno s preskusi *in vitro* za vezavo na ER in TA, in/ali uterotropnega preskusa (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34). V preglednici 2 so navedeni rezultati preskusov antagonistov za 15 snovi, ki so bile preskušene v obeh popolnoma validiranih referenčnih preskusnih metodah, opisanih v tej preskusni metodi. Od teh snovi so 4 razvrščene med dokončne/domnevne antagoniste ER, 10 pa je negativnih na podlagi objavljenih poročil, vključno s preskusi *in vitro* za vezavo na ER in TA (2) (3) (18) (31). Glede podatkov, povzetih v preglednicah 1 in 2, je obstajalo 100-odstotno ujemanje med obema referenčnima preskusnima metodama v zvezi z razvrščanjem vseh snovi razen ene (Mifepristone) za preskus z antagonistom, vse snovi pa so bile pravilno razvrščene med agoniste/antagoniste ER ali negativne. Dodatne informacije o tej skupini kemikalij in dodatnih kemikalijah, preskušeni v preskusih STTA in VM7Luc ER TA med validacijskimi študijami, so na voljo v standardih izvajanja za ERTA (6) (7), Dodatek 2 (preglednice 1, 2 in 3).

**Preglednica 1:** Pregled rezultatov preskusov STTA in VM7Luc ER TA za snovi, preskušene pri obeh preskusih z agonistom in razvrščene med agoniste ER (POZ) ali negativne (NEG)

	Snov	Št. CAS	Preskus STTA <sup>1</sup>			Preskus VM7Luc ER TA <sup>2</sup>		Vir podatkov za razvrstitev <sup>4</sup>		
			Delovanje ER TA	Vrednost PC <sub>10</sub> (M)	Vrednost PC <sub>50</sub> <sup>b</sup> (M)	Delovanje ER TA	Vrednost EC <sub>50</sub> <sup>b,3</sup> (M)	Drugi ER TA <sup>c</sup>	Vezava na ER	Uterotropno
1	17β-estradiol <sup>a</sup>	50-28-2	POZ	< 1,00 × 10 <sup>-11</sup>	< 1,00 × 10 <sup>-11</sup>	POZ	5,63 × 10 <sup>-12</sup>	POZ (227/227)	POZ	POZ
2	17α-estradiol <sup>a</sup>	57-91-0	POZ	7,24 × 10 <sup>-11</sup>	6,44 × 10 <sup>-10</sup>	POZ	1,40 × 10 <sup>-9</sup>	POZ (11/11)	POZ	POZ
3	17α-ethinil estradiol <sup>a</sup>	57-63-6	POZ	< 1,00 × 10 <sup>-11</sup>	< 1,00 × 10 <sup>-11</sup>	POZ	7,31 × 10 <sup>-12</sup>	POZ (22/22)	POZ	POZ
4	17β-trenbolon	10161-33-8	POZ	1,78 × 10 <sup>-8</sup>	2,73 × 10 <sup>-7</sup>	POZ	4,20 × 10 <sup>-8</sup>	POZ (2/2)	NP	NP
5	19-nortestosteron <sup>a</sup>	434-22-0	POZ	9,64 × 10 <sup>-9</sup>	2,71 × 10 <sup>-7</sup>	POZ	1,80 × 10 <sup>-6</sup>	POZ (4/4)	POZ	POZ
6	4-kumilfenol <sup>a</sup>	599-64-4	POZ	1,49 × 10 <sup>-7</sup>	1,60 × 10 <sup>-6</sup>	POZ	3,20 × 10 <sup>-7</sup>	POZ (5/5)	POZ	NP
7	4- <i>terc</i> -oktilfenol <sup>a</sup>	140-66-9	POZ	1,85 × 10 <sup>-9</sup>	7,37 × 10 <sup>-8</sup>	POZ	3,19 × 10 <sup>-8</sup>	POZ (21/24)	POZ	POZ
8	Apigenin <sup>a</sup>	520-36-5	POZ	1,31 × 10 <sup>-7</sup>	5,71 × 10 <sup>-7</sup>	POZ	1,60 × 10 <sup>-6</sup>	POZ (26/26)	POZ	NP
9	Atrazin <sup>a</sup>	1912-24-9	NEG	–	–	NEG	–	NEG (30/30)	NEG	NP
10	Bisfenol A <sup>a</sup>	80-05-7	POZ	2,02 × 10 <sup>-8</sup>	2,94 × 10 <sup>-7</sup>	POZ	5,33 × 10 <sup>-7</sup>	POZ (65/65)	POZ	POZ
11	Bisfenol B <sup>a</sup>	77-40-7	POZ	2,36 × 10 <sup>-8</sup>	2,11 × 10 <sup>-7</sup>	POZ	1,95 × 10 <sup>-7</sup>	POZ (6/6)	POZ	POZ
12	Butilbenzil ftalat <sup>a</sup>	85-68-7	POZ	1,14 × 10 <sup>-6</sup>	4,11 × 10 <sup>-6</sup>	POZ	1,98 × 10 <sup>-6</sup>	POZ (12/14)	POZ	NEG
13	Kortikosteron <sup>a</sup>	50-22-6	NEG	–	–	NEG	–	NEG (6/6)	NEG	NP
14	Kumestrol <sup>a</sup>	479-13-0	POZ	1,23 × 10 <sup>-9</sup>	2,00 × 10 <sup>-8</sup>	POZ	1,32 × 10 <sup>-7</sup>	POZ (30/30)	POZ	NP
15	Daidzein <sup>a</sup>	486-66-8	POZ	1,76 × 10 <sup>-8</sup>	1,51 × 10 <sup>-7</sup>	POZ	7,95 × 10 <sup>-7</sup>	POZ (39/39)	POZ	POZ
16	Dietilstilbestrol <sup>a</sup>	56-53-1	POZ	< 1,00 × 10 <sup>-11</sup>	2,04 × 10 <sup>-11</sup>	POZ	3,34 × 10 <sup>-11</sup>	POZ (42/42)	POZ	NP
17	Di-n-butil ftalat	84-74-2	POZ	4,09 × 10 <sup>-6</sup>		POZ	4,09 × 10 <sup>-6</sup>	POZ (6/11)	POZ	NEG
18	Etil paraben	120-47-8	POZ	5,00 × 10 <sup>-6</sup>	(brez PC50)	POZ	2,48 × 10 <sup>-5</sup>	POZ		NP
19	Estron <sup>a</sup>	53-16-7	POZ	3,02 × 10 <sup>-11</sup>	5,88 × 10 <sup>-10</sup>	POZ	2,34 × 10 <sup>-10</sup>	POZ (26/28)	POZ	POZ
20	Genistein <sup>a</sup>	446-72-0	POZ	2,24 × 10 <sup>-9</sup>	2,45 × 10 <sup>-8</sup>	POZ	2,71 × 10 <sup>-7</sup>	POZ (100/102)	POZ	POZ
21	Haloperidol	52-86-8	NEG	–	–	NEG	–	NEG (2/2)	NEG	NP
22	Kampferol <sup>a</sup>	520-18-3	POZ	1,36 × 10 <sup>-7</sup>	1,21 × 10 <sup>-6</sup>	POZ	3,99 × 10 <sup>-6</sup>	POZ (23/23)	POZ	NP
23	Kepon <sup>a</sup>	143-50-0	POZ	7,11 × 10 <sup>-7</sup>	7,68 × 10 <sup>-6</sup>	POZ	4,91 × 10 <sup>-7</sup>	POZ (14/18)	POZ	NP
24	Ketokonazol	65277-42-1	NEG	–	–	NEG	–	NEG (2/2)	NEG	NP

25	Linuron <sup>a</sup>	330-55-2	NEG	–	–	NEG	–	NEG (8/8)	NEG	NP
26	Mezo-heksestrol <sup>a</sup>	84-16-2	POZ	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	POZ	$1,65 \times 10^{-11}$	POZ (4/4)	POZ	NP
27	Metiltestosteron <sup>a</sup>	58-18-4	POZ	$1,73 \times 10^{-7}$	$4,11 \times 10^{-6}$	POZ	$2,68 \times 10^{-6}$	POZ (5/6)	POZ	NP
28	Morin	480-16-0	POZ	$5,43 \times 10^{-7}$	$4,16 \times 10^{-6}$	POZ	$2,37 \times 10^{-6}$	POZ (2/2)	POZ	NP
29	Noretinodrel <sup>a</sup>	68-23-5	POZ	$1,11 \times 10^{-11}$	$1,50 \times 10^{-9}$	POZ	$9,39 \times 10^{-10}$	POZ (5/5)	POZ	NP
30	<i>P,p'</i> -metoksiklor <sup>a</sup>	72-43-5	POZ	$1,23 \times 10^{-6}$	(brez PC <sub>50</sub> ) <sup>b</sup>	POZ	$1,92 \times 10^{-6}$	POZ (24/27)	POZ	POZ
31	Fenobarbital <sup>a</sup>	57-30-7	NEG	–	–	NEG	–	NEG (2/2)	NEG	NP
32	Reserpin	50-55-5	NEG	–	–	NEG	–	NEG (4/4)	NEG	NP
33	Spirololakton <sup>a</sup>	52-01-7	NEG	–	–	NEG	–	NEG (4/4)	NEG	NP
34	Testosteron	58-22-0	POZ	$2,82 \times 10^{-8}$	$9,78 \times 10^{-6}$	POZ	$1,75 \times 10^{-5}$	POS (5/10)	POZ	NP

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS); M = molaren; EC<sub>50</sub> = srednja efektivna koncentracija preskusne snovi; NEG = negativno; POZ = pozitivno; NP = ni preskušeno; PC<sub>10</sub> (in PC<sub>50</sub>) = koncentracija preskusne snovi, pri kateri odziv znaša 10 % (ali 50 % za PC<sub>50</sub>) odziva, ki ga na posamezni plošči povzroči pozitiven kontrolni vzorec (E2, 1 nM).

<sup>a</sup> Običajne snovi, preskušene s preskusoma STTA in VM7Luc ER TA, ki so bile opredeljene kot agonisti ER ali negativne in so bile uporabljene za oceno točnosti pri validacijski študiji VM7Luc ER TA (ocenjevalno poročilo ICCVAM VM7Luc ER TA, preglednica 4-1) (3).

<sup>b</sup> Najvišja koncentracija, preskušena brez omejitev zaradi citotoksičnosti ali netopnosti, je bila  $1 \times 10^{-5}$  M (preskus STTA) oziroma  $1 \times 10^{-3}$  M (preskus VM7Luc ER TA).

<sup>c</sup> V oklepaju je navedeno število rezultatov preskusa, označenih za pozitivne (POZ) ali negativne (NEG), od skupnega števila zajetih študij.

<sup>1</sup> Vrednosti iz osnutka poročila o predhodni validaciji in medlaboratorijski validaciji preskusa transkripcijske aktivacije (TA) s stabilno transfekcijo za zaznavo estrogenskega delovanja – preskus z reporterskim genom, povzročenim s človeškim estrogenskim receptorjem alfa, z uporabo celične linije hER-HeLa-9903 (2).

<sup>2</sup> Ocenjevalno poročilo ICCVAM o preskusni metodi LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): metoda *in vitro* za opredelitev agonistov in antagonistov ER (3).

<sup>3</sup> Srednje vrednosti EC<sub>50</sub> so bile izračunane z vrednostmi, ki so jih sporočili laboratoriji iz validacijske študije VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM in Hiyoshi) (3).

<sup>4</sup> Razvrstitev med agoniste ER ali negativne je temeljila na informacijah iz dokumentov ICCVAM o pregledu ozadja preskusnih metod vezave ER in TA (31) ter informacijah, pridobljenih iz objav, ki so bile objavljene in pregledane po dokončanju dokumentov ICCVAM o pregledu ozadja (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Opombe: Vsak preskus v okviru te preskusne metode nima enakih meritev. V nekaterih primerih EC<sub>50</sub> ni mogoče izračunati, ker ni dobljena celotna krivulja odziva na odmerek. Medtem ko je pri preskusu STTA vrednost PC<sub>10</sub> ključna meritev, so možni še drugi primeri, pri katerih PC<sub>x</sub> zagotovi koristne informacije.

**Preglednica 2:** Primerjava rezultatov preskusov STTA in VM7Luc ER TA za snovi, preskušene pri obeh preskusih z antagonistom in razvrščene med antagoniste ER (POZ) ali negativne (NEG)

	Snov <sup>a</sup>	Št. CAS	Preskus ER STTA <sup>1</sup>		Preskus VM7Luc ER TA <sup>2</sup>		Učinki kandidatne snovi za ER STTA <sup>4</sup>	Dogovorjena razvrstitev <sup>5</sup> ICCVAM	Kemijski razred MeSH <sup>6</sup>	Skupina proizvodov <sup>7</sup>
			Delovanje ER TA	Vrednost IC <sub>50</sub> <sup>b</sup> (M)	Delovanje ER TA	Vrednost IC <sub>50</sub> <sup>b,3</sup> (M)				
1	4-hidroksitamoksifen	68047-06-3	POZ	$3,97 \times 10^{-9}$	POZ	$2,08 \times 10^{-7}$	zmerno POZ	POZ	ogljikovodik (ciklični)	farmacevtsko sredstvo
2	Dibenzo[a,h] antracen	53-70-3	POZ	brez IC <sub>50</sub>	POZ	brez IC <sub>50</sub>	POZ	DP	policiklična spojina	laboratorijska kemikalija, naravni produkt
3	Mifepriston	84371-65-3	POZ	$5,61 \times 10^{-6}$	NEG	–	blago POZ	NEG	steroid	farmacevtsko sredstvo
4	Raloksifen HCl	82640-04-8	POZ	$7,86 \times 10^{-10}$	POZ	$1,19 \times 10^{-9}$	zmerno POZ	POZ	ogljikovodik (ciklični)	farmacevtsko sredstvo
5	Tamoksifen	10540-29-1	POZ	$4,91 \times 10^{-7}$	POZ	$8,17 \times 10^{-7}$	POZ	POZ	ogljikovodik (ciklični)	farmacevtsko sredstvo
6	17β-estradiol	50-28-2	NEG	–	NEG	–	DN	DN	steroid	farmacevtsko sredstvo, veterinarsko sredstvo
7	Apigenin	520-36-5	NEG	–	NEG	–	NEG	NEG	heterociklična spojina	barvilo, naravni produkt, vmesni farmacevtski produkt
8	Atrazin	1912-24-9	NEG	–	NEG	–	NEG	DN	heterociklična spojina	herbicid
9	Di-n-butyl ftalat	84-74-2	NEG	–	NEG	–	NEG	NEG	ester, ftalna kislina	kozmetična sestavina, industrijska kemikalija, mehčalo
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG	–	NEG	–	ni preskušeno	DN	heterociklična spojina, pirimidin	fungicid
11	Flavon	525-82-6	NEG	–	NEG	–	DN	DN	flavonoid, heterociklična spojina	naravni produkt, farmacevtsko sredstvo
12	Flutamid	13311-84-7	NEG	–	NEG	–	NEG	DN	amid	farmacevtsko sredstvo, veterinarsko sredstvo
13	Genistein	446-72-0	NEG	–	NEG	–	DN	NEG	flavonoid, heterociklična spojina	naravni produkt, farmacevtsko sredstvo
14	P-n-nonilfenol	104-40-5	NEG	–	NEG	–	ni preskušeno	NEG	fenol	kemijski vmesni produkt
15	Resveratrol	501-36-0	NEG	–	NEG	–	DN	NEG	ogljikovodik (ciklični)	naravni produkt

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS); M = molaren; IC<sub>50</sub> = srednja inhibicijska koncentracija preskusne snovi; NEG = negativno; DN = domnevno negativno; POZ = pozitivno; DP = domnevno pozitivno.

<sup>a</sup> Običajne snovi, preskušene s preskusoma STTA in VM7Luc ER TA, ki so bile označene kot antagonisti ER ali negativne in so bile uporabljene za oceno točnosti pri validacijski študiji VM7Luc

ER TA (2) (3).

<sup>b</sup> Najvišja koncentracija, preskušena brez omejitev zaradi citotoksičnosti ali netopnosti, je bila  $1 \times 10^{-3}$  M (preskus STTA) oziroma  $1 \times 10^{-5}$  M (preskus VM7Luc ER TA).

<sup>1</sup> Validacijsko poročilo o preskusu transkripcijske aktivacije s stabilno transfekcijo za zaznavo z ER povzročene delovanja, del B (2).

<sup>2</sup> Ocenjevalno poročilo ICCVAM o preskusni metodi LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA): metoda *in vitro* za opredelitev agonistov in antagonistov ER (3).

<sup>3</sup> Srednje vrednosti IC<sub>50</sub> so bile izračunane z vrednostmi, ki so jih sporočili laboratoriji iz validacijske študije VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM in Hiyoshi) (3).

<sup>4</sup> Delovanje ER STTA, o katerem se je sklepalo na podlagi sporočenih učinkov, poznanih iz podatkov centra CERi o preteklih preskusih receptorske vezave ER, uterotropnega preskusa in informacij, zbranih iz javno dostopnih virov (2).

<sup>5</sup> Razvrstitev med antagoniste ER ali negativne je temeljila na informacijah iz dokumenta ICCVAM o pregledu ozadja preskusov vezave ER in TA (31) ter informacijah, pridobljenih iz objav, ki so bile objavljene in pregledane po dokončanju dokumentov ICCVAM o pregledu ozadja (2) (3) (18) (31).

<sup>6</sup> Snovi so bile razvrščene v enega ali več kemijskih razredov z uporabo mednarodno priznanega standardiziranega sistema za razvrščanje, U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) (na voljo na <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

<sup>7</sup> Snovi so bile razvrščene v enega ali več razredov produktov z uporabo U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (na voljo na <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

## **ELEMENTI PRESKUSA ER TA**

### **Nujni elementi preskusa**

11. Ta preskusna metoda se uporablja za preskuse, pri katerih se uporabi stabilno transfecirani ali endogeni receptor ER $\alpha$  in stabilno transfecirani konstrukt poročevalskega gena pod nadzorom enega ali več estrogenskih odzivnih elementov; prisotni pa so lahko tudi drugi receptorji, kot je ER $\beta$ . To so nujni elementi preskusa.

### **Kontrole**

12. Opisati je treba podlago za predlagane sočasne referenčne standarde za vsakega od preskusov z agonistom in antagonistom. Sočasne kontrole (negativna, s topilom in pozitivna) se, kakor je ustrezno, uporabljajo kot kazalnik, da preskus deluje v preskusnih pogojih, in zagotavljajo podlago za primerjave med poskusi; običajno spadajo med merila za sprejemljivost posameznega poskusa (1).

### **Standardni postopki kontrole kakovosti**

13. Standardne postopke kontrole kakovosti je treba izvesti, kot je opisano za vsak preskus, za zagotovitev, da celična linija ostane stabilna skozi več pasaž, ne vsebuje mikoplazme (tj. je brez bakterijske okužbe) in ohrani sposobnost za zagotovitev pričakovanih z ER povzročenih odzivov v daljšem časovnem obdobju. Poleg tega je treba preveriti pravilno identiteto celičnih linij in prisotnost drugih onesnaževal (npr. gliv, kvasovk in virusov).

### **Dokazovanje usposobljenosti laboratorija**

14. Pred preskušanjem neznanih kemikalij s katerim od preskusov v okviru te preskusne metode mora vsak laboratorij dokazati usposobljenost za uporabo preskusa. Za dokaz usposobljenosti mora preskusiti 14 snovi za preverjanje usposobljenosti, ki so v preglednici 3 navedene za preskus z agonistom, in 10 snovi za preverjanje usposobljenosti iz preglednice 4 za preskus z antagonistom. S tem preverjanjem usposobljenosti se potrdi tudi odzivnost preskusnega sistema. Seznam snovi za preverjanje usposobljenosti je podskupina referenčnih snovi, navedenih v standardih izvajanja za preskuse ER TA (6). Te snovi so na voljo na trgu, predstavljajo razrede kemikalij, ki se pogosto povezujejo z agonističnim ali antagonističnim delovanjem na ER, imajo primeren razpon jakosti, ki se pričakuje za agoniste/antagoniste ER (tj. močne do šibke), in vključujejo negativne snovi. Preskušanje snovi za preverjanje usposobljenosti je treba ponoviti vsaj dvakrat, in sicer na različna dneva. Usposobljenost se dokaže s pravilno razvrstitvijo (pozitivna/negativna) vsake snovi za preverjanje usposobljenosti. Preverjanje usposobljenosti mora ponoviti vsak tehnik, ko se uči preskusov. Odvisno od vrste celic se lahko nekatere od teh snovi za preverjanje usposobljenosti obnašajo kot SERM ter delujejo kot agonisti in antagonisti. Kljub temu so snovi za preverjanje usposobljenosti v preglednicah 3 in 4 razvrščene glede na poznano prevladujoče delovanje, ki ga je treba uporabiti pri ocenjevanju usposobljenosti.

15. Za dokaz učinkovitosti in za namene kontrole kakovosti mora vsak laboratorij vzpostaviti zbirko podatkov o agonistih in antagonistih iz preteklih preskusov s podatki za referenčni standard (npr.  $17\beta$ -estradiol in tamoksifen), pozitivne in negativne kontrolne kemikalije in kontrolo s topilom (npr. DMSO). Za začetek je treba zbirko podatkov ustvariti iz vsaj 10 neodvisnih ponovitev z agonisti (npr.  $17\beta$ -estradiolom) in 10 neodvisnih ponovitev z antagonistami (npr. tamoksifenom). Dodati je treba rezultate iz prihodnjih analiz teh referenčnih standardov in kontrol s topili, da se zbirka podatkov poveča, s čimer se zagotavljata doslednost in učinkovitost biološkega preskusa v laboratoriju v daljšem časovnem obdobju.

**Preglednica 3: Seznam (14) snovi za preverjanje usposobljenosti za preskus z agonistom<sup>8</sup>**

Št. <sup>7</sup>	Snov	Št. CAS	Pričakovani odziv <sup>1</sup>	Preskus STTA			Preskus VM7Luc ER TA		Kemijski razred po MeSH <sup>5</sup>	Skupina proizvodov <sup>6</sup>
				Vrednost PC <sub>10</sub> (M) <sup>2</sup>	Vrednost PC <sub>50</sub> (M) <sup>2</sup>	Preskusno območje koncentracije (M)	Vrednost VM7Luc EC <sub>50</sub> (M) <sup>3</sup>	Najvišja koncentracija za določanje območja (M) <sup>4</sup>		
14	Dietilstilbestrol	56-53-1	POZ	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,04 \times 10^{-11}$	od $10^{-14}$ do $10^{-8}$	$3,34 \times 10^{-11}$	$3,73 \times 10^{-4}$	ogljikovodik (ciklični)	farmacevtsko sredstvo, veterinarsko sredstvo
12	17 $\alpha$ -estradiol	57-91-0	POZ	$4,27 \times 10^{-11}$	$6,44 \times 10^{-10}$	od $10^{-11}$ do $10^{-5}$	$1,40 \times 10^{-9}$	$3,67 \times 10^{-3}$	steroid	farmacevtsko sredstvo, veterinarsko sredstvo
15	Mezo-heksestrol	84-16-2	POZ	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	od $10^{-11}$ do $10^{-5}$	$1,65 \times 10^{-11}$	$3,70 \times 10^{-3}$	ogljikovodik (ciklični), fenol	farmacevtsko sredstvo, veterinarsko sredstvo
11	4-terc-oktilfenol	140-66-9	POZ	$1,85 \times 10^{-9}$	$7,37 \times 10^{-8}$	od $10^{-11}$ do $10^{-5}$	$3,19 \times 10^{-8}$	$4,85 \times 10^{-3}$	fenol	kemijski vmesni produkt
9	Genistein	446-72-0	POZ	$2,24 \times 10^{-9}$	$2,45 \times 10^{-8}$	od $10^{-11}$ do $10^{-5}$	$2,71 \times 10^{-7}$	$3,70 \times 10^{-4}$	flavonoid, heterociklična spojina	naravni produkt, farmacevtsko sredstvo
6	Bisfenol A	80-05-7	POZ	$2,02 \times 10^{-8}$	$2,94 \times 10^{-7}$	od $10^{-11}$ do $10^{-5}$	$5,33 \times 10^{-7}$	$4,38 \times 10^{-3}$	fenol	kemijski vmesni produkt
2	Kemferol	520-18-3	POZ	$1,36 \times 10^{-7}$	$1,21 \times 10^{-6}$	od $10^{-11}$ do $10^{-5}$	$3,99 \times 10^{-6}$	$3,49 \times 10^{-3}$	flavonoid, heterociklična spojina	naravni produkt
3	Butilbenzil ftalat	85-68-7	POZ	$1,14 \times 10^{-6}$	$4,11 \times 10^{-6}$	od $10^{-11}$ do $10^{-5}$	$1,98 \times 10^{-6}$	$3,20 \times 10^{-4}$	karboksilna kislina, ester, ftalna kislina	mehčalo, industrijska kemikalija
4	<i>P,p'</i> -metoksiklor	72-43-5	POZ	$1,23 \times 10^{-6}$	–	od $10^{-11}$ do $10^{-5}$	$1,92 \times 10^{-6}$	$2,89 \times 10^{-3}$	ogljikovodik (halogenirani)	pesticid, veterinarsko sredstvo
1	Etil paraben	120-47-8	POZ	$5,00 \times 10^{-6}$	–	od $10^{-11}$ do $10^{-5}$	$2,48 \times 10^{-5}$	$6,02 \times 10^{-3}$	karboksilna kislina, fenol	farmacevtsko sredstvo, konzervans
17	Atrazin	1912-24-9	NEG	–	–	od $10^{-10}$ do $10^{-4}$	–	$4,64 \times 10^{-4}$	heterociklična spojina	herbicid
20	Spirolakton	52-01-7	NEG	–	–	od $10^{-11}$ do $10^{-5}$	–	$2,40 \times 10^{-3}$	lakton, steroid	farmacevtsko sredstvo
21	Ketokonazol	65277-42-1	NEG	–	–	od $10^{-11}$ do $10^{-5}$	–	$9,41 \times 10^{-5}$	heterociklična spojina	farmacevtsko sredstvo
22	Reserpin	50-55-5	NEG	–	–	od $10^{-11}$ do $10^{-5}$	–	$1,64 \times 10^{-3}$	heterociklična spojina, indol	farmacevtsko sredstvo, veterinarsko sredstvo

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS); EC<sub>50</sub> = srednja efektivna koncentracija preskusne snovi; NEG = negativno; POZ = pozitivno; PC<sub>10</sub> (in PC<sub>50</sub>) = koncentracija preskusne snovi, pri kateri odziv znaša 10 % (ali 50 % za PC<sub>50</sub>) odziva, ki ga na posamezni plošči povzroči pozitivni kontrolni vzorec (E2, 1 nM).

- <sup>1</sup> Razvrstitev med pozitivne ali negativne zaradi delovanja agonista ER je temeljila na dokumentu ICCVAM o pregledu ozadja preskusov vezave ER in TA (31) ter na empiričnih podatkih in drugih informacijah, pridobljenih iz referenčnih študij, ki so bile objavljene in pregledane po dokončanju dokumentov ICCVAM o pregledu ozadja (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).
- <sup>2</sup> Vrednosti iz osnutka poročila o predhodni validaciji in medlaboratorijski validaciji preskusa transkripcijske aktivacije (TA) s stabilno transfekcijo za zaznavo estrogenskega delovanja – preskus z reporterskim genom, povzročenim s človeškim estrogenskim receptorjem alfa, z uporabo celične linije hER-HeLa-9903 (30).
- <sup>3</sup> Srednje vrednosti EC50 so bile izračunane z vrednostmi, ki so jih sporočili laboratoriji iz validacijske študije VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM in Hiyoshi) (3).
- <sup>4</sup> Sporočene koncentracije so bile najvišje preskušene koncentracije (določanje območja) med validacijo preskusa VM7Luc ER TA. Če so se koncentracije med laboratoriji razlikovale, je sporočena najvišja koncentracija. Glej preglednico 4-10 iz ocenjevalnega poročila ICCVAM o preskusni metodi; preskusna metoda LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA): preskus *in vitro* za opredelitev agonističnega in antagonističnega delovanja kemikalij na človeške estrogenske receptorje (3).
- <sup>5</sup> Snovi so bile razvrščene v enega ali več kemijskih razredov z uporabo mednarodno priznanega standardiziranega sistema za razvrščanje, U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) (na voljo na <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).
- <sup>6</sup> Snovi so bile razvrščene v enega ali več razredov produktov z uporabo U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (na voljo na <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).
- <sup>7</sup> Iz preglednice 1 (seznam referenčnih kemikalij (22) za oceno točnosti agonista ER) standardov izvajanja (6).
- <sup>8</sup> Če snov za preverjanje usposobljenosti ni več na voljo na trgu, se lahko uporabi snov z enako razvrstitvijo ter primerljivo jakostjo, načinom delovanja in kemijskim razredom.

**Preglednica 4:** Seznam (10) snovi za preverjanje usposobljenosti za preskus z antagonistom

	Snov <sup>a</sup>	Št. CAS	Preskus ER STTA <sup>1</sup>			Preskus VM7Luc ER TA <sup>2</sup>			Učinki kandidatne snovi za ER STTA <sup>1</sup>	Dogovorjena razvrstitev ICCVAM <sup>5</sup>	Kemijski razred MeSH <sup>6</sup>	Skupina proizvodov <sup>7</sup>
			Delovanje ER TA	IC <sub>50</sub> (M)	Preskusno območje koncentracije (M)	Delovanje ER TA	IC <sub>50</sub> <sup>3</sup> (M)	Najvišja koncentracija za določanje območja (M) <sup>4</sup>				
1	4-hidroksitamoksifen	68047-06-3	POZ	$3,97 \times 10^{-9}$	od $10^{-12}$ do $10^{-7}$	POZ	$2,08 \times 10^{-7}$	$2,58 \times 10^{-4}$	zmerno POZ	POZ	ogljikovodik (ciklični)	farmacevtsko sredstvo
2	Raloksifen HCl	82640-04-8	POZ	$7,86 \times 10^{-10}$	od $10^{-12}$ do $10^{-7}$	POZ	$1,19 \times 10^{-9}$	$1,96 \times 10^{-4}$	zmerno POZ	POZ	ogljikovodik (ciklični)	farmacevtsko sredstvo
3	Tamoksifen	10540-29-1	POZ	$4,91 \times 10^{-7}$	od $10^{-10}$ do $10^{-5}$	POZ	$8,17 \times 10^{-7}$	$2,69 \times 10^{-4}$	POZ	POZ	ogljikovodik (ciklični)	farmacevtsko sredstvo
4	17β-estradiol	50-28-2	NEG	–	od $10^{-9}$ do $10^{-4}$	NEG	–	$3,67 \times 10^{-3}$	predvidoma negativna*	DN	steroid	farmacevtsko sredstvo, veterinarsko sredstvo
5	Apigenin	520-36-5	NEG	–	od $10^{-9}$ do $10^{-4}$	NEG	–	$3,70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	heterociklična spojina	barvilo, naravni produkt, vmesni farmacevtski produkt
6	Di-n-butil ftalat	84-74-2	NEG	–	od $10^{-8}$ do $10^{-3}$	NEG	–	$3,59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	ester, ftalna kislina	kozmetična sestavina, industrijska kemikalija, mehčalo
7	Flavon	525-82-6	NEG	–	od $10^{-8}$ do $10^{-3}$	NEG	–	$4,50 \times 10^{-4}$	predvidoma negativna*	DN	flavonoid, heterociklična spojina	naravni produkt, farmacevtsko sredstvo
8	Genistein	446-72-0	NEG	–	od $10^{-9}$ do $10^{-4}$	NEG	–	$3,70 \times 10^{-4}$	predvidoma negativna*	NEG	flavonoid, heterociklična spojina	naravni produkt, farmacevtsko sredstvo
9	P-n-nonilfenol	104-40-5	NEG	–	od $10^{-9}$ do $10^{-4}$	NEG	–	$4,54 \times 10^{-4}$	ni preskušeno	NEG	fenol	kemijski vmesni produkt
10	Resveratrol	501-36-0	NEG	–	od $10^{-8}$ do $10^{-3}$	NEG	–	$4,38 \times 10^{-4}$	predvidoma negativna*	NEG	ogljikovodik (ciklični)	naravni produkt

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS); M = molaren; IC<sub>50</sub> = srednja inhibicijska koncentracija preskusne snovi; NEG = negativno; DN = domnevno negativno; POZ = pozitivno.

\* Razvrščena kot negativna glede na pregled virov (2).

<sup>a</sup> Običajne snovi, preskušene s preskusoma STTA in VM7Luc ER TA, ki so bile označene kot antagonisti ER ali negativne in so bile uporabljene za oceno točnosti pri validacijski študiji VM7Luc ER TA (2) (3).

<sup>1</sup> Validacijsko poročilo o preskusu transkripcijske aktivacije s stabilno transfekcijo za zaznavo z ER povzročene delovanja, del B (2).

<sup>2</sup> Ocenjevalno poročilo ICCVAM o preskusni metodi LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA): metoda *in vitro* za opredelitev agonistov in antagonistov ER (3).

<sup>3</sup> Srednje vrednosti IC<sub>50</sub> so bile izračunane z vrednostmi, ki so jih sporočili laboratoriji iz validacijske študije VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM in Hiyoshi) (3).

<sup>4</sup> Sporočene koncentracije so bile najvišje preskušene koncentracije (določanje območja) med validacijo preskusa VM7Luc ER TA. Če so se koncentracije med laboratoriji razlikovale, je sporočena najvišja koncentracija. Glej preglednico 4-11 iz ocenjevalnega poročila ICCVAM o preskusni metodi; preskusna metoda LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA): preskus *in vitro* za opredelitev agonističnega in antagonističnega delovanja kemikalij na človeške estrogenske receptorje (3).

<sup>5</sup> Razvrstitev med antagoniste ER ali negativne je temeljila na informacijah iz dokumenta ICCVAM o pregledu ozadja preskusnih metod vezave ER in TA (31) ter informacijah, pridobljenih iz objav, ki so bile objavljene in pregledane po dokončanju dokumentov ICCVAM o pregledu ozadja (2) (3) (18) (31).

<sup>6</sup> Snovi so bile razvrščene v enega ali več kemijskih razredov z uporabo mednarodno priznanega standardiziranega sistema za razvrščanje, U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) (na voljo na <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

<sup>7</sup> Snovi so bile razvrščene v enega ali več razredov produktov z uporabo U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (na voljo na <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

## **Merila za sprejemljivost ponovitve preskusa**

16. Sprejetje ali zavrnitev ponovitve preskusa temelji na oceni rezultatov, dobljenih za referenčne standarde in kontrole, uporabljene za posamezni poskus. Vrednosti  $PC_{50}$  ( $EC_{50}$ ) ali  $IC_{50}$  za referenčne standarde morajo izpolnjevati merila za sprejemljivost, kot so določena za izbrani preskus (za STTA glej Dodatek 2, za VM7Luc ER TA pa Dodatek 3), vse pozitivne/negativne kontrole pa je treba pravilno razvrstiti za vsak sprejeti poskus. Sposobnost dosledne izvedbe preskusa je treba dokazati z oblikovanjem in vzdrževanjem zbirke podatkov iz preteklih preskusov za referenčne standarde in kontrole (glej odstavek 15). Standardni odkloni ali koeficienti variacije (KV) za srednje vrednosti parametrov prileganja krivulj referenčnih standardov iz več poskusov se lahko uporabijo kot merilo za obnovljivost znotraj laboratorija. Poleg tega je treba upoštevati naslednja načela v zvezi z merili za sprejemljivost:

- podatki morajo zadostovati za kvantitativno oceno aktivacije ER (za preskus z agonistom) ali zaviranje ER (za preskus z antagonistom) (tj. učinkovitost in jakost);
- srednja vrednost dejavnosti reporterskega gena za referenčno koncentracijo referenčnega estrogena mora biti vsaj enaka najnižji vrednosti, določeni pri preskusih, glede na dejavnost kontrole z vehiklom (topilom), da se zagotovi ustrezna občutljivost. Za preskuse STTA in VM7Luc ER TA to pomeni štirikratnik srednje vrednosti kontrole z vehiklom na posamezni plošči;
- preskušene koncentracije morajo ostati znotraj območja topnosti preskusnih kemikalij in ne smejo biti citotoksične.

## **Analiza podatkov**

17. Za razvrščanje pozitivnega in negativnega odziva je treba za vsak preskus uporabiti opredeljeni postopek za razlago podatkov.

18. Izpolnjevanje meril za sprejemljivost (odstavek 16) pokaže, da preskus deluje pravilno, vendar ne zagotavlja, da bodo pri vsaki posamezni ponovitvi preskusa dobljeni točni podatki. Najboljši znak, da so bili dobljeni točni podatki, je ponovitev rezultatov prve ponovitve. Če se z dvema ponovitvama dobijo ponovljivi rezultati (npr. rezultati obeh ponovitev preskusa kažejo, da je preskusna kemikalija pozitivna), tretje ponovitve ni treba izvesti.

19. Če se z dvema ponovitvama ne dobijo ponovljivi rezultati (npr. preskusna kemikalija je pri eni ponovitvi pozitivna, pri drugi pa negativna) ali če se zahteva višja stopnja gotovosti glede rezultata tega preskusa, je treba izvesti vsaj tri neodvisne ponovitve. V takem primeru razvrstitev temelji na dveh ujemajočih se rezultatih od treh.

## **Splošna merila za razlago rezultatov**

20. Trenutno ni splošno sprejete metode za razlago podatkov ER TA. Kljub temu morata kvalitativna (npr. pozitivno/negativno) in/ali kvantitativna (npr. EC<sub>50</sub>, PC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub>) ocena z ER povzročene delovanja temeljiti na empiričnih podatkih in razumni znanstveni presoji. Če je mogoče, morata biti za pozitivne rezultate značilni tako velikost učinka v primerjavi s kontrolo z vehiklom (topilom) ali referenčnim estrogenom kot tudi koncentracija, pri kateri se učinek pojavi (npr. EC<sub>50</sub>, PC<sub>50</sub>, RPC<sub>Max</sub>, IC<sub>50</sub> itd.).

### **Poročilo o preskusu**

21. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

#### *Preskus:*

- uporabljeni preskus;
- kontrola/referenčni standard/preskusna kemikalija;
- vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;
- stabilnost preskusne kemikalije, če je znana;
- topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu, če sta znani;
- meritve vrednosti pH, osmolarnosti in oborine v gojišču, ki mu je bila dodana preskusna kemikalija, če je ustrezno.

#### *Snov iz ene sestavine:*

- fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;
- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

#### *Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:*

- čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

#### *Topilo/vehikel:*

- opredelitev lastnosti (narava, dobavitelj in serija);
- utemeljitev izbire topila/vehikla;
- topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu/vehiklu, če je znana.

#### *Celice:*

- vrsta in izvor celic:

- ali je ER endogeno izražen; če ni, kateri receptorji so bili transfecirani;
  - uporabljeni poročevalski konstrukti (vključno z izvornimi vrstami);
  - transfekcijska metoda;
  - izbirna metoda za vzdrževanje stabilne transfekcije (če je ustrezno);
  - ali je transfekcijska metoda pomembna za stabilne linije;
- število pasaž celic (od odtajanja);
  - številka pasaže celic ob odtajanju;
  - metode vzdrževanja celičnih kultur.

*Preskusni pogoji:*

- omejitve topnosti;
- opis uporabljenih metod za ocenjevanje viabilnosti;
- sestava gojišč, koncentracija CO<sub>2</sub>;
- koncentracije preskusne kemikalije;
- količina dodanega vehikla in preskusne kemikalije;
- inkubacijska temperatura in vlažnost;
- trajanje tretiranja;
- gostota celic ob začetku tretiranja in med njim;
- pozitivni in negativni referenčni standardi;
- poročevalski reagenti (ime izdelka, dobavitelj in serija);
- merila za obravnavanje preskusnih ponovitev kot pozitivnih, negativnih ali dvoumnih.

*Preverjanje sprejemljivosti:*

- razmerje indukcij za vsako preskusno ploščo in ali ustrezajo minimumu, zahtevanemu s preskusom, na podlagi kontrol iz preteklih preskusov;
- dejanske vrednosti za merila za sprejemljivost, npr. log<sub>10</sub>EC<sub>50</sub>, log<sub>10</sub>PC<sub>50</sub>, logIC<sub>50</sub> in vrednosti Hillovega naklona, za sočasne pozitivne kontrole/referenčne standarde.

*Rezultati:*

- neobdelani in normalizirani podatki;
- najvišja raven indukcije;
- podatki o citotoksičnosti:

- najnižja efektivna koncentracija, če obstaja;
- vrednosti  $RPC_{Max}$ ,  $PC_{Max}$ ,  $PC_{50}$ ,  $IC_{50}$  in/ali  $EC_{50}$ , kot je ustrezno;
- razmerje med koncentracijo in odzivom, kadar je mogoče;
- statistične analize, če obstajajo, skupaj z meritvijo napake in zaupanja (npr. SEM, SD, CV ali 95 % CI) in opisom, kako so bile te vrednosti dobljene.

*Razprava o rezultatih*

*Sklepna ugotovitev*

## VIRI

- (1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 34), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (2) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 225), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.
- (4) Pujol, P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, *Cancer. Res.*, 58(23): str. 5367–73.
- (5) Rogers, J. M., in Denison, M. S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research*, 13(1): str. 67–82.
- (6) OECD (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 173), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (7) OECD (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 174), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (8) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 150), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (9) Cavailles, V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. *Climacteric*, 5 Suppl 2: str. 20–6.

- (10) Welboren, W. J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? *Endocr. Relat. Cancer*, 16(4): str. 1073-89.
- (11) Younes, M., in Honma, N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): str. 63–6.
- (12) Jefferson, W. N., *et al.* (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, *Journal of Chromatography B*, 777(1-2): str. 179-189.
- (13) Sonneveld, E., *et al.* (2006). Comparison of *In Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol. Sci.*, 89(1): str. 173-187.
- (14) Takeyoshi, M., *et al.* (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, *Toxicology Letters*, 126(2): str. 91–98.
- (15) Combes, R. D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, 28(1): str. 81-118.
- (16) Escande, A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71(10): str. 1459-69.
- (17) Gray, L. E., Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol. Lett.*, 102–103, 677–680.
- (18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.
- (19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- (20) Gustafsson, J. Ö. (1999). Estrogen Receptor  $\beta$  – A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, *Journal of Endocrinology*, 163(3): str. 379-383.
- (21) Ogawa, S., *et al.* (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor  $\beta$  (hER $\beta$ ) and its Heterodimerization with ER $\alpha$  *In Vivo* and *In Vitro*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 243(1): str. 122-126.

- (22) Enmark, E., *et al.* (1997). Human Estrogen Receptor  $\beta$ -Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(12): str. 4258-4265.
- (23) Ball, L. J., *et al.* (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 299(2): str. 204-211.
- (24) Barkhem, T., *et al.* (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, *Mol. Pharmacol*, 54(1): str. 105-12.
- (25) Deroo, B. J., in Buensuceso, A. V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor- $\beta$ : Mechanistic Insights from Recent Studies, *Molecular Endocrinology*, 24(9): str. 1703-1714.
- (26) Harris, D. M., *et al.* (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, *Experimental Biology and Medicine*, 230(8): str. 558-568.
- (27) Anderson, J. N., Clark, J. H., in Peck, E. J., Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 48(6): str. 1460-1468.
- (28) Toft, D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, *Journal of Steroid Biochemistry*, 3(3): str. 515-522.
- (29) Gorski, J., *et al.* (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, *Recent Progress in Hormone Research*, 24: str. 45-80.
- (30) Jensen, E. V., *et al.* (1967). Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale*, 56(3): str. 547-569.
- (31) ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (št. 03-4505).
- (32) Kanno, J., *et al.* (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, *Environ. Health Persp.*, 109:785-94.
- (33) Kanno, J., *et al.* (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose -Response Studies, *Environ. Health Persp.*, 111:1530-1549.

- (34) Kanno, J., *et al.* (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, *Environ. Health Persp.*, 111:1550-1558.
- (35) Geisinger, *et al.* (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, *Cancer* 63, 280–288.
- (36) Baldwin, *et al.* (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, 34, 649–654.
- (37) Li, Y., *et al.* (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, *Mol. Endo.* 28, 2072–2081.
- (38) Rogers, J. M., in Denison, M. S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro & Molec. Toxicol.* 13, 67–82.

## Dodatek 1

### OPREDELITVE POJMOV IN OKRAJŠAVE

**Merila za sprejemljivost:** minimalni standardi za učinkovitost poskusnih kontrol in referenčnih standardov. Da se poskus šteje za veljaven, morajo biti izpolnjena vsa merila za sprejemljivost.

**Točnost (skladnost):** stopnja ujemanja rezultatov preskusa s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusa in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz ‚skladnost‘ se pogosto izmenično uporabljata in pomenita delež ustreznih rezultatov preskusa (1).

**Agonist:** snov, ki ob vezavi na določen receptor povzroči odziv, npr. transkripcijo.

**Antagonist:** vrsta receptorskega liganda ali kemikalije, ki sama ob vezavi na receptor ne povzroči biološkega odziva, temveč blokira ali zmanjša z agonistom povzročene odzive.

**Antiestrogensko delovanje:** zmožnost kemikalije, da zavira z estrogenskimi receptorji povzročeno delovanje  $17\beta$ -estradiola.

**Celična morfologija:** oblika in videz celic, ki rastejo v monosloju v eni sami jamici plošče s tkivno kulturo. Celice, ki odmirajo, imajo pogosto nenormalno celično morfologijo.

**TO:** temeljni okvir OECD za preskušanje in ocenjevanje endokrinih motilcev.

**Tretiranje z ogljem/dekstranom:** tretiranje seruma, uporabljenega v celični kulturi. Pri tretiranju z ogljem/dekstranom (ki se pogosto imenuje ‚odstranjevanje‘) se odstranijo endogeni hormoni in proteini, ki se vežejo na hormone.

**Kemikalija:** snov ali zmes.

**Citotoksičnost:** škodljivi učinki na celično strukturo ali funkcijo, ki lahko nazadnje povzročijo celično smrt, pokažejo pa se lahko z zmanjšanjem števila celic v jamici ob koncu obdobja izpostavljenosti ali z zmanjšanjem sposobnosti za merjenje celične funkcije v primerjavi s sočasno kontrolo z vehiklom.

**KV:** koeficient variacije.

**DCC-FBS:** fetusni serum goveda, tretiran z ogljem, prevlečenim z dekstranom (dextran-coated charcoal treated fetal bovine serum).

**DMEM:** Dulbeccovo modificirano Eagleovo gojišče.

**DMSO:** dimetil sulfoksid.

**E2:**  $17\beta$ -estradiol

**EC<sub>50</sub>**: srednja efektivna koncentracija preskusne kemikalije.

**ED**: endokrina motnja.

**hER $\alpha$** : človeški estrogenski receptor alfa.

**hER $\beta$** : človeški estrogenski receptor beta.

**EFM**: gojišče, ki ne vsebuje estrogena. Dulbeccovo modificirano Eagleovo gojišče (DMEM), ki so mu dodani 4,5-odstotni FBS, tretiran z ogljem/dekstranom, 1,9-odstotni L-glutamin in 0,9-odstotna raztopina Pen-Strep.

**ER**: estrogenski receptor.

**ERE**: odzivni element za estrogen.

**Estrogenska aktivnost**: zmožnost kemikalije, da posnema 17 $\beta$ -estradiol pri njegovi sposobnosti vezave na estrogenske receptorje in njihovo aktiviranje. S to preskusno metodo je mogoče zaznati s hER $\alpha$  povzročeno estrogensko aktivnost.

**ERTA**: transaktivacija estrogenskih receptorjev.

**FBS**: fetusni serum goveda.

**HeLa**: nesmrtna človeška celična linija materničnega vratu.

**HeLa9903**: subklon celice HeLa, v katerega sta bila stabilno transfecirana hER $\alpha$  in luciferazni poročevalski gen.

**IC<sub>50</sub>**: srednja efektivna koncentracija inhibitorne preskusne kemikalije.

**ICCVAM**: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (medagencijski koordinacijski odbor ZDA za validacijo alternativnih metod).

**Obnovljivost med laboratoriji**: merilo, v kakšnem obsegu lahko različni usposobljeni laboratoriji z uporabo istega protokola in preskušanjem istih snovi dobijo kvalitativno in kvantitativno podobne rezultate. Obnovljivost med laboratoriji se ugotovi med postopki pred validacijo in med njo ter kaže, v kakšnem obsegu se lahko preskus uspešno uporablja v več laboratorijih; imenuje se tudi obnovljivost v različnih laboratorijih (1).

**Obnovljivost v laboratoriju**: določitev, v kakšnem obsegu lahko usposobljene osebe v istem laboratoriju uspešno ponovijo rezultate z uporabo določenega protokola ob različnih časih. Imenuje se tudi obnovljivost znotraj laboratorija (1).

**LEC**: (Lowest Effective Concentration) je najnižja koncentracija preskusne kemikalije, ki povzroči odziv (tj. najnižja koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri se razmerje indukcije statistično razlikuje od sočasne kontrole z vehiklom).

**Podoben preskus:** pogovorni izraz za preskus, ki je strukturno in funkcionalno podoben validirani in sprejeti referenčni preskusni metodi. Uporablja se kot sopomenka za podobno preskusno metodo.

**MT:** metalotionein.

**MMTV:** virus tumorja mlečne žleze pri miših.

**OHT:** 4-hidroksitamoksifen.

**PBTG:** smernica za preskušanje na podlagi učinkovitosti.

**PC** (pozitivna kontrola): močno aktivna snov, po možnosti 17 $\beta$ -estradiol, ki je vključena v vse preskuse, da pomaga zagotoviti pravilno delovanje preskusa.

**PC<sub>10</sub>:** koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri je izmerjena aktivnost pri preskusu z agonistom enaka 10 % največje aktivnosti, povzročene s pozitivno kontrolo (E2 pri 1nM za preskus STTA) na posamezni plošči.

**PC<sub>50</sub>:** koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri je izmerjena aktivnost pri preskusu z agonistom enaka 50 % največje aktivnosti, povzročene s pozitivno kontrolo (E2 pri referenčni koncentraciji, določeni pri preskusni metodi) na posamezni plošči.

**PC<sub>Max</sub>:** koncentracija preskusne kemikalije, ki povzroči RPC<sub>Max</sub>.

**Standardi izvajanja:** standardi, ki temeljijo na validiranem preskusu in so podlaga za oceno primerljivosti predlaganega preskusa, ki je funkcijsko in mehanistično podoben. Vključujejo: (1) nujne elemente preskusa; (2) najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij, izbranih iz skupine kemikalij, ki se uporabljajo za dokazovanje sprejemljivega izvajanja validirane preskusne metode, ter (3) primerljive stopnje točnosti in zanesljivosti, ki temeljijo na rezultatih validirane preskusne metode, kar mora dokazati predlagani preskus pri ocenjevanju ob uporabi najkrajšega možnega seznama referenčnih kemikalij (1).

**Snovi za preverjanje usposobljenosti:** podskupina referenčnih snovi, vključenih v standarde izvajanja, ki jih lahko laboratoriji uporabijo za dokazovanje tehnične usposobljenosti s standardizirano preskusno metodo. Merila za izbor teh snovi običajno vključujejo naslednje: da predstavljajo celoten razpon odzivov, da so na voljo na trgu in da so zanje na voljo visokokakovostni referenčni podatki.

**Usposobljenost:** dokazana sposobnost za pravilno izvedbo preskusa pred preskušanjem neznanih snovi.

**Referenčni estrogen (pozitivna kontrola, PC):** 17 $\beta$ -estradiol (E2, št. CAS 50-28-2).

**Referenčni standard:** referenčna snov, s katero se dokaže ustreznost preskusa. Za preskuse STTA in VM7Luc ER TA je referenčni standard 17 $\beta$ -estradiol.

**Referenčne preskusne metode:** preskusi, na katerih temelji PBTG 455.

**Ustreznost:** opis razmerja med preskusom in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni, v kakšnem obsegu se s preskusom pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Pri ustreznosti se upošteva tudi točnost (skladnost) preskusa (1).

**Zanesljivost:** stopnja obnovljivosti preskusa v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih.

**RLU:** relativne svetlobne enote.

**RNK:** ribonukleinska kislina.

**RPC<sub>Max</sub>:** najvišja raven odziva, ki ga povzroči preskusna kemikalija, izražena kot delež odziva, ki ga povzroči 1 nM E2 na isti plošči.

**RPMI:** gojišče RPMI 1640 z dodanima 0,9-odstotno raztopino Pen-Strep in 8,0-odstotnim fetusnim serumom goveda (FBS).

**Ponovitev:** posamezen poskus, s katerim se oceni kemijsko delovanje na biološki rezultat preskusa. Vsaka ponovitev je popoln poskus, opravljen na jamicah s ponovljenimi vzorci celic, hkrati nasajenih iz skupne zaloge celic.

**Neodvisna ponovitev:** ločen, neodvisen poskus, s katerim se oceni kemijsko delovanje na biološki rezultat preskusa, pri katerem se uporabijo celice iz druge zaloge in sveže razredčene kemikalije, ter ki je izveden na različne dneve ali pa ga na isti dan izvedejo različni člani osebja.

**SO:** standardni odklon.

**Občutljivost:** delež vseh pozitivnih/aktivnih snovi, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskus, s katerim se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusa (1).

**Specifičnost:** delež vseh negativnih/neaktivnih snovi, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskus, s katerim se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusa (1).

**Stabilna transfekcija:** ko se DNK transfecira v gojene celice tako, da se stabilno integrira v genom celic, kar povzroči stabilno izražanje transfeciranih genov. Kloni stabilno transfeciranih celic se izberejo s stabilnimi označevalci (npr. odpornost proti G418).

**Preskus STTA:** preskus transaktivacije s stabilno transfekcijo (Stably Transfected Transactivation Assay), preskus transkripcijske aktivacije ER $\alpha$  z uporabo celične linije HeLa 9903.

**Študija:** vse vrste eksperimentalnega dela, namenjene oceni ene specifične snovi z uporabo specifičnega preskusa. Študija zajema vse korake, vključno s preskusi redčenja preskusne snovi

v preskusnem mediju, predhodnimi ponovitvami za določanje območja, vsemi potrebnimi celovitimi ponovitvami, podatkovnimi analizami, zagotavljanjem kakovosti, ocenami citotoksičnosti itd. Dokončanje študije omogoča razvrstitev aktivnosti preskusne kemikalije na tarči toksičnosti (tj. aktivna, neaktivna ali neopredeljiva), ki se ocenjuje z uporabljenim preskusom, in oceno jakosti glede na pozitivno referenčno kemikalijo.

**Snov:** v skladu z uredbo REACH<sup>12</sup> je snov opredeljena kot kemijski element in njegove spojine v naravnem stanju ali pridobljene s kakršnim koli proizvodnim procesom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev njene obstojnosti, in vsemi nečistotami, ki nastanejo pri uporabljenem procesu, ne vključuje pa topil, ki se lahko izločijo, ne da bi to vplivalo na obstojnost snovi ali spremenilo njeno sestavo. Zelo podobna opredelitev se uporablja v okviru GHS ZN (1).

**TA (transaktivacija):** začetek sinteze mRNK v odziv na določen kemični signal, kot je vezava estrogena na estrogenski receptor.

**Preskus:** v okviru te preskusne metode je preskus ena od metodologij, ki so sprejete kot metodologije, ki veljavno izpolnjujejo načrtana merila za učinkovitost. Med elementi preskusa so na primer specifična celična linija s povezanimi ravnimi pogoji, specifični medij, v katerem poteka preskus, pogoji priprave plošče, razporeditev in razredčine preskusnih kemikalij skupaj z morebitnimi drugimi potrebnimi ukrepi za kontrolo kakovosti ter s tem povezanimi koraki za oceno podatkov.

**Preskusna kemikalija:** vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

**Transkripcija:** sinteza mRNK.

**UVCB:** snovi z neznanom ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti in biološki materiali.

**Validirana preskusna metoda:** preskus, za katerega sta bili na podlagi končanih validacijskih študij določeni ustreznost (vključno s točnostjo) in zanesljivost za določen namen. Opozoriti je treba, da točnost in zanesljivost validirane preskusne metode nista nujno zadostni, da bi bila sprejemljiva za predlagani namen (1).

**Validacija:** postopek, s katerim se določita zanesljivost in ustreznost posameznega pristopa, metode, preskusa, postopka ali ocene za opredeljen namen (1).

---

<sup>12</sup> Uredba (ES) št. 1907/2006 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 18. decembra 2006 o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH) ter o ustanovitvi Evropske agencije za kemikalije in o spremembi Direktive 1999/45/ES ter o razveljavitvi Uredbe Sveta (EGS) št. 793/93 in Uredbe Komisije (ES) št. 1488/94 ter Direktive Sveta 76/769/EGS in direktiv Komisije 91/155/EGS, 93/67/EGS, 93/105/ES in 2000/21/ES (UL L 304, 22.11.2007, str. 1).

**Kontrola z vehiklom:** topilo, ki se uporabi za raztopitev preskusne in kontrolne kemikalije, se preskusi izključno kot vehikel brez raztopljene kemikalije.

**VM7:** nesmrtna celica adenokarcinoma, ki endogeno izraža estrogenski receptor.

**VM7Luc4E2:** celična linija VM7Luc4E2 je bila pridobljena iz nesmrtnih človeških celic adenokarcinoma VM7, ki endogeno izražajo obe obliki estrogenskih receptorjev ( $ER\alpha$  in  $ER\beta$ ) in so bile stabilno transfecirane s plazmidom pGudLuc7.ERE. Ta plazmid vsebuje štiri kopije sintetičnega oligonukleotida, ki vsebuje odzivni element za estrogen nad promotorjem virusa tumorja mlečne žleze pri miši (MMTV) in kresničkin luciferazni gen.

**Šibka pozitivna kontrola:** šibko aktivna snov, izbrana s seznama referenčnih kemikalij, ki je vključena v vse preskuse, da pomaga zagotoviti pravilno delovanje preskusa.

## Dodatek 2

### **PRESKUS TRANSKTIKACIJE ČLOVEŠKEGA ESTROGENSKEGA RECEPTORJA-A S STABILNO TRANSFEKCIJO ZA ZAZNAVO ESTROGENSKEGA AGONISTIČNEGA IN ANTAGONISTIČNEGA DELOVANJA KEMIKALIJ Z UPORABO CELIČNE LINIJE HERA-HELA-9903**

#### **ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)**

1. Pri tem preskusu transaktivacije (TA) se celična linija hER $\alpha$ -HeLa-9903 uporablja za zaznavo estrogenskega agonističnega delovanja, povzročena s človeškim estrogenskim receptorjem alfa (hER $\alpha$ ). Validacijska študija preskusa transaktivacije s stabilno transfekcijo (STTA), ki jo je japonski inštitut za ocenjevanje in raziskovanje kemikalij (CERI) izvedel z uporabo celične linije hER $\alpha$ -HeLa-9903 za zaznavo estrogenskega agonističnega in antagonističnega delovanja, povzročena s človeškim estrogenskim receptorjem alfa (hER $\alpha$ ), je pokazala ustreznost in zanesljivost preskusa za predvideni namen (1).
2. Ta preskus je izrecno namenjen zaznavi s hER $\alpha$  povzročene TA z merjenjem kemiluminiscence kot končne točke. Zaradi prevelike aktivacije luciferaznega poročevalskega gena se je o nereceptorsko povzročeni luminiscenčni signalih sicer poročalo pri koncentracijah fitoestrogena, višjih od 1  $\mu$ M (2) (3). Čeprav krivulja odziva na odmerek kaže, da do dejanske aktivacije sistema ER pride pri nižjih koncentracijah, je treba izražanje luciferaze, dobljeno pri visokih koncentracijah fitoestrogenov ali podobnih spojin, ki domnevno povzročajo fitoestrogenu podobno preveliko aktivacijo luciferaznega poročevalskega gena, pazljivo preučiti v sistemih preskusa ER TA s stabilno transfekcijo (Dodatek 1).
3. Pred uporabo tega preskusa za regulativne namene je treba prebrati oddelka ‚SPLOŠNI UVOD‘ in ‚ELEMENTI PRESKUSA ER TA‘. Opredelitve pojmov in kratice, uporabljene v tej smernici za preskušanje, so opisane v Dodatku 2.1.

#### **NAČELO PRESKUSA (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)**

4. Preskus se uporablja za signaliziranje vezave estrogenskega receptorja z ligandom. Po vezavi liganda se kompleks receptor-ligand premesti na jedro, kjer se veže na specifične odzivne elemente DNK in transaktivira kresničkin luciferazni poročevalski gen, kar povzroči povečano celično izražanje luciferaznega encima. Luciferin je substrat, ki ga luciferazni encim pretvori v bioluminiscentni produkt, ki ga je mogoče kvantitativno izmeriti z luminometrom. Luciferazno aktivnost je mogoče hitro in poceni oceniti s številnimi preskusnimi kompleti, ki so na voljo na trgu.

5. Preskusni sistem uporablja celično linijo hER $\alpha$ -HeLa-9903, pridobljeno iz tumorja človeškega materničnega vratu, z dvema stabilno vstavljenima konstruktoma: (i) konstruktom za izražanje hER $\alpha$  (ki kodira celotno dolžino človeškega receptorja) in (ii) reporterskim konstruktom kresničkine luciferaze, ki nosi pet tandemskih ponovitev elementa, ki se odziva na estrogen (ERE), vitelogenina, ki ga sproži element TATA promotorja metalotioneina pri miših (MT). Genski konstrukt MT TATA pri miših se je izkazal kot najučinkovitejši in se pogosto uporablja. Posledično lahko ta celična linija hER $\alpha$ -HeLa-9903 meri sposobnost preskusne kemikalije, da sproži s hER $\alpha$  povzročeno transaktivacijo izražanja luciferaznega gena.
6. V primeru preskusa z agonistom ER je razlaga rezultatov odvisna od tega, ali je najvišja stopnja odziva, povzročena s preskusno kemikalijo, večja ali enaka odzivu agonista, ki znaša 10 % odziva, povzročena z najvišjo koncentracijo (1 nM) pozitivne kontrole (PC), tj. 17 $\beta$ -estradiola (E2) (tj. PC<sub>10</sub>). V primeru preskusa z antagonistom ER je razlaga podatkov odvisna od tega, ali odziv pokaže vsaj 30-odstotno zmanjšanje aktivnosti v primerjavi z odzivom, ki ga sproži eksogena sintetična kontrola (*spike in*) (25 pM E2) brez citotoksičnosti. Analiza in razlaga podatkov sta podrobno obravnavani v odstavkih 34–48.

## POSTOPEK

### Celične linije

7. Za preskus je treba uporabiti stabilno transfecirano celično linijo hER $\alpha$ -HeLa-9903. Celično linijo je mogoče po podpisu sporazuma o prenosu materiala dobiti od celične banke Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB)<sup>13</sup>.
8. Pri preskušanju se lahko uporabijo samo celice, za katere velja, da so brez mikoplazme. Priporočena metoda za občutljivo zaznavo okužbe z mikoplazmo je RT-PCR (verižna reakcija s polimerazo v realnem času) (4) (5) (6).

### Stabilnost celične linije

9. Za spremljanje stabilnosti celične linije je treba uporabiti E2, 17 $\alpha$ -estradiol, 17 $\alpha$ -metiltestosteron in kortikosteron kot referenčne standarde za preskus z agonistom, celotno krivuljo odziva na odmerke v območju preskusne koncentracije, navedenem v preglednici 1, pa je treba izmeriti vsaj enkrat ob vsaki izvedbi preskusa, pri čemer se morajo rezultati ujemati z rezultati, navedenimi v preglednici 1.

---

<sup>13</sup> Celična banka JCRB: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japonska; telefaks: +81 726419812.

10. V primeru preskusa z antagonistom je treba sočasno z vsako ponovitvijo izmeriti celotni krivulji koncentracije za dva referenčna standarda, in sicer tamoksifen in flutamid. Spremljati je treba pravilno kvalitativno razvrstitev obeh kemikalij med pozitivne ali negativne.

### **Pogoji gojenja celičnih kultur in nasaditve na ploščo**

11. Celice je treba vzdrževati v Eagleovem minimalnem osnovnem gojišču (EMEM) brez fenol rdečega, dopolnjenem s 60 mg/l antibiotika kanamicina in 10-odstotnim fetusnim serumom goveda, tretiranim z ogljem, prevlečenim z dekstranom (DCC-FBS), v inkubatorju s CO<sub>2</sub> (5 % CO<sub>2</sub>) pri 37 ± 1°C. Ko je dosežena 75–90-odstotna konfluentnost, se lahko celice kultivirajo na novem gojišču v 10 ml 0,4 x 10<sup>5</sup> – 1 x 10<sup>5</sup> celic/ml za 100-milimetrsko posodico za gojenje celičnih kultur. Celice je treba suspendirati z 10-odstotnim FBS-EMEM (kar je enako kot EMEM z DCC-FBS) in jih nato nasaditi v jamice mikrotitrne plošče z gostoto 1 x 10<sup>4</sup> celic/(100 µl x jamica). Nato je treba celice predinkubirati v inkubatorju s 5 % CO<sub>2</sub> pri 37 ± 1°C tri ure pred izpostavitvijo kemikaliji. V plastičnih posodah ne sme biti estrogenskega delovanja.
12. Da se ohrani celovitost odziva, je treba celice iz zamrznjene zaloge več kot eno pasažo gojiti v kondicioniranem gojišču, ne smejo pa biti gojene več kot 40 pasaž. Za celično linijo hERα-HeLa-9903 to pomeni manj kot tri mesece. Vendar se lahko učinkovitost celic zmanjša, če rastejo v neprimernih pogojih za gojenje.
13. DCC-FBS se lahko pripravi, kot je opisano v Dodatku 2.2, ali pridobi iz komercialnih virov.

### **Merila za sprejemljivost**

#### *Pozitivni in negativni referenčni standardi za preskus z agonistom ER*

14. Pred študijo in med njo je treba odzivnost preskusnega sistema preveriti z uporabo ustreznih koncentracij močnega estrogena: E2, šibkega estrogena (17α-estradiol), zelo šibkega agonista (17α-metiltestosteron) in negativne snovi (kortikosteron). Vrednosti sprejemljivega razpona, izpeljane iz validacijske študije (1), so navedene v preglednici 1. Te štiri sočasne referenčne standarde je treba vključiti v vsak poskus, rezultati pa morajo biti znotraj navedenih sprejemljivih mejnih vrednosti. V nasprotnem primeru je treba ugotoviti vzrok za neizpolnjevanje meril za sprejemljivost (npr. ravnanje s celicami ter serum in antibiotiki za kakovost in koncentracijo) in preskus ponoviti. Ko so dosežena merila za sprejemljivost, je za zagotovitev minimalne variabilnosti vrednosti EC<sub>50</sub>, PC<sub>50</sub> in PC<sub>10</sub> bistvena dosledna uporaba materialov za gojenje celic. Vsi štirje sočasni referenčni standardi, ki jih je treba vključiti v vsak poskus (izveden pod enakimi pogoji, vključno z materiali, ravno pasažo celic in tehniki), lahko zagotovijo občutljivost preskusa, ker morajo biti vrednosti PC<sub>10</sub> treh pozitivnih referenčnih standardov znotraj sprejemljivega razpona, tako kot tudi vrednosti PC<sub>50</sub> in EC<sub>50</sub>, kadar jih je mogoče izračunati (glej preglednico 1).

#### **Preglednica 1:** Vrednosti sprejemljivega razpona štirih referenčnih standardov za preskus z agonistom ER

Ime	logPC <sup>50</sup>	logPC <sub>10</sub>	logEC <sup>50</sup>	Hillov naklon	Razpon preskusa
17β-estradiol (E2) št. CAS: 50-28-2	-11,4 ~ -10,1	< -11	-11,3 ~ -10,1	0,7 ~ 1,5	10 <sup>-14</sup> ~ 10 <sup>-8</sup> M
17α-estradiol št. CAS: 57-91-0	-9,6 ~ -8,1	-10,7 ~ -9,3	-9,6 ~ -8,4	0,9 ~ 2,0	10 <sup>-12</sup> ~ 10 <sup>-6</sup> M
Kortikosteron št. CAS: 50-22-6	–	–	–	–	10 <sup>-10</sup> ~ 10 <sup>-4</sup> M
17α-metiltestosteron št. CAS: 58-18-4	-6,0 ~ -5,1	-8,0 ~ -6,2	–	–	10 <sup>-11</sup> ~ 10 <sup>-5</sup> M

*Pozitivni in negativni referenčni standardi pri preskusu z antagonistom ER*

15. Pred študijo in med njo je treba odzivnost preskusnega sistema preveriti z uporabo ustreznih koncentracij pozitivne snovi (tamoksifena) in negativne snovi (flutamida). Vrednosti sprejemljivega razpona, izpeljane iz validacijske študije (1), so navedene v preglednici 2. Ta dva sočasna referenčna standarda je treba vključiti v vsak poskus in rezultate a šteti za pravilne, kot je prikazano v merilih. V nasprotnem primeru je treba ugotoviti vzrok za neizpolnjevanje meril (npr. ravnanje s celicami ter serum in antibiotiki za kakovost in koncentracijo) in preskus ponoviti. Poleg tega je treba izračunati vrednosti IC<sub>50</sub> za pozitivno snov (tamoksifen), rezultati pa morajo biti znotraj navedenih sprejemljivih mejnih vrednosti. Ko so dosežena merila za sprejemljivost, je za zagotovitev minimalne variabilnosti vrednosti IC<sub>50</sub> bistvena dosledna uporaba materialov za gojenje celic. Občutljivost preskusa lahko zagotovita oba sočasna referenčna standarda, ki ju je treba vključiti v vsak poskus (izveden pod enakimi pogoji, vključno z materiali, ravno pasaže celic in tehniki) (glej preglednico 2).

**Preglednica 2:** Merila in vrednosti sprejemljivega razpona obeh referenčnih standardov za preskus z antagonistom ER

Ime	Merila	LogIC <sub>50</sub>	Razpon preskusa
Tamoksifen št. CAS: 10540-29-1	Pozitivno: izračunati je treba IC <sub>50</sub>	-5,942 ~ -7,596	10 <sup>-10</sup> ~ 10 <sup>-5</sup> M
Flutamid št. CAS: 13311-84-7	Negativno: izračunati je treba IC <sub>30</sub>	-	10 <sup>-10</sup> ~ 10 <sup>-5</sup> M

*Pozitivna kontrola in kontrola z vehiklom*

16. Pozitivno kontrolo (PC) za preskus z agonistom ER (1 nM E2) in preskus z antagonistom ER (10 μM TAM) je treba preskusiti v vsaj treh ponovitvah na vsaki plošči. Vehikel, v katerem se raztopi preskusna kemikalija, je treba preskusiti kot kontrolo z vehiklom (VC) v vsaj treh ponovitvah na vsaki plošči. Če se pri pozitivni kontroli uporabi drug vehikel kot za preskusno kemikalijo, je treba poleg te kontrole z vehiklom v vsaj treh ponovitvah na isti plošči s pozitivno kontrolo preskusiti še drugo kontrolo z vehiklom.

#### *Merila kakovosti za preskus z agonistom ER*

17. Srednja vrednost luciferazne aktivnosti pozitivne kontrole (1 nM E2) mora biti vsaj 4-kratnik srednje vrednosti kontrole z vehiklom na vsaki plošči. To merilo je določeno na podlagi zanesljivosti vrednosti končnih točk iz validacijske študije (pri preteklih preskusih med 4- in 30-kratnikom).
18. Kar zadeva kontrolo kakovosti preskusa, mora biti razmerje indukcije, ki ustreza vrednosti PC<sub>10</sub> sočasne pozitivne kontrole (1 nM E2), večje od 1 + 2 standardnega odklona (SD) vrednosti razmerja indukcije (= 1) sočasne kontrole z vehiklom. Za namene prednostnega razvrščanja je lahko vrednost PC<sub>10</sub> koristna za poenostavitev potrebne podatkovne analize v primerjavi s statistično analizo. Čeprav statistična analiza zagotovi podatke o statistični značilnosti, taka analiza ni kvantitativni parameter v zvezi s potencialom na podlagi koncentracije, zato je manj koristna za namene prednostnega razvrščanja.

#### *Merila kakovosti za preskus z antagonistom ER*

19. Srednja vrednost luciferazne aktivnosti eksogene sintetične kontrole (*spike in*) (25 nM E2) mora biti vsaj 4-kratnik srednje vrednosti kontrole z vehiklom na vsaki plošči. To merilo je določeno na podlagi zanesljivosti vrednosti končnih točk iz validacijske študije.
20. Kar zadeva kontrolo kakovosti preskusa, mora biti relativna transkripcijska aktivacija (RTA) 1 nM E2 večja od 100 %, RTA 1 μM 4-hidroksitamoksifena (OHT) mora znašati manj kot 40,6 %, RTA 100 μM digitonina (Dig) pa mora znašati manj kot 0 %.

Dokazovanje usposobljenosti laboratorija (glej odstavek 14 ter preglednici 3 in 4 v oddelku ‚ELEMENTI PRESKUSA ER TA‘ te preskusne metode).

#### **Vehikel**

21. Kot sočasno kontrolo z vehiklom je treba uporabiti dimetil sulfoksid (DMSO) ali ustrezno topilo pri enaki koncentraciji, kot se uporablja za različne pozitivne in negativne kontrole ter preskusne kemikalije. Preskusne kemikalije je treba raztopiti v topilu, v katerem je topna zadevna preskusna kemikalija in ki se meša s celičnim gojiščem. Primerni vehikli so voda, etanol (od 95- do 100-odstotna čistost) in DMSO. Če se uporabi DMSO, raven ne sme preseči 0,1 vol. %. Za vsak vehikel je treba dokazati, da največja uporabljena količina ni citotoksična in ne moti učinkovitosti preskusa.

#### **Priprava preskusnih kemikalij**

22. Na splošno je treba preskusne kemikalije raztopiti v DMSO ali drugem primernem topilu in jih zaporedoma razredčiti z istim topilom v običajnem razmerju 1 : 10, da se pripravijo raztopine za redčenje z medijem.

#### **Topnost in citotoksičnost: preudarki glede določanja območja**

23. Izvesti je treba predhodni preskus, da se ugotovi ustrezno območje koncentracije kemikalije, ki se preskuša, in preveri, ali bi se lahko za preskusno kemikalijo pojavile težave s topnostjo in citotoksičnostjo. Kemikalije se najprej preskusijo do največje koncentracije 1 µl/ml, 1 mg/ml ali 1 mM, pri čemer se upošteva najnižja od teh koncentracij. Glede na stopnjo citotoksičnosti ali pomanjkanje topnosti, opaženo v predhodnem preskusu, je treba pri prvi dokončni ponovitvi kemikalijo preskusiti z logaritemskimi zaporednimi razredčinami, ki se začnejo pri najvišji dopustni koncentraciji (npr. 1 mM, 100 µM, 10 µM itd.), in zapisati morebitno motnost, oborino ali citotoksičnost. Koncentracije pri drugi, in če je potrebno, tretji ponovitvi je treba ustrezno prilagoditi, da se bolje opredeli krivulja odziva na koncentracijo in preprečijo koncentracije, za katere se ugotovi, da niso topne ali da povzročajo preveliko citotoksičnost.
24. Pri agonistih in antagonistih ER se lahko zaradi naraščajočih ravni citotoksičnosti bistveno spremeni ali odpravi značilni sigmoidni odziv, kar je treba upoštevati pri razlagi podatkov. Uporabiti je treba metode preskušanja citotoksičnosti, ki lahko zagotovijo informacije v zvezi z 80-odstotno viabilnostjo celic, pri čemer se na podlagi izkušenj laboratorija uporabi ustrezen preskus.
25. Če rezultati preskusa citotoksičnosti pokažejo, da se je zaradi koncentracije preskusne kemikalije število celic zmanjšalo za 20 % ali več, je treba to koncentracijo šteti za citotoksično, koncentracije, ki so enake citotoksični koncentraciji ali višje od nje, pa je treba izključiti iz ocene.

### **Izpostavitev kemikaliji in razporeditev na preskusni plošči**

26. Postopek redčenja kemikalije (1. in 2. korak) in izpostavitve celicam (3. korak) se lahko izvede, kot je opisano v nadaljevanju.

1. korak Vsako preskusno kemikalijo je treba zaporedno razredčiti v DMSO ali ustreznem topilu in dodati v jamice na mikrotitrski plošči, da se dosežejo končne zaporedne koncentracije, kot so določene s predhodnim preskusom za določanje območja (običajno v nizu 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM in 10 pM (od  $10^{-3}$  do  $10^{-11}$  M)), za preskušanje v treh ponovitvah.

2. korak Redčenje kemikalije: najprej razredčite 1,5 µl preskusne kemikalije v topilu do koncentracije 500 µl medija.

3. korak Izpostavitev celic kemikaliji: dodajte 50 µl razredčine z medijem (pripravljene v 2. koraku) v preskusno jamico, ki vsebuje  $10^4$  celic/100 µl/jamico.

Priporočena končna količina medija, potrebna za vsako jamico, je 150 µl. Preskusni vzorci in referenčni standardi se lahko razvrstijo, kot je prikazano v preglednicah 3 in 4.

**Preglednica 3:** Primer razvrstitve referenčnih standardov glede na koncentracije na preskusni plošči pri preskusu z agonistom ER

Vrstica	17 $\alpha$ -metiltestosteron			Kortikosteron			17 $\alpha$ -estradiol			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 $\mu$ M)	→	→	100 $\mu$ M	→	→	1 $\mu$ M	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 $\mu$ M)	→	→	10 $\mu$ M	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	1 $\mu$ M	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kontrola z vehiklom (0,1 % DMSO); PC: pozitivna kontrola (1 nM E2)

27. Referenčne standarde (E2, 17 $\alpha$ -estradiol, 17 $\alpha$ -metiltestosteron in kortikosteron) je treba preskusiti pri vsaki ponovitvi (preglednica 3). Na vsako preskusno ploščo je treba vključiti jamice s pozitivno kontrolo, tretirane z 1 nM E2, ki lahko povzroči največjo indukcijo E2, in jamice z VC, tretirane samo z DMSO (ali ustreznim topilom) (preglednica 4). Če se pri istem poskusu uporabijo celice iz različnih virov (npr. različna številka pasaže, različna serija itd.), je treba referenčne standarde preskusiti za vsak vir celic.

**Preglednica 4:** Primer razvrstitve preskusnih kemikalij in kemikalij za kontrolo plošč glede na koncentracije na preskusni plošči pri preskusu z agonistom ER

Vrstica	Preskusna kemikalija 1			Preskusna kemikalija 2			Preskusna kemikalija 3			Preskusna kemikalija 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 $\mu$ M)	→	→	1 nM	→	→	1 $\mu$ M	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 $\mu$ M)	→	→	100 $\mu$ M	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	10 $\mu$ M	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	1 $\mu$ M	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→


VC: kontrola z vehiklom (0,1 % DMSO); PC: pozitivna kontrola (1 nM E2)

**Preglednica 5:** Primer razvrstitve referenčnih standardov glede na koncentracije na preskusni plošči pri preskusu z antagonistom ER

Vrstica	Tamoksifen			Flutamid			Preskusna kemikalija 1			Preskusna kemikalija 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 $\mu$ M)	→	→	10 $\mu$ M	→	→	10 $\mu$ M	→	→	10 $\mu$ M	→	→
B	konc. 2 (1 $\mu$ M)	→	→	1 $\mu$ M	→	→	1 $\mu$ M	→	→	1 $\mu$ M	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 $\mu$ M OHT	→	→	100 $\mu$ M Dig	→	→


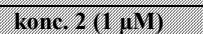





H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→
---	----	---	---	---	---	---	----	---	---	---	---	---

VC: kontrola z vehiklom (0,1 % DMSO), PC: pozitivna kontrola (1 nM E2), OHT: 4-hidroksitamoksifen, dig: digitonin.


 = z dodatkom 25 pM E2.

28. Za oceno antagonističnega delovanja kemikalij je treba preskusnim jamicam v vrsticah od A do G dodati 25 pM E2. Referenčna standarda (tamoksifen in flutamid) je treba preskusiti pri vsaki ponovitvi. Na vsako preskusno ploščo je treba vključiti jamice s pozitivno kontrolo, tretirane z 1 nM E2, ki se lahko uporabijo za kontrolo kakovosti celične linije hER $\alpha$ -HeLa-9903, jamice s kontrolo z vehiklom, tretirane z DMSO (ali ustreznim topilom), jamice z 0,1 % DMSO, tretirane z dodanim DMSO v dodatku E2, ki ustreza eksogeni sintetični kontroli (*slope-in-control*), jamice, tretirane s končno koncentracijo 1  $\mu$ M OHT, in jamice, tretirane s 100  $\mu$ M Dig (preglednica 5). Naslednja preskusna plošča mora imeti enako razporeditev, a brez jamic z referenčnimi standardi (preglednica 6). Če se pri istem poskusu uporabijo celice iz različnih virov (npr. različna številka pasaže, različna serija itd.), je treba referenčne standarde preskusiti za vsak vir celic.

**Preglednica 6:** Primer razvrstitve preskusnih kemikalij in kemikalij za kontrolo plošč glede na koncentracije na preskusni plošči pri preskusu z antagonistom ER

Vrstica	Preskusna kemikalija 1			Preskusna kemikalija 2			Preskusna kemikalija 3			Preskusna kemikalija 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	 konc. 1 (10 $\mu$ M)	→	→	10 $\mu$ M	→	→	10 $\mu$ M	→	→	10 $\mu$ M	→	→
B	 konc. 2 (1 $\mu$ M)	→	→	1 $\mu$ M	→	→	1 $\mu$ M	→	→	1 $\mu$ M	→	→
C	 konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	 konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	 konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	 konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	 0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 $\mu$ M OHT	→	→	100 $\mu$ M Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kontrola z vehiklom (0,1 % DMSO), PC: pozitivna kontrola (1 nM E2), OHT: 4-hidroksitamoksifen, dig: digitonin.

 : z dodatkom 25 pM E2.

29. Potrditi je treba neobstoje učinkov robov, če je ustrezno, če pa se sumi, da ti obstajajo, je treba spremeniti razporeditev plošče, da se taki učinki preprečijo. Uporabi se lahko na primer razporeditev na plošči, pri kateri ni robnih jamic.

30. Po dodajanju kemikalij je treba preskusne plošče od 20 do 24 ur inkubirati v inkubatorju s 5 % CO<sub>2</sub> pri 37  $\pm$  1 °C, da se povzroči nastanek produktov poročevalskega gena.

31. Posebni preudarki so potrebni pri spojinah, ki so zelo hlapne. V takih primerih lahko kontrolne jamice v bližini dajo lažno pozitivne rezultate, kar je treba upoštevati glede na

pričakovane vrednosti in vrednosti kontrol pri preteklih preskusih. V redkih primerih, ko je hlapnost lahko problematična, je mogoče z uporabo ‚tesnil‘ za plošče med preskušanjem učinkovito izolirati posamezne jamice, zato je v takih primerih njihova uporaba priporočljiva.

32. Ponovitve dokončnih preskusov za isto kemikalijo je treba izvesti na različne dneve, da se zagotovi neodvisnost.

### **Preskus z luciferazo**

33. Za preskus se lahko uporabi na trgu dostopen luciferazni reagent (npr. Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510 ali enakovreden)) ali standardni sistem preskusa z luciferazo (npr. Promega, E1500 ali enakovreden), če so izpolnjena merila za sprejemljivost. Preskusne reagente je treba izbrati na podlagi občutljivosti luminometra, ki bo uporabljen. Kadar se uporabi standardni sistem preskusa z luciferazo, je treba pred dodajanjem substrata uporabiti lizni reagent za celično kulturo (npr. Promega, E1531 ali enakovreden). Luciferazni reagent je treba nanesti po navodilih proizvajalca.

## **ANALIZA PODATKOV**

### **Preskus z agonistom ER**

34. V primeru preskusa z agonistom ER, katerega cilj je dobiti relativno transkripcijsko aktivnost za pozitivno kontrolo (1 nM E2), se lahko luminiscenčni signali z iste plošče analizirajo v korakih, opisanih v nadaljevanju (sprejemljivi so tudi drugi enakovredni matematični postopki).

1. korak Izračunajte srednjo vrednost za kontrolo z vehiklom.
2. korak Od vrednosti za posamezno jamico odštejte srednjo vrednost kontrole z vehiklom, da normalizirate podatke.
3. korak Izračunajte srednjo vrednost za normalizirano pozitivno kontrolo.
4. korak Normalizirano vrednost vsake jamice na plošči delite s srednjo vrednostjo normalizirane pozitivne kontrole (pozitivna kontrola = 100 %).

Končna vrednost vsake jamice je relativna transkripcijska aktivnost za zadevno jamico v primerjavi z odzivom pozitivne kontrole.

5. korak Izračunajte srednjo vrednost relativne transkripcijske aktivnosti za vsako skupino koncentracije preskusne kemikalije. Dimenziji odziva sta dve: izračunana povprečna transkripcijska aktivnost (odziv) in koncentracija, pri kateri pride do odziva (glej naslednji oddelek).

### **Preudarki v zvezi z indukcijo EC<sub>50</sub>, PC<sub>50</sub> in PC<sub>10</sub>**

35. Za izračun  $EC_{50}$  je potrebna celotna krivulja odziva na koncentracijo, vendar to morda ni vedno dosegljivo ali praktično zaradi omejitev razpona preskusnih koncentracij (na primer zaradi težav s toksičnostjo ali topnostjo). Ker pa sta  $EC_{50}$  in najvišja raven indukcije (ki ustreza zgornji vrednosti Hillove enačbe) informativna parametra, ju je treba po možnosti navesti. Za izračun  $EC_{50}$  in najvišje ravni indukcije je treba uporabiti ustrezno statistično programsko opremo (npr. Graphpad Prism). Če se lahko Hillova logistična enačba uporabi za podatke o odzivu na koncentracijo, je treba  $EC_{50}$  izračunati z naslednjo enačbo (7):

$$Y = \text{dno} + (\text{vrh} - \text{dno}) / (1 + 10^{\text{eksp}((\log EC_{50} - X) \times \text{Hillov naklon}))}, \text{ kjer je:}$$

X logaritem koncentracije in

Y odziv, pri čemer se Y začne na dnu in gre do vrha na sigmoidni krivulji. Dno je v Hillovi logistični enačbi določeno pri nič.

36. Za vsako preskusno kemikalijo je treba zagotoviti naslednje:

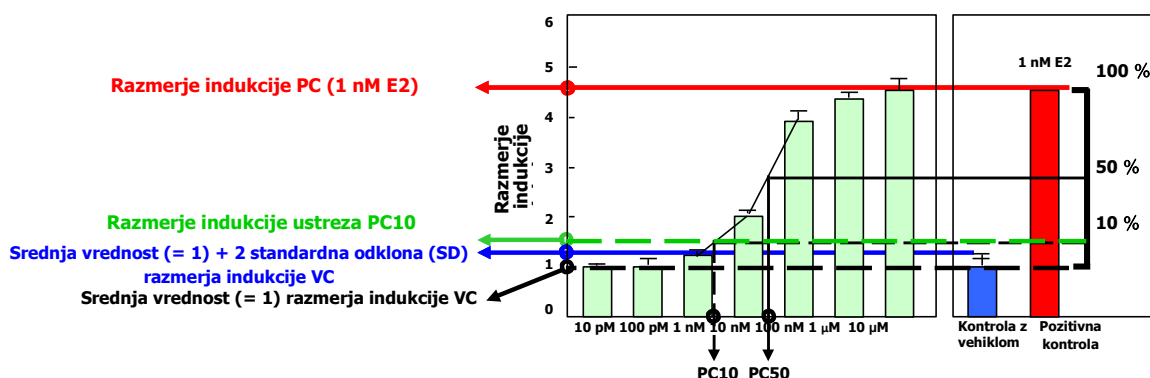
$RPC_{\text{Max}}$ , ki je najvišja stopnja odziva, povzročena s preskusno kemikalijo, izražena kot delež odziva, povzročena z 1 nM E2 na isti plošči, in  $PC_{\text{Max}}$  (koncentracija, povezana z  $RPC_{\text{Max}}$ ); in za pozitivne kemikalije koncentracije, ki povzročijo  $PC_{10}$ , in če je ustrezno,  $PC_{50}$ .

37. Vrednost  $PC_x$  se lahko izračuna z interpolacijo med dvema točkama na koordinati X-Y, pri čemer je ena tik nad vrednostjo  $PC_x$  in ena tik pod njo. Kadar imata podatkovni točki, ki ležita tik nad vrednostjo  $PC_x$  in pod njo, koordinate (a, b) oziroma (c, d), se lahko vrednost  $PC_x$  izračuna z uporabo naslednje enačbe:

$$\log[PC_x] = \log[c] + (x - d) / (d - b)$$

38. Opisi vrednosti PC so navedeni na sliki 1 v nadaljevanju.

Slika 1: Primer izpeljave vrednosti PC. PC (1 nM E2) je vključena na vsako preskusno ploščo.





### Preskus z antagonistom ER

39. V primeru preskusa z antagonistom ER, katerega cilj je dobiti relativno transkripcijsko aktivnost (RTA) za eksogeno sintetično kontrolo (*spike in*) (25 pM E2), se lahko luminiscenčni signali z iste plošče analizirajo v korakih, opisanih v nadaljevanju (sprejemljivi so tudi drugi enakovredni matematični postopki).

1. korak Izračunajte srednjo vrednost za kontrolo z vehiklom.

2. korak Od vrednosti za posamezno jamico odštejte srednjo vrednost kontrole z vehiklom, da normalizirate podatke. 3. korak Izračunajte srednjo vrednost za normalizirano eksogeno sintetično kontrolo (*spike in*).

4. korak Normalizirano vrednost vsake jamice na plošči delite s srednjo vrednostjo normalizirane eksogene sintetične kontrole (*spike in*) (eksogena sintetična kontrola = 100 %).

Končna vrednost vsake jamice je relativna transkripcijska aktivnost za zadevno jamico glede na odziv eksogene sintetične kontrole (*spike in*).

5. korak Za vsako tretiranje izračunajte srednjo vrednost relativne transkripcijske aktivnosti.

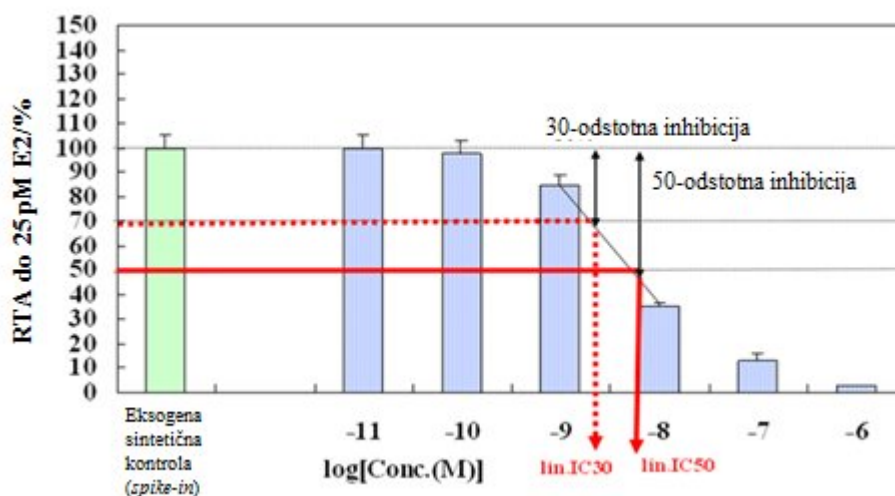
### Preudarki v zvezi z indukcijo IC<sub>30</sub> in IC<sub>50</sub>

40. Za pozitivne kemikalije je treba zagotoviti koncentracije, ki povzročijo IC<sub>30</sub>, in če je ustrezno, IC<sub>50</sub>.

41. Vrednost IC<sub>x</sub> se lahko izračuna z interpolacijo med dvema točkama na koordinati X-Y, pri čemer je ena tik nad vrednostjo IC<sub>x</sub> in ena tik pod njo. Kadar imata podatkovni točki, ki ležita tik nad vrednostjo IC<sub>x</sub> in pod njo, koordinate (c, d) oziroma (a, b), se lahko vrednost IC<sub>x</sub> izračuna z uporabo naslednje enačbe:

$$\ln IC_x = a - (b - (100 - x)) (a - c) / (b - d)$$

**Slika 2: Primer izpeljave vrednosti IC. Eksogena sintetična kontrola (*spike in*) (25 pM E2) je vključena na vsako preskusno ploščo.**



RTA: relativna transkripcijska aktivnost.

42. Rezultati morajo temeljiti na dveh (ali treh) neodvisnih ponovitvah. Če se z dvema ponovitvama dobijo primerljivi in torej obnovljivi rezultati, tretje ponovitve ni treba izvesti. Rezultati so sprejemljivi, če:

- izpolnjujejo merila za sprejemljivost (glej merila za sprejemljivost v odstavkih 14–20),
- so obnovljivi.

### Merila za razlago rezultatov

**Preglednica 7:** Merila za odločitev, ali je pri preskusu z agonistom ER snov pozitivna ali negativna

<b>Pozitivna</b>	Če je dobljena vrednost $RPC_{Max}$ najmanj enaka 10 % odziva pozitivne kontrole pri vsaj dveh od dveh ali dveh od treh ponovitev.
<b>Negativna</b>	Če vrednost $RPC_{Max}$ ne doseže vsaj 10 % odziva pozitivne kontrole pri dveh od dveh ali dveh od treh ponovitev.

**Preglednica 8:** Merila za negativno in pozitivno odločitev pri preskusu z antagonistom ER

<b>Pozitivna</b>	Če je vrednost $IC_{30}$ izračunana pri vsaj dveh od dveh ali dveh od treh ponovitev.
<b>Negativna</b>	Če vrednost $IC_{30}$ ni izračunana pri dveh od dveh ali dveh od treh ponovitev.

43. Merila za razlago podatkov so prikazana v preglednicah 7 in 8. Za pozitivne rezultate sta značilni velikost učinka in koncentracija, pri kateri se pojavi učinek. Oba cilja sta dosežena, če so rezultati izraženi kot koncentracija, pri kateri sta vrednosti PC 50 % (PC50) ali 10 % (PC10) doseženi pri preskusu z agonistom, vrednost 50 % (IC50) ali 30 % (IC30) eksogene

sintetične kontrole (*spike in*) pa je pri preskusu z antagonistom zavrta. Preskusna kemikalija je sicer določena kot pozitivna, če je največji odziv, ki ga sproži preskusna kemikalija (RPCMax), najmanj enak 10 % odziva PC pri vsaj dveh od dveh ali dveh od treh ponovitev, medtem ko se preskusna kemikalija šteje za negativno, če RPCMax ne doseže vsaj 10 % odziva pozitivne kontrole pri dveh od dveh ali dveh od treh ponovitev.

44. Za izračune  $PC_{10}$ ,  $PC_{50}$  in  $PC_{Max}$  pri preskusu z agonistom ER ter  $IC_{30}$  in  $IC_{50}$  pri preskusu z antagonistom ER se lahko uporabi preglednica, ki je skupaj s smernico za preskušanje na voljo na javnem spletnem mestu OECD<sup>1</sup>.
45. Zadostovati bi moralo, da se vrednosti  $PC_{10}$  ali  $PC_{50}$  in  $IC_{30}$  ali  $IC_{50}$  dobijo vsaj dvakrat. Če pa tako dobljena referenčna vrednost za podatke v istem območju koncentracije kaže variabilnost z nedopustno visokim koeficientom variacije (KV; %), podatkov ni mogoče šteti za zanesljive in je treba opredeliti izvor tako visoke variabilnosti. KV neobdelanih podatkov treh ponovitev (tj. podatkov o intenzivnosti luminescence) za podatkovne točke, ki se uporabijo za izračun  $PC_{10}$ , mora biti manjši od 20 %.
46. Izpolnjevanje meril za sprejemljivost kaže, da preskusni sistem deluje pravilno, vendar ne zagotavlja, da bodo pri vsaki posamezni ponovitvi preskusa dobljeni točni podatki. Najboljše zagotovilo, da so bili dobljeni točni podatki, je podvojitev rezultatov prve ponovitve.
47. V primeru preskusa z agonistom ER, če je poleg te smernice za preskušanje za namene presejanja in prednostnega razvrščanja za pozitivne preskusne kemikalije potrebnih še več informacij, zlasti za kemikalije PC10–PC49 in kemikalije, za katere se sumi, da pretirano spodbujajo luciferazo, se lahko z uporabo antagonista ER $\alpha$  potrdi, da gre pri opaženi luciferazni aktivnosti izključno za odziv, povezan z ER $\alpha$  (glej Dodatek 2.1).

## **POROČILO O PRESKUSU**

48. Glej odstavek 20 ‚ELEMENTI PRESKUSA ER TA‘.

---

<sup>1</sup> <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.

## VIRI

- (1) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 225), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (2) Escande, A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459–1469.
- (3) Kuiper, G. G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.*, 139, 4252–4263.
- (4) Spaepen, M., *et al.* (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, *FEMS Microbiol. Lett.*, 78(1), 89–94.
- (5) Kobayashi, H., *et al.* (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769–71.
- (6) Dussurget, O., in Roulland-Dussoix, D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(3), 953–9.
- (7) De Lean, A., Munson, P. J., in Rodbard, D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, *Am. J. Physiol.*, 235, E97-E102.

## Dodatek 2.1

### **LAŽNO POZITIVNI REZULTATI: OCENA NERECEPTORSKO POVZROČENIH LUMINISCENČNIH SIGNALOV**

1. Lažno pozitivne rezultate pri preskusu z agonistom ER lahko povzroči aktivacija luciferaznega gena, ki ni povzročena z ER, ali neposredna aktivacija genskega produkta ali nepovezane fluorescence. Na take učinke kaže nepopolna ali neobičajna krivulja odziva na odmere. Če se sumi o obstoju takih učinkov, je treba preučiti učinek antagonist ER (npr. 4-hidroksitamoksifena (OHT) pri netoksični koncentraciji) na odziv. Čisti antagonist ICI 182780 morda ni primeren za ta namen, saj se lahko zaradi zadostne koncentracije ICI 182780 zniža vrednost kontrole z vehiklom, kar vpliva na podatkovno analizo.
2. Za zagotovitev veljavnosti tega pristopa je treba na isti plošči preskusiti naslednje:
  - agonistično delovanje neznane kemikalije z/brez 10  $\mu$ M OHT,
  - kontrolo z vehiklom (v treh ponovitvah),
  - OHT (v treh ponovitvah),
  - 1 nM E2 (v treh ponovitvah) kot agonist pozitivne kontrole,
  - 1 nM E2 + OHT (v treh ponovitvah).

#### **Merila za razlago rezultatov**

Opomba: vse jamice je treba tretirati z enako koncentracijo vehikla.

- Če na agonistično delovanje neznane kemikalije tretiranje z antagonistom ER NE vpliva, je razvrščena kot ‚negativna‘.
- Če je agonistično delovanje neznane kemikalije popolnoma zavrt, uporabite merila za odločitev.
- Če je agonistično delovanje pri najnižji koncentraciji najmanj enako odzivu PC<sub>10</sub>, je inhibicija neznane kemikalije najmanj enaka odzivu PC<sub>10</sub>. Izračuna se razlika v odzivih med netretiranimi in tretiranimi jamicami z antagonistom ER, to razliko pa je treba šteti za dejanski odziv in jo je treba uporabiti za izračun ustreznih parametrov, da se lahko sprejme odločitev o razvrstitvi.

#### **Podatkovna analiza**

Preverite standard izvajanja.

Preverite KV med jamicami, tretiranimi v enakih pogojih.

1. Izračunajte srednjo vrednost kontrole z vehiklom.
2. Srednjo vrednost kontrole z vehiklom odštejte od vrednosti za posamezno jamico, ki **ni** tretirana z OHT.
3. Izračunajte srednjo vrednost OHT.
4. Od vrednosti za posamezno jamico, tretirano z OHT, odštejte srednjo vrednost kontrole z vehiklom.
5. Izračunajte srednjo vrednost pozitivne kontrole.
6. Izračunajte relativno transkripcijsko aktivnost vseh drugih jamic glede na pozitivno kontrolo.

## Dodatek 2.2

### **PRIPRAVA SERUMA, TRETIRANEGA Z OGLJEM, PREVLEČENIM Z DEKSTRANOM (DCC)**

1. Tretiranje seruma z ogljem, prevlečenim z dekstranom (DCC), je splošna metoda za odstranitev estrogenih spojin iz seruma, ki se doda celičnemu gojišču, da se izključi izkrivljen odziv, povezan z ostanki estrogenov v serumu. S tem postopkom se lahko tretira 500 ml fetusnega seruma goveda (FBS).

#### **Elementi**

2. Potrebni so materiali in oprema, navedeni v nadaljevanju.

#### *Materiali*

Aktivno oglje

Dekstran

Magnezijev klorid heksahidrat ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )

Saharoza

1 M pufrske raztopine HEPES (pH 7,4)

Ultra čista voda, dobljena s filtrskim sistemom

#### *Oprema*

Avtoklavirana steklena posoda (velikost je treba ustrezno prilagoditi), običajna laboratorijska centrifuga (pri kateri se lahko temperatura nastavi na 4 °C)

#### **Postopek**

3. Naslednji postopek je prilagojen za uporabo 50-mililitrskih centrifugalnih epruvet.

[1. dan] Pripravite raztopino oglja, prevlečenega z dekstranom, z 1 l ultra čiste vode, ki vsebuje 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,25 M saharoze, 2,5 g oglja, 0,25 g dekstrana in 5 mM HEPES, ter jo čez noč mešajte pri 4 °C.

[2. dan] Raztopino odmerite v 50-mililitrske centrifugalne epruvete in 10 minut centrifugirajte pri 10 000 vrt./min pri 4 °C. Odstranite supernatant in polovico usedline oglja shranite pri 4 °C, da se bo uporabila tretji dan. Drugo polovico oglja raztopite s FBS, ki ste ga odtaljevali počasi, da se je preprečilo obarjanje, in 30 minut toplotno inaktivirali pri 56 °C, nato vse skupaj prestavite v avtoklavirano stekleno posodo, kot je erlenmajerica. To suspenzijo čez noč rahlo mešajte pri 4 °C.

[3. dan] Odmerite suspenzijo s FBS v centrifugalne epruvete za 10-minutno centrifugiranje pri 10 000 vrt./min pri 4 °C. Zberite FBS in ga prenesite na novo ogleno usedlino, pripravljeno in shranjeno drugi dan. Suspendirajte ogleno usedlino in to suspenzijo čez noč rahlo mešajte v avtoklavirani stekleni posodi pri 4 °C.

[4. dan] Odmerite suspenzijo za 10-minutno centrifugiranje pri 10 000 vrt./min. pri 4 °C in sterilizirajte supernatant s filtracijo skozi 0,2-mikrometrski sterilni filter. Ta FBS, tretiran z ogljem, prevlečenim z dekstranom (DCC), je treba hraniti pri -20 °C in porabiti v enem letu.

### DODATEK 3

## **PRESKUS TRANSAKTIVACIJE ESTROGENSKEGA RECEPTORJA VM7LUC ZA OPREDELITEV AGONISTOV IN ANTAGONISTOV ESTROGENSKIH RECEPTORJEV**

### **ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)**

1. Pri tem preskusu se uporablja celična linija VM7Luc4E2<sup>1</sup>. Validirala sta jo National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) in Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) (1). Celične linije VM7Luc pretežno izražajo endogeno ER $\alpha$  in manjšo količino endogene ER $\beta$  (2) (3) (4).
2. Ta preskus se uporablja za širok razpon snovi, če jih je mogoče raztopiti v dimetil sulfoksidu (DMSO; št. CAS 67-68-5), ne reagirajo z DMSO ali gojiščem celičnih kultur in niso toksične pri koncentracijah, ki se preskušajo. Če uporaba DMSO ni mogoča, se lahko uporabi drug vehikel, kot je etanol ali voda (glej odstavek 12). Dokazana učinkovitost preskusa z (ant)agonistom VM7Luc ER TA nakazuje, da se lahko podatki, dobljeni s tem preskusom, uporabijo za z ER povzročene mehanizme delovanja in se lahko upoštevajo pri prednostnem razvrščanju snovi za nadaljnje preskušanje.
3. Ta preskus je izrecno namenjen zaznavi s hER $\alpha$  in hER $\beta$  povzročene TA z merjenjem kemiluminiscence kot končne točke. Uporaba kemiluminiscence v bioloških preskusih je zelo razširjena, ker ima luminiscenca visoko razmerje med signalom in ozadjem (10). Vendar lahko aktivnost kresničkine luciferaze v celičnih preskusih motijo snovi, ki zavirajo luciferazni encim, kar povzroči bodisi očitno zaviranje bodisi povečano luminiscenco zaradi stabilizacije proteinov (10). Poleg tega se je pri nekaterih preskusih na luciferaznem poročevalskem genu ER poročalo o nereceptorsko povzročenih luminiscenčnih signalih pri koncentracijah fitoestrogena, višjih od 1  $\mu$ M, ki so se pojavili zaradi prevelike aktivacije

---

<sup>1</sup> Pred junijem 2016 se je ta celična linija imenovala BG1Luc. Celice BG-1 so prvotno opisali Geisinger *et al.* (1998) (12), pozneje pa so njihove lastnosti opredelili raziskovalci inštituta National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (13). Še ne tako daleč nazaj so odkrili, da obstajata dve varianti celic BG-1, ki ju uporabljajo raziskovalci, tj. BG-1 Fr in BG-1 NIEHS. Poglobljena analiza, vključno s testiranjem DNK, teh dveh variant celične linije BG-1, ki so jo izvedli Li in sodelavci (2014) (14), je pokazala, da je BG-1 Fr edinstvena in da BG-1 NIEHS, tj. prvotna celična linija, ki je bila uporabljena za razvoj preskusa, ni celična linija karcinoma jajčnikov pri človeku, tj. BG1, temveč je varianta celične linije raka dojke pri človeku, tj. MCF7. Celična linija, uporabljena v preskusu, ki se je prvotno imenovala BG1Luc4E2 (15), se bo zdaj imenovala VM7Luc4E2 (,V' = varianta; ,M7' = celice MCF7). Podobno se bo tudi preskus zdaj imenoval VM7Luc ER TA. Čeprav se s tem spremeni izvor celične linije, na kateri temelji preskus, to ne vpliva na objavljene validacijske študije niti na koristnost in uporabo tega preskusa za presejanje estrogenskih/antiestrogenskih kemikalij.

luciferaznega poročevalskega gena (9) (11). Čeprav krivulja odziva na odmerek kaže, da do dejanske aktivacije sistema ER pride pri nižjih koncentracijah, je treba izražanje luciferaze, dobljeno pri visokih koncentracijah fitoestrogenov ali podobnih spojin, ki domnevno povzročajo fitoestrogenu podobno preveliko aktivacijo luciferaznega poročevalskega gena, pazljivo preučiti v sistemih preskusa ER TA s stabilno transfekcijo (see Appendix 2).

4. Pred uporabo tega preskusa za regulativne namene je treba prebrati oddelka ‚SPLOŠNI UVOD‘ in ‚ELEMENTI PRESKUSA ER TA‘. Opredelitve pojmov in kratice, uporabljene pri tej preskusni metodi, so opisane v Dodatku 1.

## **NAČELO PRESKUSA (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)**

5. S tem preskusom se pokaže vezava liganda ER, ki ji sledi premestitev kompleksa receptor-ligand na jedro. V jedru se kompleks receptor-ligand veže na specifične odzivne elemente DNK in transaktivira poročevalski gen (*luc*), kar povzroči nastanek luciferaze in poznejše oddajanje svetlobe, kar je mogoče kvantificirati z luminometrom. Luciferazno aktivnost je mogoče hitro in poceni oceniti s številnimi kompleti, ki so na voljo na trgu. Pri VM7Luc ER TA se uporablja celična linija človeškega adenokarcinoma, odzivna na ER, tj. VM7, ki je bila stabilno transfecirana s konstruktom kresničkinnega poročevalskega gena *luc* pod nadzorom štirih odzivnih elementov za estrogen nad promotorjem virusa tumorja mlečne žleze pri miši (MMTV) za zaznavo snovi z agonističnim ali antagonističnim delovanjem ER *in vitro*. Ta promotor MMTV le šibko navzkrižno reagira z drugimi steroidnimi in nesteroidnimi hormoni (8). Merila za razlago podatkov so podrobno opisana v odstavku 41. Na kratko, pozitiven odziv se opredeli s krivuljo odziva na koncentracijo, ki vsebuje vsaj tri točke z vrsticami napak, ki se ne prekrivajo (srednja vrednost  $\pm$  standardni odklon), in s spremembo amplitude (normalizirana relativna svetlobna enota (RLU)), ki znaša vsaj 20 % največje vrednosti za referenčni standard (17 $\beta$ -estradiol (E2; št. CAS 50-28-2) za preskus z agonistom, raloksifen HCl (Ral; št. CAS 84449-90-1)/E2 za preskus z antagonistom).

## **POSTOPEK**

### **Celična linija**

6. Za preskus je treba uporabiti stabilno transfecirano celično linijo VM7Luc4E2. Celična linija je trenutno na voljo samo s tehničnim licenčnim sporazumom z univerzo University of

California, Davis, Kalifornija, ZDA<sup>1</sup>, in podjetjem Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, Severna Karolina, ZDA<sup>2</sup>.

### **Stabilnost celične linije**

7. Da se ohranita stabilnost in celovitost celične linije, je treba celice iz zamrznjene zaloge v vzdrževalnem gojišču gojiti več kot eno pasažo (glej odstavek 9). Celice se ne smejo gojiti več kot 30 pasaž. Za celično linijo VM7Luc4E2 30 pasaž pomeni približno tri mesece.

### **Pogoji gojenja celičnih kultur in nasaditve na plošče**

8. Slediti je treba postopkom iz smernic za dobro prakso pri gojenju celic (5) (6), da se zagotovi kakovost vseh materialov in metod ter tako ohranijo celovitost, veljavnost in obnovljivost vsega opravljenega dela.
9. Celice VM7Luc4E2 se vzdržujejo v gojišču RPMI 1640 z dodanima 0,9-odstotno raztopino Pen-Strep in 8,0-odstotnim fetusnim serumom goveda (FBS) v namenskem inkubatorju za tkivne kulture pri  $37 \pm 1$  °C, vlažnosti, ki znaša  $90 \pm 5$  %, in  $5,0 \pm 1$  % CO<sub>2</sub> v zraku.
10. Ko je dosežena ~ 80-odstotna konfluenca, se celice VM7Luc4E2 kultivirajo na novem gojišču in 48 ur kondicionirajo v okolju brez estrogena, preden se nasadijo na 96-jamične plošče, da se izpostavijo preskusnim kemikalijam in analizi indukcije luciferazne aktivnosti v odvisnosti od estrogena. Gojišče brez estrogena (EFM) vsebuje Dulbeccovo modificirano Eagleovo gojišče (DMEM) brez fenol rdečega, ki so mu dodani 4,5-odstotni FBS, tretiran z ogljem/dekstranom, 1,9-odstotni L-glutamin in 0,9-odstotna raztopina Pen-Strep. V plastičnih posodah ne sme biti estrogenskega delovanja (glej podroben protokol (7)).

### **Merila za sprejemljivost**

11. Sprejetje ali zavrnitev preskusa temelji na oceni rezultatov referenčnih standardov in kontrol za posamezni poskus, izveden na 96-jamični plošči. Vsak referenčni standard se preskusi pri več koncentracijah, prav tako je več vzorcev vsake referenčne in kontrolne koncentracije. Rezultati se primerjajo s kontrolami kakovosti za te parametre, izpeljanimi iz zbirke podatkov iz preteklih preskusov z agonisti in antagonisti, ki jih je vsak laboratorij ustvaril med dokazovanjem usposobljenosti. Zbirke podatkov iz preteklih preskusov se stalno

---

<sup>1</sup> Dr. Michael S. Denison, profesor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, e-naslov: [msdenison@ucdavis.edu](mailto:msdenison@ucdavis.edu), (530) 7548649.

<sup>2</sup> Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, e-naslov: [info@dioxins.com](mailto:info@dioxins.com), telefon: 9196884804, telefaks: 9196884404.

posodabljaajo z vrednostmi referenčnih standardov in kontrol. Zaradi sprememb opreme ali laboratorijskih pogojev je morda treba ustvariti posodobljene zbirke podatkov iz preteklih preskusov.

### *Preskus z agonistom*

#### Preskus za določanje območja

- Indukcija: indukcijo plošče je treba izmeriti tako, da se povprečna najvišja vrednost relativne svetlobne enote (RLU) za referenčni standard E2 deli s povprečno vrednostjo RLU za kontrolo z DMSO. Običajno je doseženo petkratno razmerje indukcije, vendar mora biti za namene sprejemljivosti razmerje indukcije najmanj štirikratno.
- Rezultati kontrole z DMSO: vrednosti RLU za kontrolo s topilom morajo biti znotraj 2,5-kratnika standardnega odklona od srednje vrednosti RLU za kontrolo s topilom iz preteklih preskusov.
- Poskus, ki ne izpolnjuje katerega od meril za sprejemljivost, je treba zavreči in ponoviti.

#### Celovit preskus

Vključuje merila za sprejemljivost iz preskusa za določanje območja z agonistom in naslednje:

- rezultate referenčnih standardov: krivulja odziva na koncentracijo za referenčni standard E2 mora imeti sigmoidno obliko in vsaj tri vrednosti znotraj linearnega dela krivulje odziva na koncentracijo;
- rezultate pozitivne kontrole: vrednosti RLU za kontrolo z metoksiklorom morajo biti višje od srednje vrednosti za DMSO, ki se ji prišteje trikratnik standardnega odklona od srednje vrednosti za DMSO;
- poskus, ki ne izpolnjuje katerega koli od meril za sprejemljivost, je treba zavreči in ponoviti.

### *Preskus z antagonistom*

#### Preskus za določanje območja

- Redukcija: redukcijo plošče se izmeri tako, da se povprečna najvišja vrednost RLU za referenčni standard Ral/E2 deli s povprečno vrednostjo RLU za kontrolo z DMSO. Običajno je doseženo petkratno razmerje redukcije, vendar mora biti za namene sprejemljivosti razmerje redukcije najmanj trikratno.
- Rezultati kontrole z E2: vrednosti RLU za kontrolo z E2 morajo biti znotraj 2,5-kratnika standardnega odklona od srednje vrednosti RLU za kontrolo z E2 iz preteklih preskusov.
- Rezultati kontrole z DMSO: vrednosti RLU za kontrolo z DMSO morajo biti znotraj 2,5-kratnika standardnega odklona od srednje vrednosti RLU za kontrolo s topilom iz preteklih preskusov.
- Poskus, ki ne izpolnjuje katerega koli od meril za sprejemljivost, je treba zavreči in ponoviti.

#### Celovit preskus

Vključuje merila za sprejemljivost iz preskusa za določanje območja z antagonistom in naslednje:

- rezultate referenčnih standardov: krivulja odziva na koncentracijo za referenčni standard Ral/E2 mora imeti sigmoidno obliko in vsaj tri vrednosti znotraj linearnega dela krivulje odziva na koncentracijo;
- rezultate pozitivne kontrole: vrednosti RLU za kontrolo s tamoksifenom/E2 morajo biti nižje od srednje vrednosti za kontrolo z E2, od katere se odšteje trikratnik standardnega odklona od srednje vrednosti za kontrolo z E2;
- poskus, ki ne izpolnjuje katerega koli od meril za sprejemljivost, je treba zavreči in ponoviti.

### **Referenčni standardi, pozitivna kontrola in kontrola z vehiklom**

#### *Kontrola z vehiklom (preskusi z agonistom in antagonistom)*

12. Vehikel, v katerem se raztopi preskusna kemikalija, je treba preskusiti kot kontrolo z vehiklom. Vehikel, ki je bil uporabljen med validacijo preskusa VM7Luc ER TA, je bil 1 vol. % dimetilsulfoksida (DMSO, št. CAS 67-68-5) (glej odstavek 24). Če se uporabi drug vehikel, ne DMSO, je treba vse referenčne standarde, kontrole in preskusne kemikalije preskusiti v istem vehiklu, če je ustrezno.

#### *Referenčni standard (določanje območja z agonistom)*

13. Referenčni standard je E2 (št. CAS 50-28-2). Pri preskušanju za določanje območja referenčni standard sestavlja zaporedno redčenje štirih koncentracij E2 ( $1,84 \times 10^{-10}$ ,  $4,59 \times 10^{-11}$ ,  $1,15 \times 10^{-11}$  in  $2,87 \times 10^{-12}$  M), pri čemer se vsaka koncentracija preskusi v po dveh jamicah.

#### *Referenčni standard (celovit preskus z agonistom)*

14. E2 za celovito preskušanje sestavlja zaporedno redčenje v razmerju 1 : 2, ki vključuje 11 koncentracij (od  $3,67 \times 10^{-10}$  do  $3,59 \times 10^{-13}$  M) E2 v po dveh jamicah.

#### *Referenčni standard (določanje območja z antagonistom)*

15. Referenčni standard je kombinacija Ral (št. CAS 84449-90-1) in E2 (št. CAS 50-28-2). Ral/E2 pri preskušanju za določanje območja obsega zaporedno redčenje treh koncentracij Ral ( $3,06 \times 10^{-9}$ ,  $7,67 \times 10^{-10}$  in  $1,92 \times 10^{-10}$  M) in fiksno koncentracijo ( $9,18 \times 10^{-11}$  M) E2 v po dveh jamicah.

#### *Referenčni standard (celovit preskus z antagonistom)*

16. Ral/E2 za celovito preskušanje obsega zaporedno redčenje Ral v razmerju 1 : 2 (od  $2,45 \times 10^{-8}$  do  $9,57 \times 10^{-11}$  M) in fiksno koncentracijo ( $9,18 \times 10^{-11}$  M) E2, ki jo sestavlja devet koncentracij Ral/E2 v po dveh jamicah.

#### *Šibka pozitivna kontrola (z agonistom)*

17. Šibka pozitivna kontrola je  $9,06 \times 10^{-6}$  M *p,p'*-metoksiklora (metoksiklor; št. CAS 72-43-5) v EFM.

*Šibka pozitivna kontrola (z antagonistom)*

18. Šibko pozitivno kontrolo sestavlja tamoksifen (št. CAS 10540-29-1)  $3,36 \times 10^{-6}$  M z  $9,18 \times 10^{-11}$  M E2 v EFM.

*Kontrola z E2 (samo preskus z antagonistom)*

19. Kontrola z E2 je  $9,18 \times 10^{-11}$  M E2 v EFM in se uporablja kot osnovna negativna kontrola.

*Razmerje indukcije (z agonistom)*

20. Indukcija luciferazne aktivnosti referenčnega standarda (E2) se izmeri tako, da se povprečna najvišja vrednost RLU za referenčni standard E2 deli s povprečno vrednostjo RLU za kontrolo z DMSO, pri čemer mora biti rezultat večji od štirikratnega razmerja.

*Razmerje redukcije (z antagonistom)*

21. Srednja luciferazna aktivnost referenčnega standarda (Ral/E2) se izmeri tako, da se povprečna najvišja vrednost RLU za referenčni standard Ral/E2 deli s povprečno vrednostjo RLU za kontrolo z DMSO in mora biti večja od trikratnega razmerja.

*Dokazovanje usposobljenosti laboratorija (glej odstavek 14 ter preglednici 3 in 4 v oddelku 'ELEMENTI PRESKUSA ER TA' te preskusne metode)*

## **Vehikel**

22. Preskusne kemikalije je treba raztopiti v topilu, v katerem je topna zadevna preskusna kemikalija in ki se meša s celičnim gojiščem. Primerni vehikli so voda, etanol (od 95- do 100-odstotna čistost) in DMSO. Če se uporabi DMSO, raven ne sme preseči 1 vol. %. Za vsak vehikel je treba dokazati, da največja uporabljena količina ni citotoksična in ne moti učinkovitosti preskusa. Referenčni standardi in kontrole se raztopijo v 100-odstotnem topilu in nato razredčijo na ustrezne koncentracije v EFM.

## **Priprava preskusnih kemikalij**

23. Preskusne kemikalije se raztopijo v 100-odstotnem DMSO (ali ustreznem topilu) in nato razredčijo na ustrezne koncentracije v EFM. Vse preskusne kemikalije je treba pustiti, da se uravnovežijo na sobno temperaturo, preden se raztopijo in razredčijo. Za vsak preskus je treba pripraviti sveže raztopine preskusnih kemikalij. Raztopine ne smejo imeti vidne oborine ali motnosti. Zaloge referenčnih standardov in kontrol se lahko pripravijo v večjih količinah; vendar je treba za vsak poskus pripraviti sveže končne referenčne standarde, kontrolne razredčine in preskusne kemikalije ter jih porabiti v 24 urah po pripravi.

## **Topnost in citotoksičnost: preudarki glede določanja območja**

24. Preskušanje za določanje območja sestavljajo sedemtočkovne zaporedne razredčine v razmerju 1 : 10, izvedene v dveh ponovitvah. Preskusne kemikalije se najprej preskusijo do največje koncentracije 1 mg/ml (~ 1 mM) za preskušanje z agonistom in 20 µg/ml (~ 10 µM) za preskušanje z antagonistom. S poskusi za določanje območja se določi naslednje:
- začetne koncentracije preskusnih kemikalij, ki jih je treba uporabiti pri celovitem preskušanju;
  - razredčine preskusnih kemikalij (1 : 2 ali 1 : 5), ki jih je treba uporabiti pri celovitem preskušanju.
25. Ocena viabilnosti/citotoksičnosti celic je vključena v protokole preskusov z agonistom in antagonistom (7) ter je del preskušanja za določanje območja in celovitega preskušanja. Metoda citotoksičnosti, ki je bila uporabljena za oceno viabilnosti celic med validacijo VM7Luc ER TA (1), je bila postopna kvalitativna metoda vizualnega opazovanja; uporabi pa se lahko tudi kvantitativna metoda za ugotavljanje citotoksičnosti (glej protokol (7)). Podatkov iz koncentracij preskusnih kemikalij, ki povzročijo več kot 20-odstotno zmanjšanje viabilnosti, ni mogoče uporabiti.

#### **Izpostavitev preskusni kemikaliji in razporeditev na preskusni plošči**

26. Celice se preštejejo in nasadijo na 96-jamične plošče s tkivno kulturo ( $2 \times 10^5$  celic na jamico) v EFM ter 24 ur inkubirajo, da se lahko celice pritrldijo na ploščo. EFM se odstrani, nadomesti s preskusno in referenčno kemikalijo v EFM ter 19–24 ur inkubira. Posebni preudarki so potrebni pri snoveh, ki so zelo hlapne, saj lahko kontrolne jamice v bližini povzročijo lažno pozitivne rezultate. V takih primerih je mogoče s ‚tesnili‘ za plošče med preskušanjem učinkovito izolirati posamezne jamice, zato je njihova uporaba priporočljiva.

#### *Preskusi za določanje območja*

27. Pri preskušanju za določanje območja se uporabijo vse jamice na 96-jamični plošči, da se preskusi do šest preskusnih kemikalij, in sicer kot sedemtočkovne zaporedne razredčine v razmerju 1 : 10 v dveh ponovitvah (glej sliki 1 in 2).
- Pri preskušanju za določanje območja z *agonistom* se uporabijo štiri koncentracije E2 v dveh ponovitvah kot referenčni standard in štiri jamice s ponovljenimi vzorci za kontrolo z DMSO.
  - Pri preskušanju za določanje območja z *antagonistom* se uporabijo tri koncentracije Ral/E2 z  $9,18 \times 10^{-11}$  M v dveh ponovitvah kot referenčni standard in tri jamice s ponovljenimi vzorci za kontrole z E2 in DMSO.

**Slika 1: Razporeditev na 96-jamični plošči pri preskusu za določanje območja z agonistom**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
<b>B</b>	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
<b>C</b>	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
<b>D</b>	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
<b>E</b>	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
<b>F</b>	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
<b>G</b>	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
<b>H</b>	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Kratice: od E2-1 do E2-4 = koncentracije referenčnega standarda E2 (od visoke do nizke); od TC1-1 do TC1-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 1 (TC1); od TC2-1 do TC2-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 2 (TC2); od TC3-1 do TC3-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 3 (TC3); od TC4-1 do TC4-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 4 (TC4); od TC5-1 do TC5-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 5 (TC5); od TC6-1 do TC6-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 6 (TC6); VC = kontrola z vehiklom (DMSO (1 vol. % EFM)).

**Slika 2: Razporeditev na 96-jamični plošči pri preskusu za določanje območja z antagonistom**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
<b>B</b>	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
<b>C</b>	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
<b>D</b>	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
<b>E</b>	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
<b>F</b>	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
<b>G</b>	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
<b>H</b>	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Kratice: E2 = kontrola z E2; od Ral-1 do Ral-3 = koncentracije referenčnega standarda raloksifena/E2 (od visoke do nizke); od TC1-1 do TC1-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 1 (TC1); od TC2-1 do TC2-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 2 (TC2); od TC3-1 do TC3-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 3 (TC3); od TC4-1 do TC4-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 4 (TC4); od TC5-1 do TC5-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 5 (TC5); od TC6-1 do TC6-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 6 (TC6); VC = kontrola z vehiklom (DMSO (1 vol. % EFM)).

Opomba: vse preskusne kemikalije se preskusijo v prisotnosti  $9,18 \times 10^{-11}$  M E2.

28. Priporočena končna količina gojišča, potrebna za vsako jamico, je 200  $\mu$ l. Uporabljajte samo preskusne plošče, pri katerih je viabilnost celic v vseh jamicah vsaj 80-odstotna.

29. Določitev začetnih koncentracij za celovito preskušanje z **agonistom** je podrobno opisana v protokolu za preskus z agonistom (7). Na kratko, uporabijo se naslednja merila:

- če na krivulji koncentracije preskusne kemikalije ni točk nad srednjo vrednostjo, ki se ji prišteje trikratnik standardnega odklona kontrole z DMSO, se celovito preskušanje izvede z 11-točkovnim zaporednim redčenjem v razmerju 1 : 2, ki se začne pri najvišji topni koncentraciji;
- če so na krivulji koncentracije preskusne kemikalije točke nad srednjo vrednostjo, ki se ji prišteje trikratnik standardnega odklona kontrole z DMSO, mora biti začetna koncentracija, ki se uporabi za 11-točkovno shemo redčenja pri celovitem preskušanju, za en logaritem višja od koncentracije, pri kateri se dobi najvišja prilagojena vrednost RLU pri določanju območja. 11-točkovna shema redčenja temelji na razredčinah v razmerju 1 : 2 ali 1 : 5 v skladu z naslednjimi merili:

11-točkovno zaporedno redčenje v razmerju 1 : 2 je treba uporabiti, če dobljeno območje koncentracije zajema celoten razpon odzivov na podlagi krivulje odziva na koncentracijo, dobljene pri preskusu za določanje območja. V nasprotnem primeru uporabite redčenje v razmerju 1 : 5;

- če ima preskusna kemikalija bifazno krivuljo odziva na koncentracijo pri preskusu za določanje območja, je treba obe fazi obravnavati tudi pri celovitem preskušanju.

30. Določitev začetnih koncentracij za celovito preskušanje z **antagonistom** je podrobno opisana v protokolu za preskus z antagonistom (7). Na kratko, uporabijo se naslednja merila:

- če na krivulji koncentracije preskusne kemikalije ni točk pod srednjo vrednostjo, od katere se odšteje trikratnik standardnega odklona kontrole z E2, se celovito preskušanje izvede z 11-točkovnim zaporednim redčenjem v razmerju 1 : 2, ki se začne pri najvišji topni koncentraciji;
- če so na krivulji koncentracije preskusne kemikalije točke pod srednjo vrednostjo, od katere se odšteje trikratnik standardnega odklona kontrole z E2, mora biti začetna koncentracija, ki se uporabi za 11-točkovno shemo redčenja pri celovitem preskušanju, ena od naslednjih:
  - koncentracija, s katero se dobi najnižja prilagojena vrednost RLU pri določanju območja;
  - najvišja topna koncentracija (glej protokol za preskus z antagonistom (7), slika 14-2);
  - najnižja citotoksična koncentracija (za podoben primer glej protokol za preskus z antagonistom (7), slika 14-3);
- 11-točkovna shema redčenja temelji na zaporednem redčenju v razmerju 1 : 2 ali 1 : 5 v skladu z naslednjimi merili:

11-točkovno zaporedno redčenje v razmerju 1 : 2 je treba uporabiti, če dobljeno območje koncentracije zajema celoten razpon odzivov na podlagi krivulje odziva na koncentracijo, dobljene pri preskusu za določanje območja. V nasprotnem primeru je treba uporabiti redčenje v razmerju 1 : 5.

#### *Celoviti preskusi*

31. Celovito preskušanje sestavljajo 11-točkovne zaporedne razredčine (zaporedne razredčine v razmerju 1 : 2 ali 1 : 5, odvisno od začetne koncentracije pri merilih za celovito preskušanje), pri čemer se vsaka koncentracija preskusi v treh jamicah na 96-jamični plošči (glej sliki 3 in 4).
- Pri preskušanju z *agonistom* se kot referenčni standard uporabi 11 koncentracij E2 v dveh ponovitvah. Na vsako ploščo se vključijo štiri jamice s ponovljenim vzorcem za kontrolo z DMSO in štiri jamice s ponovljenim vzorcem za kontrolo z metoksiklorom ( $9,06 \times 10^{-6}$  M).
  - Pri celovitem preskušanju z *antagonistom* se kot referenčni standard uporabi devet koncentracij Ral/E2 z  $9,18 \times 10^{-11}$  M E2 v dveh ponovitvah skupaj s štirimi jamicami s ponovljenim vzorcem za kontrolo z E2  $9,18 \times 10^{-11}$  M, štirimi jamicami s ponovljenim vzorcem za kontrolo z DMSO in štirimi jamicami s ponovljenim vzorcem za tamoksifen  $3,36 \times 10^{-6}$  M.

**Slika 3: Razporeditev na 96-jamični plošči pri celovitem preskusu z agonistom**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
<b>B</b>	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
<b>C</b>	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
<b>D</b>	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
<b>E</b>	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Met
<b>F</b>	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Met
<b>G</b>	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Met
<b>H</b>	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Met

Kratice: od TC1-1 do TC1-11 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 1; od TC2-1 do TC2-11 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 2; od E2-1 do E2-11 = koncentracije referenčnega standarda E2 (od visoke do nizke); met = šibka pozitivna kontrola s p,p' metoksiklorom; VC = kontrola z vehiklom DMSO (1 vol. %) EFM.

**Slika 4: Razporeditev na 96-jamični plošči pri celovitem preskusu z antagonistom**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
<b>B</b>	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
<b>C</b>	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
<b>D</b>	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
<b>E</b>	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
<b>F</b>	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
<b>G</b>	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
<b>H</b>	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Kratice: E2 = kontrola z E2; od Ral-1 do Ral-9 = koncentracije referenčnega standarda raloksifena/E2 (od visoke do nizke); tam = šibka pozitivna kontrola s tamoksifenom/E2; od TC1-1 do TC1-11 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 1 (TC1); od TC2-1 do TC2-11 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 2 (TC2); VC = kontrola z vehiklom (DMSO (1 vol. % EFM)).

Opomba: kot je bilo navedeno, vse referenčne in preskusne jamice vsebujejo fiksno koncentracijo E2 ( $9,18 \times 10^{-11}$  M).

32. Ponovljene celovite preskuse za isto kemikalijo je treba izvesti na različne dneve, da se zagotovi neodvisnost. Izvesti je treba vsaj dva celovita preskusa. Če si rezultati preskusov nasprotujejo (npr. en preskus je pozitiven, drugi negativen) ali če je eden od preskusov neustrezen, je treba izvesti dodatni tretji preskus.

## Merjenje luminiscence

33. Luminiscenca se meri v razponu od 300 do 650 nm z uporabo luminometra za injiciranje in programske opreme, s katero se uravnava injekcijski volumen in interval merjenja (7). Oddajanje svetlobe iz vsake jamice se izrazi kot RLU na jamico.

## ANALIZA PODATKOV

### Določanje EC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>

34. Vrednosti EC<sub>50</sub> (srednja efektivna koncentracija preskusne kemikalije (agonisti)) in IC<sub>50</sub> (srednja inhibicijska koncentracija preskusne kemikalije (antagonisti)) se določita na podlagi podatkov o odzivu na koncentracijo. Za preskusne kemikalije, ki so pozitivne pri eni ali več koncentracijah, se koncentracija preskusne kemikalije, ki povzroči srednji odziv (IC<sub>50</sub> ali EC<sub>50</sub>), izračuna z analizo Hillove funkcije ali ustrezno alternativo. Hillova funkcija je štiriparametrski logistični matematični model, pri katerem se koncentracija preskusne kemikalije poveže z odzivom (običajno s sigmoidno krivuljo), tako da se uporabi spodnja enačba:

$$Y = \text{dno} + \frac{(\text{vrh} - \text{dno})}{1 + 10^{(\lg EC_{50} - X) \text{Hillov naklon}}}$$

pri čemer je:

Y = odziv (tj. RLU);

X = logaritem koncentracije;

dno = najmanjši odziv;

vrh = največji odziv;

lg EC<sub>50</sub> (ali lg IC<sub>50</sub>) = logaritem X kot odzivni razpon na sredini med vrhom in dnom;

Hillov naklon = strmina krivulje.

Z modelom se izračuna najboljše ujemanje za vrh in dno, Hillov naklon ter parametra IC<sub>50</sub> in EC<sub>50</sub>. Za izračun vrednosti EC<sub>50</sub> in IC<sub>50</sub> je treba uporabiti ustrezno statistično programsko opremo (npr. Graphpad Prism<sup>R</sup>).

### Določanje osamelcev

35. Dobra statistična presoja bi se lahko olajšala z vključitvijo (med drugim) Q-testa (glej protokola za preskuse z agonistom in antagonistom (7)) za določitev ‚neuporabnih‘ jamic, ki se izključijo iz podatkovne analize.
36. Za ponovljene vzorce referenčnega standarda E2 (velikost vzorca je dva) se vsaka prilagojena vrednost RLU za ponovljeni vzorec pri dani koncentraciji E2 šteje za osamelec, če je njegova vrednost v zbirki podatkov iz preteklih preskusov za več kot 20 % nad prilagojeno vrednostjo RLU za zadevno koncentracijo ali več kot 20 % pod njo.

### Zbiranje in prilagoditev podatkov luminometra za preskušanje za določanje območja

37. Neobdelane podatke iz luminometra je treba prenesti na predlogo preglednice, zasnovano za preskus. Ugotoviti je treba, ali obstajajo podatkovne točke osamelcev, ki jih je treba odstraniti. (Za parametre, ki se določijo pri analizi, glej merila za sprejemljivost preskusa.) Opraviti je treba v nadaljevanju navedene izračune.

#### *Agonist*

1. korak Izračunajte srednjo vrednost za kontrolo z vehiklom (VC) DMSO.
2. korak Srednjo vrednost kontrole z vehiklom DMSO odštejte od vrednosti za posamezno jamico, da normalizirate podatke.
3. korak Izračunajte srednjo vrednost razmerja indukcije za referenčni standard (E2).
4. korak Izračunajte srednjo vrednost  $EC_{50}$  za preskusne kemikalije.

#### *Antagonist*

1. korak Izračunajte srednjo vrednost za kontrolo z vehiklom DMSO.
2. korak Srednjo vrednost kontrole z vehiklom DMSO odštejte od vrednosti za posamezno jamico, da normalizirate podatke.
3. korak Izračunajte srednje razmerje indukcije za referenčni standard (Ral/E2).
4. korak Izračunajte srednjo vrednost za referenčni standard E2.
5. korak Izračunajte srednjo vrednost  $IC_{50}$  za preskusne kemikalije.

### **Zbiranje in prilagoditev podatkov luminometra za celovito preskušanje**

38. Neobdelane podatke iz luminometra je treba prenesti na predlogo preglednice, zasnovano za preskus. Ugotoviti je treba, ali obstajajo podatkovne točke osamelcev, ki jih je treba odstraniti. (Za parametre, ki se določijo pri analizi, glej merila za sprejemljivost preskusa.) Opravijo se v nadaljevanju navedeni izračuni.

#### *Agonist*

1. korak Izračunajte srednjo vrednost za kontrolo z vehiklom DMSO.
2. korak Srednjo vrednost kontrole z vehiklom DMSO odštejte od vrednosti za posamezno jamico, da normalizirate podatke.
3. korak Izračunajte srednjo vrednost razmerja indukcije za referenčni standard (E2).
4. korak Izračunajte srednjo vrednost  $EC_{50}$  za E2 in preskusne kemikalije.
5. korak Izračunajte prilagojeno srednjo vrednost RLU za metoksiklor.

#### *Antagonist*

1. korak Izračunajte srednjo vrednost za kontrolo z vehiklom DMSO.
2. korak Srednjo vrednost kontrole z vehiklom DMSO odštejte od vrednosti za posamezno jamico, da normalizirate podatke.
3. korak Izračunajte srednjo vrednost razmerja indukcije za referenčni standard (Ral/E2).
4. korak Izračunajte srednjo vrednost  $IC_{50}$  za Ral/E2 in preskusne kemikalije.
5. korak Izračunajte prilagojeno srednjo vrednost RLU za tamoksifen.

6. korak Izračunajte srednjo vrednost za referenčni standard E2.

### Merila za razlago rezultatov

39. VM7Luc ER TA naj bi se uporabil v okviru pristopa, ki temelji na zanesljivosti dokazov, za pomoč pri prednostnem razvrščanju snovi za preskušanje endokrinih motilcev *in vivo*. Del tega postopka prednostnega razvrščanja je razvrstitev preskusne kemikalije kot pozitivne ali negativne za delovanje agonista ali antagonista ER. Merila za pozitivno ali negativno odločitev, ki se uporabljajo v validacijski študiji VM7Luc ER TA, so opisana v preglednici 1.

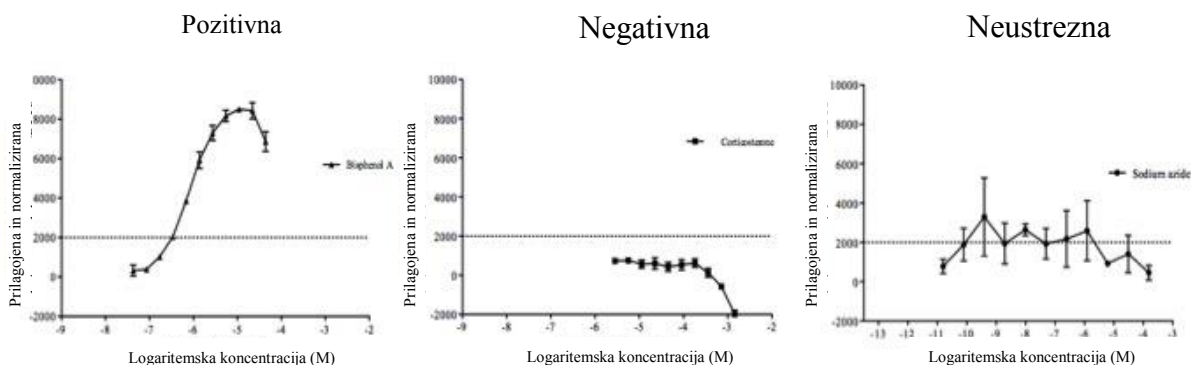
**Preglednica 1:** Merila za pozitivno ali negativno odločitev

<b>AGONISTIČNO DELOVANJE</b>	
<b>Pozitivna</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vse preskusne kemikalije, ki so razvrščene kot <i>pozitivne za</i> agonistično delovanje ER, morajo imeti krivuljo odziva na koncentracijo, ki jo sestavlja bazna linija, sledi ji pozitiven naklon, konča pa se s konstantno ravnjo ali vrhom. V nekaterih primerih se lahko opredelita samo dve od teh značilnosti (bazna linija in naklon ali naklon in vrh).</li> <li>- Linija, ki določa pozitiven naklon, mora vsebovati vsaj tri točke z vrsticami napak, ki se ne prekrivajo (srednja vrednost <math>\pm</math> standardni odklon). Točke, ki sestavljajo bazno linijo, so izključene, lahko pa linearni del krivulje vključuje vrh ali prvo točko konstantne ravni.</li> <li>- Za pozitivno razvrstitev je potrebna amplituda odziva, tj. razlika med bazno linijo in vrhom, ki znaša vsaj 20 % najvišje vrednosti za referenčni standard E2 (tj. 2 000 RLU ali več, ko je najvišja vrednost odziva referenčnih standardov [E2] prilagojena na 10 000 RLU).</li> <li>- Če je mogoče, je treba vrednost EC<sub>50</sub> izračunati za vsako pozitivno preskusno kemikalijo.</li> </ul>
<b>Negativna</b>	Povprečna prilagojena RLU za dano koncentracijo je največ enaka srednji vrednosti RLU za kontrolo z DMSO, ki se ji prišteje trikratnik standardnega odklona RLU za DMSO.
<b>Neustrezna</b>	Podatki, ki jih ni mogoče razlagati kot veljavne, ker kažejo bodisi prisotnost ali odsotnost delovanja zaradi večjih kvalitativnih ali kvantitativnih omejitev, se štejejo za neustrezne in jih ni mogoče uporabiti za določitev, ali je preskusna kemikalija pozitivna ali negativna. Kemikalije je treba znova preskusiti.
<b>ANTAGONISTIČNO DELOVANJE</b>	

<b>Pozitivna</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Podatki o preskusni kemikaliji dajejo krivuljo odziva na koncentracijo, ki jo sestavlja bazna linija, tej pa sledi negativni naklon.</li> <li>- Linija, ki določa negativni naklon, mora vsebovati vsaj tri točke z vrsticami napak, ki se ne prekrivajo; točke, ki sestavljajo bazno linijo, so izključene, lahko pa linearni del krivulje vključuje prvo točko konstantne ravni.</li> <li>- Delovanje se mora zmanjšati vsaj za 20 % glede na najvišjo vrednost za referenčni standard Ral/E2 (tj. 8 000 RLU ali manj, ko je najvišja vrednost odziva referenčnega standarda [Ral/E2] prilagojena na 10 000 RLU).</li> <li>- Najvišje necitotoksične koncentracije preskusne kemikalije lahko znašajo največ <math>1 \times 10^{-5}</math> M.</li> <li>- Če je mogoče, je treba vrednost <math>IC_{50}</math> izračunati za vsako pozitivno preskusno kemikalijo.</li> </ul>
<b>Negativna</b>	Pri koncentracijah, nižjih od $1,0 \times 10^{-5}$ M, so vse podatkovne točke nad vrednostjo $ED_{80}$ (80 % odziva E2 ali 8 000 RLU).
<b>Neustrezna</b>	Podatki, ki jih ni mogoče razlagati kot veljavne, ker kažejo bodisi prisotnost ali odsotnost delovanja zaradi večjih kvalitativnih ali kvantitativnih omejitev, se štejejo za neustrezne in jih ni mogoče uporabiti za določitev, ali je preskusna kemikalija pozitivna ali negativna. Kemikalijo je treba znova preskusiti.

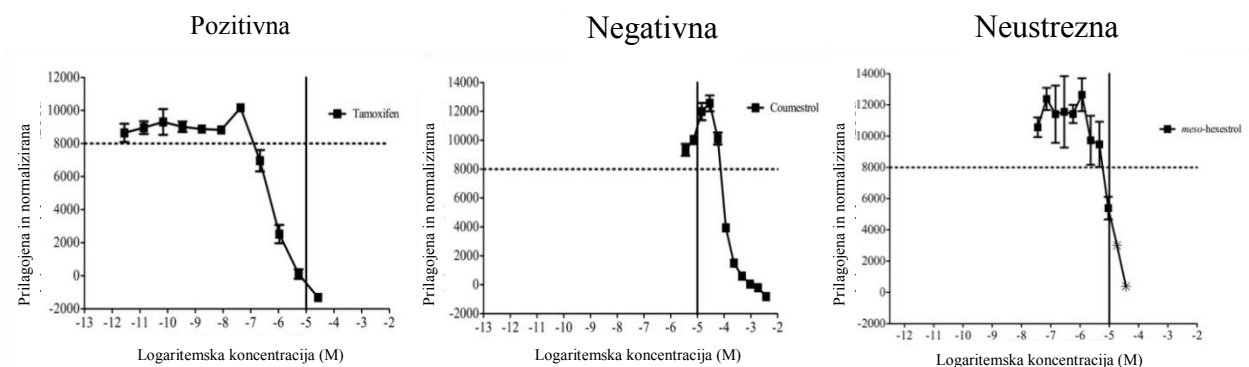
40. Za pozitivne rezultate sta značilni velikost učinka in koncentracija, pri kateri se pojavi učinek, če je mogoče. Primeri pozitivnih, negativnih in neustreznih podatkov so prikazani na slikah 5 in 6.

**Slika 5: Primeri agonistov: pozitivni, negativni in neustrezni podatki**



Črtna črta ponazarja 20 % odziva E2, 2 000 prilagojenih in normaliziranih RLU.

**Slika 6: Primeri antagonistov: pozitivni, negativni in neustrezni podatki**



Črtkana črta ponazarja 80 % odziva Ral/E2, 8 000 prilagojenih in normaliziranih RLU.

Neprekinjena črta ponazarja  $1,00 \times 10^{-5}$  M. Da se odziv šteje za pozitiven, mora biti pod črto za 8 000 RLU in pri koncentracijah, nižjih od  $1,00 \times 10^{-5}$  M.

Koncentracije z zvezdico na grafu mezo-heksestrola ponazarjajo rezultate viabilnosti ,2<sup>o</sup> ali več.

Rezultati preskusa za mezo-heksesterol se štejejo za neustrezne podatke, ker se edini odziv, ki je pod 8 000 RLU, pojavi pri  $1,00 \times 10^{-5}$  M.

41. Izračuni  $EC_{50}$  in  $IC_{50}$  se lahko opravijo z uporabo štiriparametrške Hillove funkcije (za več podrobnosti glej protokol za preskus z agonistom in protokol za preskus z antagonistom (7)). Izpolnjevanje meril za sprejemljivost kaže, da sistem deluje pravilno, vendar ne zagotavlja, da bodo pri vsaki posamezni ponovitvi preskusa dobljeni točni podatki. Najboljše zagotovilo, da so bili dobljeni točni podatki, je podvojitvev rezultatov prve ponovitve (glej odstavek 19 ,ELEMENTI PRESKUSA ER TA<sup>o</sup>).

## POROČILO O PRESKUSU

42. Glej odstavek 20 ,ELEMENTI PRESKUSA ER TA<sup>o</sup>.

## VIRI

- (1) ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL<sup>®</sup> ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.
- (2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor  $\alpha$  and  $\beta$  Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, *J. Cell Biochem.*, 82(3): 467-479.
- (3) Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, *Cancer Res.*, 58(23): 5367-5373.
- (4) Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER)  $\beta$ , a Modulator of ER $\alpha$  in the Uterus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(11): 936-5941.
- (5) Balls, M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), *ALTEX*, 23 (Suppl): str. 270-273.
- (6) Coecke, S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *Alternatives to Laboratory Animals*, 33: str. 261-287.
- (7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL<sup>®</sup> ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication št. 11-7850.
- (8) Rogers, J. M., in Denison, M. S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro Mol. Toxicol.*, 13(1): 67-82.
- (9) Escande, A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71(10): 1459-69.
- (10) Thorne, N., Inglese, J., in Auld, D. S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, *Chemistry and Biology*, 17(6): 646-57.

- (11) Kuiper, G. G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinology*, 139(10): 4252–63.
- (12) Geisinger, *et al.* (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, *Cancer* 63, 280–288.
- (13) Baldwin, *et al.* (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, 34, 649–654.
- (14) Li, Y., *et al.* (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, *Mol. Endo.* 28, 2072–2081.
- (15) Rogers, J. M., in Denison, M. S. (2000). Development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro & Molec. Toxicol.* 13, 67–82.

## **DODATEK 4**

### **PRESKUS TRANSKTIKACIJE ČLOVEŠKEGA ESTROGENSKEGA RECEPTORJA-A S STABILNO TRANSFEKCIJO ZA ZAZNAVO ESTROGENSKEGA AGONISTIČNEGA IN ANTAGONISTIČNEGA DELOVANJA KEMIČALIČ Z UPORABO CELIČNE LINIJE ERA CALUX**

#### **ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)**

1. Pri preskusu transaktivacije ER $\alpha$  CALUX se človeška celična linija U2OS uporablja za zaznavo estrogenskega agonističnega in antagonističnega delovanja, povzročene s človeškim estrogenskim receptorjem alfa (hER $\alpha$ ). Validacijska študija biološkega preskusa stabilne transfekcije ER $\alpha$  CALUX, ki jo je opravilo podjetje BioDetection Systems BV (Amsterdam, Nizozemska), je pokazala ustreznost in zanesljivost preskusa za predvideni namen (1). Celična linija ER $\alpha$  CALUX izraža samo stabilno transfecirano človeško ER $\alpha$  (2) (3).
2. Ta preskus je izrecno namenjen zaznavi s hER $\alpha$  povzročene transaktivacije z merjenjem bioluminiscence kot končne točke. Bioluminiscenca se pogosto uporablja pri bioloških preskusih zaradi visokega razmerja signal/šum (4).
3. Za koncentracije fitoestrogena, višje od 1  $\mu$ M, se je poročalo, da preveč aktivirajo luciferazni poročevalski gen, posledica tega pa je nereceptorsko povzročena luminiscenca (5) (6) (7). Zato je treba višje koncentracije fitoestrogenov ali drugih podobnih spojin, ki lahko preveč aktivirajo izražanje luciferaze, pri preskusih transaktivacije ER s stabilno transfekcijo skrbno preučiti (glej Dodatek 2).
4. Pred uporabo tega preskusa za regulativne namene je treba prebrati oddelka ‚SPLOŠNI UVOD‘ in ‚ELEMENTI PRESKUSA ER TA‘. Opredelitve pojmov in kratice, uporabljene pri tej preskusni metodi, so opisane v Dodatku 1.

#### **NAČELO PRESKUSA (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)**

5. Biološki preskus se uporablja za oceno vezave liganda ER in poznejše premestitve kompleksa receptor-ligand na jedro. V jedru se kompleks receptor-ligand veže na specifične odzivne elemente DNK in transaktivira kresničkin luciferazni poročevalski gen, kar povzroči povečano celično izražanje luciferaznega encima. Po dodajanju luciferaznega substrata luciferina se luciferin pretvori v bioluminiscentni produkt. Proizvedeno svetlobo je mogoče zlahka zaznati in kvantificirati z luminometrom.
6. Pri preskusnem sistemu se uporabljajo stabilno transfecirane celice ER $\alpha$  CALUX. Celice ER $\alpha$  CALUX so izvirale iz celične linije človeškega osteoplastičnega osteosarkoma U2OS.

Človeške celice U2OS so bile stabilno transfecirane s 3xHRE-TATA-Luc in pSG5-neo-hER $\alpha$  z uporabo metode koprecipitacije kalcijevega fosfata. Celična linija U2OS je bila izbrana kot najprimernejša za uporabo kot na estrogen (in drug steroidni hormon) odzivna poročevalska celična linija na podlagi opazanja, da je celična linija U2OS pokazala malo ali nič endogenega receptorskega delovanja. Neobstoje endogenih receptorjev je bil ocenjen samo z uporabo plazmidov luciferaznega poročevalskega gena, pri katerih dodajanje receptorskih ligandov ni pokazalo nikakršnega delovanja. Poleg tega je ta celična linija podprla močne s hormoni povzročene odzive, ko so bili prehodno uvedeni sorodni receptorji (2) (3) (8).

7. Preskušanje estrogenskega ali antiestrogenskega delovanja kemikalij z uporabo celične linije ER $\alpha$  CALUX vključuje predhodno presejalno ponovitev in celovite ponovitve. Med predhodno presejalno ponovitvijo se določijo topnost, citotoksičnost in izpopolnjeno območje koncentracije preskusnih kemikalij za celovito preskušanje. Med celovitimi ponovitvami se izpopolnjena območja koncentracije preskusnih kemikalij preskusijo v bioloških preskusih ER $\alpha$  CALUX, ki jim sledi razvrstitev preskusnih kemikalij glede na agonizem ali antagonizem.
8. Merila za razlago podatkov so podrobno opisana v odstavku 59. Na kratko, preskusna kemikalija se šteje za pozitivno za agonizem, če se pri vsaj dveh zaporednih koncentracijah preskusne kemikalije pokaže odziv, ki znaša najmanj 10 % največjega odziva referenčnega standarda 17 $\beta$ -estradiola (PC<sub>10</sub>). Preskusna kemikalija se šteje za pozitivno za antagonizem, če se pri vsaj dveh zaporednih koncentracijah preskusne kemikalije pokaže odziv, ki znaša največ 80 % največjega odziva referenčnega standarda tamoksifena (PC<sub>80</sub>).

## **POSTOPEK**

### **Celične linije**

9. Za preskus je treba uporabiti stabilno transfecirano celično linijo U2OS ER $\alpha$  CALUX. S tehničnim licenčnim sporazumom jo je mogoče dobiti od podjetja BioDetection Systems BV, Amsterdam, Nizozemska.
10. Uporabijo se lahko samo celične kulture brez mikoplazme. Uporabljene serije celic morajo biti bodisi potrjeno negativne za okužbo z mikoplazmo bodisi je treba pred uporabo izvesti test za mikoplazmo. Za občutljivo zaznavo okužbe z mikoplazmo je treba uporabiti RT-PCR (verižna reakcija s polimerazo v realnem času) (9).

### **Stabilnost celične linije**

11. Da se ohranita stabilnost in celovitost celic CALUX, jih je treba hraniti v tekočem dušiku (–80 °C). Po odtajanju celic za začetek gojenja nove kulture je treba celice vsaj dvakrat presaditi na novo gojišče, preden se uporabijo za oceno estrogenskega agonističnega ali

antagonističnega delovanja kemikalij. Za presaditev na novo gojišče se lahko uporabi največ 30 pasaž.

12. Za spremljanje stabilnosti celične linije v daljšem časovnem obdobju je treba preveriti odzivnost sistema preskušanja z agonistom in antagonistom, tako da se oceni EC<sub>50</sub> ali IC<sub>50</sub> referenčnega standarda. Poleg tega je treba spremljati relativno indukcijo vzorca pozitivne kontrole (PC) in vzorca negativne kontrole (NC). Rezultati se morajo ujemati z merili za sprejemljivost biološkega preskusa z agonistom (preglednica 3C) ali antagonistom ER $\alpha$  CALUX (preglednica 4C). Referenčni standardi ter pozitivne in negativne kontrole so navedeni v preglednicah 1 in 2 za agonistični oziroma antagonistični način.

### **Pogoji gojenja celičnih kultur in nasaditve na plošče**

13. Celice U2OS je treba kultivirati v gojišču (medij DMEM/F12 (1 : 1) s fenol rdečim kot indikatorjem pH, ki so mu dodani fetusni serum goveda (7,5 %), neesencialne aminokisljine (1 %), 10 enot/ml penicilina, streptomicina in geneticina (G-418) kot selektivni označevalec). Celice je treba namestiti v inkubator s CO<sub>2</sub> (5 % CO<sub>2</sub>) pri 37 °C in 100-odstotni vlažnosti. Ko celice dosežejo 85–95-odstotno konfluenco, jih je treba kultivirati v novem gojišču ali pripraviti za nasaditev na 96-jamične mikrotitrne plošče. V zadnjenavedenem primeru je treba celice resuspendirati pri 1 x 10<sup>5</sup> celic/ml v preskusnem mediju brez estrogena (medij DMEM/F12 (1 : 1) brez fenol rdečega, ki so mu dodani fetusni serum goveda, tretiran z ogljem, prevlečenim z dekstranom (5 vol. %), neesencialne aminokisljine (1 vol. %) ter 10 enot/ml penicilina in streptomicina) in jih nasaditi na 96-jamične mikrotitrne plošče (100  $\mu$ l homogenizirane celične suspenzije). Celice je treba 24 ur pred izpostavitvijo namestiti v inkubator s CO<sub>2</sub> (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C in 100-odstotna vlažnost). Plastična oprema mora biti brez estrogena.

### **Merila za sprejemljivost**

14. Agonistično in antagonistično delovanje preskusnih kemikalij se preskusita v preskusnih serijah. Preskusno serijo sestavlja največ 6 mikrotitrskih plošč. Vsaka preskusna serija vsebuje vsaj eno celotno serijo razredčin referenčnega standarda, pozitivni kontrolni vzorec, negativni kontrolni vzorec in kontrolo s topilom. Na slikah 1 in 2 je prikazana priprava plošče za serijo agonističnih in antagonističnih preskusov.
15. Vsako razredčino referenčnih standardov, preskusnih kemikalij, vseh kontrol s topilom ter pozitivnih in negativnih kontrol je treba analizirati v treh ponovitvah. Vsaka analiza treh ponovitev mora izpolnjevati zahteve iz preglednic 3A in 4A.
16. Celotna serija razredčin referenčnega standarda (17 $\beta$ -estradiola za agonizem; tamoksifen za antagonizem) se pri vsaki preskusni seriji meri na prvi plošči. Da se omogoči primerjava rezultatov analize preostalih 5 mikrotitrskih plošč s prvo mikrotitrsko ploščo, ki vsebuje celotno krivuljo odziva na koncentracijo za referenčni standard, morajo vse plošče vsebovati

3 kontrolne vzorce: kontrolo s topilom, najvišjo preskušeno koncentracijo referenčnega standarda in približno koncentracijo EC<sub>50</sub> (agonizem) ali IC<sub>50</sub> (antagonizem) referenčnega standarda. Delež povprečnih kontrolnih vzorcev na prvi plošči in preostalih 5 ploščah mora izpolnjevati zahteve, kot so navedene v preglednici 3C (agonizem) ali preglednici 4C (antagonizem).

17. Za vsako od mikrotitrskih plošč v preskusni seriji se izračuna z-faktor (10). Z-faktor je treba izračunati z uporabo odzivov pri najvišji in najnižji koncentraciji referenčnega standarda. Mikrotitrska plošča se šteje za veljavno, če izpolnjuje zahteve, kot so navedene v preglednici 3C (agonizem) ali preglednici 4C (antagonizem).
18. Referenčni standard mora prikazovati sigmoidno krivuljo odziva na odmere. EC<sub>50</sub> ali IC<sub>50</sub>, izpeljan iz odziva serije razredčin referenčnega standarda, mora izpolnjevati zahteve, kot so navedene v preglednici 3C (agonizem) ali preglednici 4C (antagonizem).
19. Vsaka preskusna serija mora vsebovati pozitiven in negativen kontrolni vzorec. Izračunana relativna indukcija pozitivnega in negativnega kontrolnega vzorca mora izpolnjevati zahteve, kot so navedene v preglednici 3C (agonizem) ali preglednici 4C (antagonizem).
20. Med vsemi meritvami je treba indukcijski faktor najvišje koncentracije referenčnega standarda meriti tako, da se povprečni največji odziv relativne svetlobne enote (RLU) referenčnega standarda 17β-estradiola deli s povprečnim odzivom RLU referenčne kontrole s topilom. Ta indukcijski faktor mora izpolnjevati minimalne zahteve za razmerje indukcije, kot so navedene v preglednici 3C (agonizem) ali preglednici 4C (antagonizem).
21. Samo mikrotitrskie plošče, ki izpolnjujejo vsa zgoraj navedena merila za sprejemljivost, se lahko štejejo za veljavne in se lahko uporabijo za oceno odziva preskusnih kemikalij.
22. Merila za sprejemljivost se uporabljajo za predhodne presejalne in celovite ponovitve.

**Preglednica 1:** Koncentracije referenčnega standarda, pozitivne kontrole (PC) in negativne kontrole (NC) za agonistični biološki preskus CALUX

	<b>Snov</b>	<b>Št. CAS</b>	<b>Razpon preskusa (M)</b>
Referenčni standard	17β-estradiol	50-28-2	od 1,0 * 10 <sup>-13</sup> do 1,0 * 10 <sup>-10</sup>
Pozitivna kontrola (PC)	17α-metiltestosteron	58-18-4	3,0 * 10 <sup>-6</sup>
Negativna kontrola (NC)	kortikosteron	50-22-6	1,0 * 10 <sup>-8</sup>

**Preglednica 2:** Koncentracije referenčnega standarda, pozitivne kontrole (PC) in negativne kontrole (NC) za antagonistični biološki preskus CALUX

	<b>Snov</b>	<b>Št. CAS</b>	<b>Razpon preskusa (M)</b>
Referenčni standard	tamoksifen	10540-29-1	od $3,0 * 10^{-9}$ do $1,0 * 10^{-5}$
Pozitivna kontrola (PC)	4-hidroksitamoksifen	68047-06-3	$1,0 * 10^{-9}$
Negativna kontrola (NC)	resveratrol	501-36-0	$1,0 * 10^{-5}$

**Preglednica 3:** Merila za sprejemljivost agonističnega biološkega preskusa ER $\alpha$  CALUX

<b>A – posamezni vzorci na plošči</b>		<b>Merilo</b>
1	Največji delež SO treh jamic (za negativno kontrolo, pozitivno kontrolo, vsako razredčino preskusne kemikalije in referenčnega standarda, razen	< 15 %
2	Največji delež SO treh jamic (za referenčni standard in kontrole preskusne kemikalije s topilom (C0, kontrola s topilom))	< 30 %
3	Največje uhajanje LDH kot merilo citotoksičnosti	< 120 %
<b>B – na posamezni mikrotitrski plošči</b>		
4	Razmerje med kontrolo referenčnega standarda s topilom (C0; plošča 1) in kontrolo preskusne kemikalije s topilom (kontrola s topilom; plošče 2	od 0,5 do 2,0
5	Razmerje med pribl. EC50 in najvišjimi koncentracijami referenčnega standarda na plošči 1 ter pribl. EC50 in najvišjimi koncentracijami referenčnega standarda na ploščah 2 do x (C4, C8)	od 0,70 do 1,30
6	Z-faktor za vsako ploščo	> 0,6
<b>C – v posamezni seriji analiz (vse plošče v eni seriji)</b>		
7	Sigmoidna krivulja referenčnega standarda	da (17 $\beta$ -estradiol)
8	Referenčni standard 17 $\beta$ -estradiol v območju EC50	od $4 * 10^{-12}$ do $4 * 10^{-11}$ M
9	Najnižje razmerje indukcije najvišje koncentracije 17 $\beta$ -estradiola glede na kontrolo referenčnega standarda s topilom	5
10	Relativna indukcija (%) pozitivne kontrole	> 30 %
11	Relativna indukcija (%) negativne kontrole	< 10 %

Pribl.: približno; PC: pozitivna kontrola; NC: negativna kontrola; SC: kontrola preskusne kemikalije s topilom; C0: kontrola referenčnega standarda s topilom; SO: standardni odklon; LDH: laktat dehidrogenaza.

**Preglednica 4: Merila za sprejemljivost antagonističnega biološkega preskusa ER $\alpha$  CALUX**

<b>A – posamezni vzorci na plošči</b>		<b>Merilo</b>
1	Največji delež SO treh jamic (za negativno kontrolo, pozitivno kontrolo, vsako razredčino preskusne kemikalije in referenčnega standarda, kontrolo s topilom (C0))	< 15 %
2	Največji delež SO treh jamic (za kontrolo z vehiklom (VC) in najvišjo koncentracijo referenčnega standarda (C8))	< 30 %
3	Največje uhajanje LDH kot merilo citotoksičnosti	< 120 %
<b>B – na posamezni mikrotitrski plošči</b>		
4	Razmerje med kontrolo referenčnega standarda s topilom (C0; plošča 1) in kontrolo preskusne kemikalije s topilom (kontrola s topilom; plošče 2 do x)	od 0,70 do 1,30
5	Razmerje med pribl. IC50 koncentracij referenčnega standarda na plošči 1 in pribl. EC50 koncentracij referenčnega standarda na ploščah 2 do x (C4)	od 0,70 do 1,30
6	Razmerje med najvišjimi koncentracijami referenčnega standarda na plošči 1 in najvišjimi koncentracijami referenčnega standarda na ploščah 2 do x (C8)	od 0,50 do 2,0
7	Z-faktor za vsako ploščo	> 0,6
<b>C – v posamezni seriji analiz (vse plošče v eni seriji)</b>		
8	Sigmoidna krivulja referenčnega standarda	da (tamoksifen)
9	Območje IC50 referenčnega standarda (tamoksifen)	od $1 \cdot 10^{-8}$ do $1 \cdot 10^{-7}$ M
10	Najnižje razmerje indukcije kontrole referenčnega standarda s topilom glede na najvišjo koncentracijo tamoksifena	2,5
11	Relativna indukcija (%) pozitivne kontrole	< 70 %
12	Relativna indukcija (%) negativne kontrole	> 85 %

Pribl.: približno; PC: pozitivna kontrola; NC: negativna kontrola; VC: kontrola z vehiklom (kontrola s topilom brez fiksne koncentracije agonističnega referenčnega standarda); SC: kontrola preskusne kemikalije s topilom; C0: kontrola referenčnega standarda s topilom; SO: standardni odklon; LDH: laktat dehidrogenaza.

### **Kontrola s topilom/vehiklom, referenčni standardi, pozitivne kontrole, negativne kontrole**

23. Tako za predhodno presejalno ponovitev kot za celovite ponovitve je treba uporabiti iste kontrole s topilom/vehiklom, referenčne standarde, pozitivne kontrole in negativne kontrole. Poleg tega morajo biti koncentracije referenčnih standardov, pozitivnih kontrol in negativnih kontrol enake.

#### *Kontrola s topilom*

24. Topilo, ki se uporabi za raztopitev preskusne kemikalije, je treba preskusiti kot kontrolo s topilom. Kot vehikel je bil med validacijo biološkega preskusa ER $\alpha$  CALUX uporabljen dimetilsulfoksid (DMSO, 1 vol. %; št. CAS 67-68-5). Če se uporabi drugo topilo, ne DMSO, je treba vse referenčne standarde, kontrole in preskusne kemikalije preskusiti v istem vehiklu. Upoštevati je treba, da kontrola s topilom za antagonistične študije vsebuje fiksno koncentracijo agonističnega referenčnega standarda 17 $\beta$ -estradiola (približno koncentracija EC<sub>50</sub>). Za preskušanje topila, uporabljenega za antagonistične študije, je treba pripraviti in preskusiti kontrolo z vehiklom.

#### *Kontrola z vehiklom (antagonizem)*

25. Za preskušanje antagonizma se preskusnemu mediju doda fiksna koncentracija agonističnega referenčnega standarda 17 $\beta$ -estradiola (približno koncentracija EC<sub>50</sub>). Za preskus topila, uporabljenega za raztopitev preskusnih kemikalij za antagonizem, je treba pripraviti preskusni medij brez fiksne koncentracije agonističnega referenčnega standarda 17 $\beta$ -estradiola. Ta kontrolni vzorec se označi kot kontrola z vehiklom. Kot vehikel je bil med validacijo biološkega preskusa ER $\alpha$  CALUX uporabljen dimetilsulfoksid (DMSO, 1 vol. %; št. CAS 67-68-5). Če se uporabi drugo topilo, ne DMSO, je treba vse referenčne standarde, kontrole in preskusne kemikalije preskusiti v istem vehiklu.

#### *Referenčni standardi*

26. Agonistični referenčni standard je 17 $\beta$ -estradiol (preglednica 1). Referenčni standardi obsegajo serijo razredčin osmih koncentracij 17 $\beta$ -estradiola ( $1,0 * 10^{-13}$ ,  $3,0 * 10^{-13}$ ,  $1,0 * 10^{-12}$ ,  $3,0 * 10^{-12}$ ,  $6,0 * 10^{-12}$ ,  $1,0 * 10^{-11}$ ,  $3,0 * 10^{-11}$ ,  $1,0 * 10^{-10}$  M).
27. Antagonistični referenčni standard je tamoksifen (preglednica 2). Referenčni standardi obsegajo serijo razredčin osmih koncentracij tamoksifena ( $3,0 * 10^{-9}$ ,  $1,0 * 10^{-8}$ ,  $3,0 * 10^{-8}$ ,  $1,0 * 10^{-7}$ ,  $3,0 * 10^{-7}$ ,  $1,0 * 10^{-6}$ ,  $3,0 * 10^{-6}$ ,  $1,0 * 10^{-5}$  M). Vsaka od koncentracij antagonističnega referenčnega standarda se koinkubira s fiksno koncentracijo agonističnega referenčnega standarda 17 $\beta$ -estradiola ( $3,0 * 10^{-12}$  M).

#### *Pozitivna kontrola*

28. Pozitivna kontrola za agonistične študije je 17 $\alpha$ -metiltestosteron (preglednica 1).

29. Pozitivna kontrola za antagonistične študije je 4-hidroksitamoksifen (preglednica 2). Antagonistična pozitivna kontrola se koinkubira s fiksno koncentracijo agonističnega referenčnega standarda 17 $\beta$ -estradiola ( $3,0 \cdot 10^{-12}$  M).

#### *Negativna kontrola*

30. Negativna kontrola za agonistične študije je kortikosteron (preglednica 1).

31. Negativna kontrola za antagonistične študije je resveratrol (preglednica 2). Antagonistična negativna kontrola se koinkubira s fiksno koncentracijo agonističnega referenčnega standarda 17 $\beta$ -estradiola ( $3,0 \cdot 10^{-12}$  M).

Dokazovanje usposobljenosti laboratorija (glej odstavek 14 ter preglednici 3 in 4 v oddelku ‚ELEMENTI PRESKUSA ER TA‘ te preskusne metode)

#### **Vehikel**

32. Topilo, ki se uporabi za raztapljanje preskusnih kemikalij, mora preskusno kemikalijo raztopiti v celoti in se mešati s celičnim gojiščem. Primerna topila so DMSO, voda in etanol (od 95- do 100-odstotna čistost). Če se kot topilo uporabi DMSO, največja koncentracija DMSO med inkubacijo ne sme preseči 1 vol. %. Pred uporabo je treba topilo preskusiti, da ni citotoksično in ne moti učinkovitosti preskusov.

#### **Priprava referenčnih standardov, pozitivnih kontrol, negativnih kontrol in preskusnih kemikalij**

33. Referenčni standardi, pozitivne kontrole, negativne kontrole in preskusne kemikalije se raztopijo v 100-odstotnem DMSO (ali ustreznem topilu). Nato je treba v istem topilu pripraviti ustrezne (zaporedne) razredčine. Preden se snovi raztopijo, je treba vse pustiti, da se prilagodijo na sobno temperaturo. Sveže pripravljene osnovne raztopine referenčnih standardov, pozitivnih kontrol, negativnih kontrol in preskusnih kemikalij ne smejo imeti vidne oborine ali motnosti. Zaloge referenčnih standardov in kontrol se lahko pripravijo v večjih količinah. Pred vsakim poskusom je treba pripraviti sveže osnovne raztopine preskusnih kemikalij. Za vsak poskus je treba pripraviti sveže končne razredčine referenčnih standardov, pozitivnih kontrol, negativnih kontrol in preskusnih kemikalij ter jih porabiti v 24 urah po pripravi.

#### **Topnost, citotoksičnost in določanje območja**

34. Med predhodno presejalno ponovitvijo se določi topnost preskusnih kemikalij v izbranem topilu. Pripravi se najvišja osnovna koncentracija, ki znaša 0,1 M. Če se pri tej koncentraciji pokažejo težave s topnostjo, je treba pripraviti nižje osnovne raztopine, dokler niso preskusne kemikalije v celoti raztopljene. Med predhodno presejalno ponovitvijo se preskusijo zaporedne razredčine preskusne kemikalije v razmerju 1 : 10. Najvišja preskusna koncentracija za preskušanje z agonistom in antagonistom je 1 mM. Po predhodnem

presejalnem pregledu se izpelje ustrezno izpopolnjeno območje koncentracije za preskusne kemikalije, ki ga je treba preskusiti med celovitimi ponovitvami. Razredčine, uporabljene za celovito preskušanje, morajo znašati 1-, 3-, 10-, 30-, 100-, 300-, 1 000- in 3 000-kratnik koncentracije.

35. Preskušanje citotoksičnosti je vključeno v protokole preskusov z agonistom in antagonistom (11). Preskušanje citotoksičnosti je del predhodne presejalne ponovitve in celovitih ponovitev. Metoda, uporabljena za oceno citotoksičnosti med validacijo biološkega preskusa ER $\alpha$  CALUX, je bil preskus uhajanja laktata dehidrogenaze (LDH) v kombinaciji s kvalitativnim vizualnim pregledom celic (glej Dodatek 4.1) po izpostavitvi preskusnim kemikalijam. Vendar se lahko uporabijo tudi druge kvantitativne metode za določitev citotoksičnosti (npr. tetrazolijev kolorimetrični preskus (MTT) ali biološki preskus citotoksičnosti CALUX). Na splošno se koncentracije preskusnih kemikalij, pri katerih se kaže več kot 20-odstotno zmanjšanje viabilnosti celic, štejejo za citotoksične in jih zato ni mogoče uporabiti za oceno podatkov. Kar zadeva preskus uhajanja LDH, se koncentracija preskusne kemikalije šteje za citotoksično, če delež uhajanja LDH presega 120 %.

#### **Izpostavitev preskusni kemikaliji in razporeditev na preskusni plošči**

36. Po tripsinizaciji konfluentne bučke z gojenimi celicami se celice resuspendirajo pri  $1 \times 10^5$  celic/ml v preskusnem mediju brez estrogena. 100  $\mu$ l resuspendiranih celic se nasadi v jamice na notranjem delu 96-jamične mikrotitrne plošče. Jamice na robu se napolnijo z 200  $\mu$ l fosfatnega pufra s soljo (PBS) (glej sliki 1 in 2). Nasajene celice se 24 ur predinkubirajo v inkubatorju s CO<sub>2</sub> (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C, 100-odstotna vlažnost).
37. Po predinkubaciji se plošče pregledajo za vidno citotoksičnost (glej Dodatek 4.1), kontaminacijo in konfluenco. Za preskušanje se uporabijo samo plošče, pri katerih se ne kaže vidna citotoksičnost in kontaminacija ter ki imajo vsaj 85-odstotno konfluenco. Medij se iz notranjih jamic previdno odstrani in nadomesti z 200  $\mu$ l preskusnega medija brez estrogena, ki vsebuje ustrezne zaporedne razredčine referenčnih standardov, preskusnih kemikalij, pozitivnih kontrol, negativnih kontrol in kontrol s topilom (preglednica 5: študije z agonistom; preglednica 6: študije z antagonistom). Vsi referenčni standardi, preskusne kemikalije, pozitivne kontrole, negativne kontrole in kontrole s topilom se preskusijo v treh ponovitvah. Na sliki 1 je prikazana razporeditev na plošči za preskušanje z agonistom. Na sliki 2 je prikazana razporeditev na plošči za preskušanje z antagonistom. Razporeditev na plošči za predhodno presejalno preskušanje in celovito preskušanje je enaka. Pri preskušanju z antagonistom vse notranje jamice, razen jamic za kontrolo z vehiklom (VC), vsebujejo tudi fiksno koncentracijo agonističnega referenčnega standarda 17 $\beta$ -estradiola ( $3,0 \times 10^{-12}$  M). Upoštevati je treba, da je treba referenčna standarda C8 in C4 dodati na vsako ploščo s preskusno kemikalijo.

38. Po izpostavitvi celic vsem kemikalijam je treba 96-jamične mikrotitrne plošče še 24 ur inkubirati v inkubatorju s CO<sub>2</sub> (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C, 100-odstotna vlažnost).

**Slika 1: Razporeditev na 96-jamičnih mikrotitrskih ploščah za predhodno presejanje in oceno agonističnega učinka**

**Plošča 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												

**Naslednje plošče**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
H												

C0 = topilo z referenčnim standardom.

C(1–8) = serija razredčin (1–8, od nizke do visoke koncentracije) referenčnega standarda.

PC = pozitivna kontrola.

NC = negativna kontrola.

TCx-(1–8) = razredčine (1–8, od nizke do visoke koncentracije) preskusne kemikalije za predhodno presejalno ponovitev in oceno agonističnega učinka preskusne kemikalije x.

SC = kontrola preskusne kemikalije s topilom (optimalno enako topilo kot v C0, vendar po možnosti iz druge serije).

Sive celice: = zunanje jamice, napolnjene z 200 µl PBS.

**Slika 2: Razporeditev na 96-jamičnih mikrotitrskih ploščah za predhodno antagonistično presejanje in oceno antagonističnega učinka**

**Plošča 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												

## Naslednje plošče

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

C0 = topilo z referenčnim standardom.

C(1–8) = serija razredčin (1–8, od nizke do visoke koncentracije) referenčnega standarda.

NC = negativna kontrola.

PC = pozitivna kontrola.

TCx-(1–8) = razredčine (1–8, od nizke do visoke koncentracije) preskusne kemikalije za predhodno presejalno ponovitev in oceno agonističnega učinka preskusne kemikalije x.

SC = kontrola preskusne kemikalije s topilom (optimalno enako topilo kot v C0, vendar po možnosti iz druge serije).

VC = kontrola z vehiklom (kontrola s topilom brez fiksne koncentracije agonističnega referenčnega standarda 17 $\beta$ -estradiola).

Sive celice: = zunanje jamice, napolnjene z 200  $\mu$ l PBS.

Opomba: vse notranje jamice, razen jamic za kontrolo z vehiklom (VC), vsebujejo tudi fiksno koncentracijo agonističnega referenčnega standarda 17 $\beta$ -estradiola ( $3,0 \cdot 10^{-12}$  M).

## Merjenje luminiscence

39. Merjenje luminiscence je podrobno opisano v protokolih za preskuse z agonistom in antagonistom (10). Medij je treba odstraniti iz jamic in celice po 24 urah inkubiranja lizirati, da se odpre celična membrana in omogoči merjenje luciferazne aktivnosti.

40. Za merjenje luminiscence je pri tem postopku potreben luminometer, opremljen z dvema injektorjema. Luciferazna reakcija se začne z injiciranjem substrata luciferina, ustavi pa se tako, da se doda 0,2 M NaOH. Reakcija se ustavi, da se prepreči prenos luminiscence z ene jamice na drugo.

41. Svetloba, oddana iz vsake jamice, se izrazi kot relativna svetlobna enota (RLU) na jamico.

## Predhodna presejalna ponovitev

42. Na podlagi rezultatov predhodne presejalne analize se določi izpopolnjeno območje koncentracije preskusnih kemikalij za celovito preskušanje. Ocena rezultatov predhodne presejalne analize in določitev izpopolnjenega območja koncentracije preskusnih kemikalij za celovito preskušanje sta podrobno opisani v protokolih za preskus z agonistom in antagonistom (10). V nadaljevanju je kratek povzetek postopkov za določitev območja

koncentracije preskusnih kemikalij za preskušanje z agonistom in antagonistom. Za navodila glede zasnove zaporednega redčenja glej preglednici 5 in 6.

#### *Izbira koncentracij za oceno agonističnih učinkov*

43. Med predhodno presejalno ponovitvijo je treba preskusne kemikalije preskusiti z uporabo serije razredčin, kot so navedene v preglednicah 5 (agonizem) in 6 (antagonizem). Vse koncentracije je treba preskusiti v treh jamicah v skladu z razporeditvijo na plošči, navedeno na sliki 1 (agonizem) ali 2 (antagonizem).
44. Samo rezultati analize, ki izpolnjujejo merila za sprejemljivost (preglednica 3), se štejejo za veljavne in jih je mogoče uporabiti za oceno odziva preskusnih kemikalij. Če ena ali več mikrotitrskih plošč v analizni seriji ne izpolnjuje meril za sprejemljivost, je treba zadevne mikrotitrške plošče znova analizirati. Če prva plošča, ki vsebuje celotno serijo razredčin referenčnega standarda, ne izpolnjuje meril za sprejemljivost, je treba znova analizirati celotno preskusno serijo (6 plošč).
45. Začetna območja koncentracije preskusnih kemikalij je treba prilagoditi in predhodno presejalno ponovitev ponoviti, če:
  - je opažena citotoksičnost. Postopek predhodnega presejanja je treba ponoviti z nižjimi necitotoksičnimi koncentracijami preskusne kemikalije;
  - predhodno presejanje preskusne kemikalije ne pokaže celotne krivulje odziva na odmerke, ker preskušene koncentracije povzročajo največjo indukcijo. Predhodno presejalno ponovitev je treba ponoviti z nižjimi koncentracijami preskusne kemikalije.
46. Če je opažen ustrezen z odmerkom povezan odziv, je treba izbrati (najnižjo) koncentracijo, pri kateri je opažena največja indukcija in ki ne kaže citotoksičnosti. Najvišja koncentracija preskusne kemikalije, ki jo je treba preskusiti v celovitih ponovitvah, mora biti trikratnik te izbrane koncentracije.
47. S koraki redčenja, navedenimi v preglednici 5, je treba pripraviti celotno izpopolnjeno serijo razredčin preskusne kemikalije, tako da se začne z najvišjo koncentracijo, kot je določena zgoraj.
48. Preskusno kemikalijo, ki ne povzroči nobenega agonističnega učinka, je treba preskusiti v celovitih ponovitvah, tako da se začne z najvišjo necitotoksično koncentracijo, opredeljeno med predhodnim presejalnim pregledom.

#### *Izbira koncentracij za oceno antagonističnih učinkov*

49. Za veljavne se štejejo samo rezultati analize, ki izpolnjujejo merila za sprejemljivost (preglednica 4), in jih je mogoče uporabiti za oceno odziva preskusnih kemikalij. Če ena ali več mikrotitrskih plošč v analizni seriji ne izpolnjuje meril za sprejemljivost, je treba

zadevne mikrotitrne plošče znova analizirati. Če prva plošča, ki vsebuje celotno serijo razredčin referenčnega standarda, ne izpolnjuje meril za sprejemljivost, je treba znova analizirati celotno preskusno serijo (6 plošč).

50. Začetna območja koncentracije preskusnih kemikalij je treba prilagoditi in predhodno presejalno ponovitev ponoviti, če:

- je opažena citotoksičnost. Postopek predhodnega presejanja je treba ponoviti z nižjimi necitotoksičnimi koncentracijami preskusne kemikalije;
- predhodno presejanje preskusne kemikalije ne pokaže celotne krivulje odziva na odmerke, ker preskušene koncentracije povzročajo največjo inhibicijo. Predhodno presejanje je treba ponoviti z nižjimi koncentracijami preskusne kemikalije.

51. Če je ugotovljen ustrezen z odmerkom povezan odziv, je treba izbrati (najnižjo) koncentracijo, pri kateri je opažena največja inhibicija in ki ne kaže citotoksičnosti. Najvišja koncentracija preskusne kemikalije, ki jo je treba preskusiti v celovitih ponovitvah, mora biti trikratnik te izbrane koncentracije.

52. S koraki redčenja, navedenimi v preglednici 6, je treba pripraviti celotno izpopolnjeno serijo razredčin preskusne kemikalije, tako da se začne z najvišjo koncentracijo, kot je določena zgoraj.

53. Preskusne kemikalije, ki ne povzročijo nobenih antagonističnih učinkov, je treba preskusiti v celovitih ponovitvah, tako da se začne z najvišjo necitotoksično koncentracijo, preskušeno med predhodnim presejalnim pregledom.

### **Celovite ponovitve**

54. Po izbiri izpopolnjenih območij koncentracije je treba preskusne kemikalije celovito preskusiti z uporabo serije razredčin, navedenih v preglednicah 5 (agonizem) in 6 (antagonizem). Vse koncentracije je treba preskusiti v treh jamicah v skladu z razporeditvijo na plošči, navedeno na sliki 1 (agonizem) ali 2 (antagonizem).

55. Samo rezultati analize, ki izpolnjujejo merila za sprejemljivost (preglednici 3 in 4), se štejejo za veljavne in jih je mogoče uporabiti za oceno odziva preskusnih kemikalij. Če ena ali več mikrotitrskih plošč v analizni seriji ne izpolnjuje meril za sprejemljivost, je treba zadevne mikrotitrne plošče znova analizirati. Če prva plošča, ki vsebuje celotno serijo razredčin referenčnega standarda, ne izpolnjuje meril za sprejemljivost, je treba znova analizirati celotno preskusno serijo (6 plošč).

**Preglednica 5:** Koncentracija in razredčine referenčnih standardov, kontrol in preskusnih kemikalij, uporabljenih za preskušanje z agonistom

Referenčni 17 $\beta$ -estradiol	TCx – predhodna presejalna ponovitev	TCx – celovita ponovitev	Kontrole
----------------------------------	--------------------------------------	--------------------------	----------

konc. (M)		razredčina		razredčina		konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	$3,0 * 10^{-6}$
C1	$1,0 * 10^{-13}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	$1,0 * 10^{-8}$
C2	$3,0 * 10^{-13}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$1,0 * 10^{-12}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$3,0 * 10^{-12}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$6,0 * 10^{-12}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	$1,0 * 10^{-11}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3,0 * 10^{-11}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	$1,0 * 10^{-10}$						

TCx – preskusna kemikalija x.

PC – pozitivna kontrola (17 $\alpha$ -metiltestosteron).

NC – negativna kontrola (kortikosteron).

C0 – kontrola referenčnega standarda s topilom.

SC – kontrola preskusne kemikalije s topilom.

**Preglednica 6:** Koncentracija in razredčine referenčnih standardov, kontrol in preskusnih kemikalij, uporabljenih za preskušanje z antagonistom

Referenčni tamoksifen konc. (M)		TCx – predhodna presejalna ponovitev razredčina		TCx – celovita ponovitev razredčina		Kontrole konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	$1,0 * 10^{-9}$
C1	$3,0 * 10^{-9}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	$1,0 * 10^{-5}$
C2	$1,0 * 10^{-8}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3,0 * 10^{-8}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1,0 * 10^{-7}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$3,0 * 10^{-7}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	$1,0 * 10^{-6}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3,0 * 10^{-6}$					<b>Dodani agonist konc. (M)</b>	
C8	$1,0 * 10^{-5}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17 $\beta$ - estradiol	$3,0 * 10^{-12}$

TCx – preskusna kemikalija x.

PC – pozitivna kontrola (4-hidroksitamoksifen).

NC – negativna kontrola (resveratrol).

C0 – kontrola referenčnega standarda s topilom.

SC – kontrola preskusne kemikalije s topilom.

VC – kontrola z vehiklom (ne vsebuje fiksne koncentracije agonističnega referenčnega standarda 17 $\beta$ -estradiola ( $3,0 * 10^{-12}$  M)).

### Zbiranje podatkov in podatkovna analiza

56. Po predhodnih presejalnih in celovitih ponovitvah je treba določiti EC<sub>10</sub>, EC<sub>50</sub>, PC<sub>10</sub>, PC<sub>50</sub> in največjo indukcijo (TCx<sub>max</sub>) preskusne kemikalije za agonistično preskušanje. Za antagonistično preskušanje je treba izračunati IC<sub>20</sub>, IC<sub>50</sub>, PC<sub>80</sub>, PC<sub>50</sub> in najmanjšo indukcijo

(TC<sub>Xmin</sub>). Na slikah 3 (agonizem) in 4 (antagonizem) so ti parametri grafično prikazani. Potrebni parametri se izračunajo na podlagi relativne indukcije vsake preskusne kemikalije (glede na največjo indukcijo referenčnega standarda (= 100 %)). Za oceno podatkov je treba uporabiti nelinearno regresijo (variabilni naklon, 4 parametri) v skladu z naslednjo enačbo:

$$Y = dno + \frac{(vrh - dno)}{(1 + 10^{((lgEC_{50} - X) * Hillov\ naklon)})}$$

pri čemer je:

X = logaritem odmerka ali koncentracije

Y = odziv (relativna indukcija (%))

Vrh = največja indukcija (%)

Dno = najmanjša indukcija (%)

LogEC<sub>50</sub> = logaritem koncentracije, pri kateri je opaženih 50 % največjega odziva

Hillov naklon = naklonski faktor Hillovega naklona

57. Neobdelane podatke iz luminometra, izražene kot relativne svetlobne enote (RLU), je treba prenesti v preglednico za podatkovno analizo, zasnovano za predhodne presejalne in celovite ponovitve. Neobdelani podatki morajo izpolnjevati merila za sprejemljivost, kot so navedena v preglednicah 3A in 3B (agonizem) ali 4A in 4B (antagonizem). Če neobdelani podatki izpolnjujejo merila za sprejemljivost, se za določitev potrebnih parametrov izvedejo v nadaljevanju navedeni računski koraki.

#### Agonizem

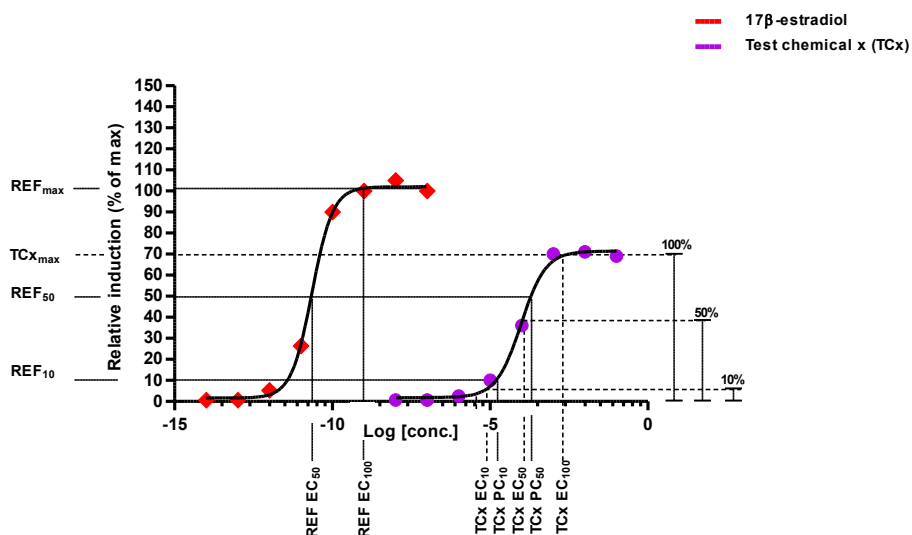
- Povprečno RLU kontrole referenčnega standarda s topilom odštejte od vsakega od neobdelanih podatkov analize referenčnih standardov.
- Povprečno RLU za kontrolo preskusne kemikalije s topilom odštejte od vsakega od neobdelanih podatkov analize preskusnih kemikalij.
- Izračunajte relativno indukcijo posamezne koncentracije referenčnega standarda. Indukcijo najvišje koncentracije referenčnega standarda nastavite na 100 %.
- Izračunajte relativno indukcijo posamezne koncentracije preskusne kemikalije v primerjavi z najvišjo koncentracijo referenčnega standarda kot 100 %.
- Ocenite rezultate analize na podlagi nelinearne regresije (variabilni naklon, 4 parametri).
- Določite EC<sub>50</sub> in EC<sub>10</sub> referenčnega standarda.
- Določite EC<sub>50</sub> in EC<sub>10</sub> preskusnih kemikalij.
- Določite največjo relativno indukcijo preskusne kemikalije (TC<sub>max</sub>).
- Določite PC<sub>10</sub> in PC<sub>50</sub> preskusnih kemikalij.

Pri preskusnih kemikalijah ni vedno mogoče dobiti celotne krivulje odziva na odmere, npr. zaradi težav s citotoksičnostjo ali topnostjo. Zato  $EC_{50}$ ,  $EC_{10}$  in  $PC_{50}$  ni mogoče določiti. V takem primeru se lahko določita samo  $PC_{10}$  in  $TC_{max}$ .

## Antagonizem

- Povprečno RLU najvišje koncentracije referenčnega standarda odštejte od vsakega od neobdelanih podatkov analize referenčnih standardov.
- Povprečno RLU najvišje koncentracije referenčnega standarda odštejte od vsakega od neobdelanih podatkov analize preskusnih kemikalij.
- Izračunajte relativno indukcijo posamezne koncentracije referenčnega standarda. Indukcijo najnižje koncentracije referenčnega standarda nastavite na 100 %.
- Izračunajte relativno indukcijo posamezne koncentracije preskusne kemikalije v primerjavi z najnižjo koncentracijo referenčnega standarda kot 100 %.
- Ocenite rezultate analize na podlagi nelinearne regresije (variabilni naklon, 4 parametri).
- Določite  $IC_{50}$  in  $IC_{20}$  referenčnega standarda.
- Določite  $IC_{50}$  in  $IC_{20}$  preskusnih kemikalij.
- Določite najmanjšo relativno indukcijo preskusne kemikalije ( $TC_{min.}$ ).
- Določite  $PC_{80}$  in  $PC_{50}$  preskusnih kemikalij.

Slika 3: Pregled parametrov, določenih pri preskusu z agonistom



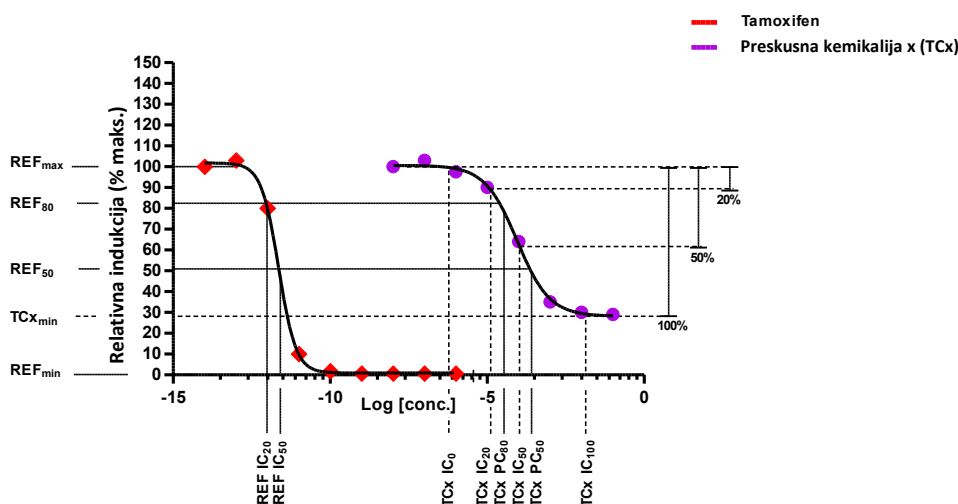
- $EC_{10}$  = koncentracija snovi, pri kateri je opaženih 10 % njenega največjega odziva.  
 $EC_{50}$  = koncentracija snovi, pri kateri je opaženih 50 % njenega največjega odziva.  
 $PC_{10}$  = koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri je njen odziv enak  $EC_{10}$  referenčnega

standarda.

$PC_{50}$  = koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri je njen odziv enak  $EC_{50}$  referenčnega standarda.

$TC_{x,max}$  = največja relativna indukcija preskusne kemikalije.

**Slika 4:** Pregled parametrov, določenih pri preskusu z antagonistom



$IC_{20}$  = koncentracija snovi, pri kateri je opaženih 80 % njenega največjega odziva (20-odstotna inhibicija).

$IC_{50}$  = koncentracija snovi, pri kateri je opaženih 50 % njenega največjega odziva (50-odstotna inhibicija).

$PC_{80}$  = koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri je njen odziv enak  $IC_{20}$  referenčnega standarda.

$PC_{50}$  = koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri je njen odziv enak  $IC_{50}$  referenčnega standarda.

$TC_{x,min}$  = najmanjša relativna indukcija preskusne kemikalije.

Pri preskusnih kemikalijah ni vedno mogoče dobiti celotne krivulje odziva na odmere, npr. zaradi težav s citotoksičnostjo ali topnostjo. Zato  $IC_{50}$ ,  $IC_{20}$  in  $PC_{50}$  ni mogoče določiti. V takem primeru se lahko določita samo  $PC_{20}$  in  $TC_{min}$ .

58. Rezultati morajo temeljiti na dveh (ali treh) neodvisnih ponovitvah. Če se z dvema ponovitvama dobijo primerljivi in torej obnovljivi rezultati, tretje ponovitve ni treba izvesti. Rezultati so sprejemljivi, če:

- izpolnjujejo merila za sprejemljivost (glej Merila za sprejemljivost v odstavkih 14–22),
- so obnovljivi.

## Merila za razlago rezultatov

59. Pri razlagi podatkov in odločanju, ali se preskusna kemikalija šteje za pozitivno ali negativno, je treba uporabiti v nadaljevanju navedena merila.

#### Agonizem

Pri vsaki celoviti ponovitvi se preskusna kemikalija šteje za **pozitivno**, če:

1. je  $TC_{max}$  najmanj enak 10 % največjega odziva referenčnega standarda ( $REF_{10}$ );
2. sta vsaj dve zaporedni koncentraciji preskusne kemikalije najmanj enaki  $REF_{10}$ .

Pri vsaki celoviti ponovitvi se preskusna kemikalija šteje za **negativno**, če:

1.  $TC_{max}$  ne presega 10 % največjega odziva referenčnega standarda ( $REF_{10}$ );
2. sta manj kot dve koncentraciji preskusne kemikalije najmanj enaki  $REF_{10}$ .

#### Antagonizem

Pri vsaki celoviti ponovitvi se preskusna kemikalija šteje za **pozitivno**, če:

1. je  $TC_{min}$  največ enak 80 % največjega odziva referenčnega standarda ( $REF_{80} = 20$ -odstotna inhibicija);
2. sta vsaj dve zaporedni koncentraciji preskusne kemikalije največ enaki  $REF_{80}$ .

Pri vsaki celoviti ponovitvi se preskusna kemikalija šteje za **negativno**, če:

1.  $TC_{min}$  presega 80 % največjega odziva referenčnega standarda ( $REF_{80} = 20$ -odstotna inhibicija);
2. sta manj kot 2 koncentraciji preskusne kemikalije največ enaki  $REF_{80}$ .

60. Da se opredeli jakost pozitivnega odziva preskusne kemikalije, je treba navesti velikost učinka (agonizem:  $TC_{max}$ ; antagonizem:  $TC_{min}$ ) in koncentracijo, pri kateri se učinek pojavi (agonizem:  $EC_{10}$ ,  $EC_{50}$ ,  $PC_{10}$ ,  $PC_{50}$ ; antagonizem:  $IC_{20}$ ,  $IC_{50}$ ,  $PC_{80}$ ,  $PC_{50}$ ).

## POROČILO O PRESKUSU

61. Glej odstavek 20 ‚ELEMENTI PRESKUSA ER TA‘.

## VIRI

- (1) OECD (2016). Draft Validation report of the (anti-) ER $\alpha$  CALUX bioassay – transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 240). Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (2) Sonneveld, E., Jansen, H. J., Riteco, J. A., Brouwer, A., in van der Burg, B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136–148.
- (3) Quaedackers, M. E., van den Brink, C. E., Wissink, S., Schreurs, R. H. M. M., Gustafsson, J. A., van der Saag, P. T., in van der Burg, B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER) $\alpha$  and not through ER $\beta$ . *Endocrinology* 142(3), 1156–1166.
- (4) Thorne, N., Inglese, J., in Auld, D. S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, *Chemistry and Biology* 17(6): 646–57.
- (5) Escande, A., Pillon, A., Servant, N., Cravedi, J. P., Larrea, F., Muhn, P., Nicolas, J. C., Cavallès, V., in Balaguer, P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459–1469.
- (6) Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., van der Burg, B., in Gustafsson, J. A.. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.*, 139, 4252–4263.
- (7) Sotoca, A. M., Bovee, T. F. H, Brand, W., Velikova, N., Boeren, S., Murk, A. J., Vervoort, J., Rietjens, I. M. C. M. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 122, 204–211.
- (8) Sonneveld, E., Riteco, J. A. C., Jansen, H. J., Pieterse, B., Brouwer, A., Schoonen, W. G., in van der Burg, B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.*, 89(1), 173–187.
- (9) Kobayashi, H., Yamamoto, K., Eguchi, M., Kubo, M., Nakagami, S., Wakisaka, S., Kaizuka, M., in Ishii, H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of

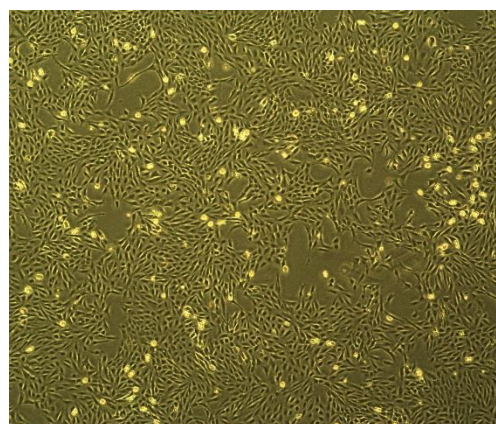
polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769–771.

- (10) Zhang, J.-H., Chung, T. D. Y, in Oldenburg, K. R. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Scr.*, 4, 67–73.
- (11) Besselink, H., Middelhof, I., in Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ER $\alpha$  CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, Nizozemska.

#### Dodatek 4.1: Vizualni pregled viabilnosti celic

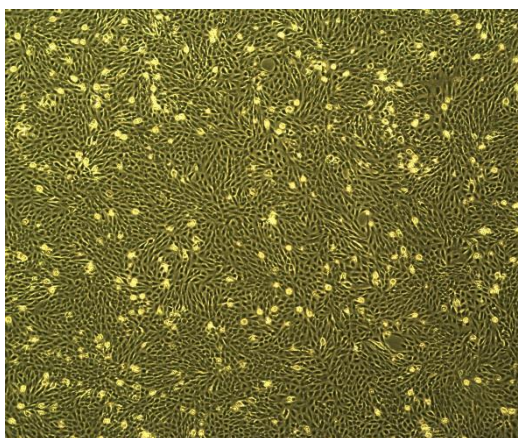


< 5-odstotna konfluenta. Celice so bile pravkar nasajene. 100-odstotna viabilnost celic. Razvrstitev: „ni citotoksičnosti“.



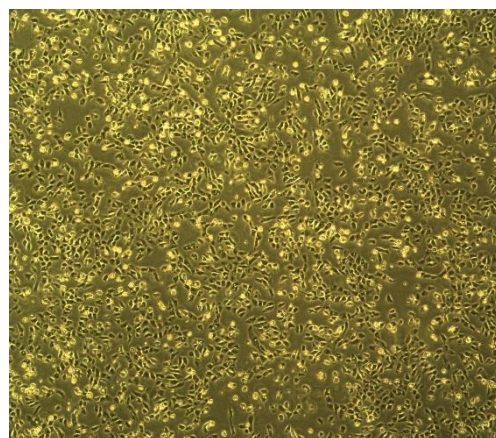
> 85-odstotna konfluenta. V tej fazi se celice izpostavijo preskusnim kemikalijam. > 95-odstotna viabilnost celic.

Razvrstitev: „ni citotoksičnosti“.

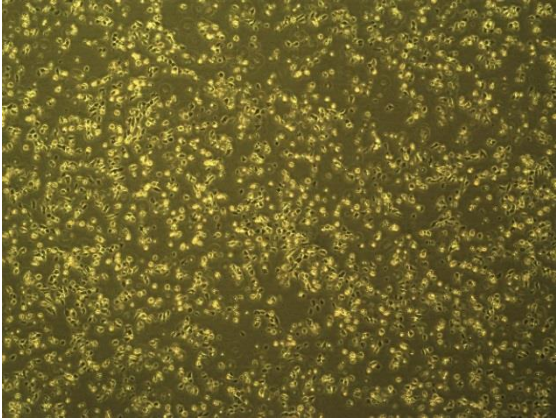


> 95-odstotna konfluenta. Celice so gosto natlačene in se začinjajo preveč razraščati. > 95-odstotna viabilnost celic.

Razvrstitev: „ni citotoksičnosti“.



< 25-odstotna viabilnost celic. Celice se ločijo in stik med celicami se zmanjša. Celice so zaokrožene. Razvrstitev: „citotoksičnost“.



< 5-odstotna viabilnost celic. Celice so popolnoma ločene, stik med njimi je pretrgan. Celice so zaokrožene. Razvrstitev: ‚citotoksičnost‘.

## B.67 PRESKUSI GENSKIH MUTACIJ V CELICAH SESALCEV *IN VITRO* Z UPORABO GENA ZA TIMIDIN KINAZO

### UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje 490 (2016). Preskusne metode se redno pregledujejo in revidirajo ob upoštevanju znanstvenega napredka, regulativnih zahtev in dobrobiti živali. Preskus z limfomom miši (MLA) in preskus TK6 z uporabo lokusa za timidin kinazo (TK) je prvotno vsebovala preskusna metoda B.17. Pozneje je strokovna skupina za MLA mednarodne delavnice o preskušanju genotoksičnosti (International Workshop for Genotoxicity Testing (IWGT)) razvila mednarodno usklajena priporočila v zvezi z merili za sprejemljivost preskusa in razlago podatkov v zvezi z MLA (1) (2) (3) (4) (5), ki so vključena v to novo preskusno metodo B.67. Ta preskusna metoda je napisana za preskus MLA, in ker se pri njej uporablja tudi lokus za TK, preskus TK6. Medtem ko je bila uporaba preskusa MLA za regulativne namene zelo razširjena, se je preskus TK6 uporabljal precej redkeje. Opozoriti je treba, da kljub podobnosti med končnimi točkami ti celični liniji nista medsebojno zamenljivi, v regulativnih programih pa se lahko za določeno regulativno uporabo upravičeno daje prednost eni pred drugo. Validacija preskusa MLA je na primer pokazala njegovo ustreznost za zaznavanje ne le genske mutacije, ampak tudi sposobnosti preskusne kemikalije, da povzroči strukturne kromosomske poškodbe. Ta preskusna metoda je del sklopa preskusnih metod v zvezi z genetsko toksikologijo. OECD je pripravila dokument z jedrnatimi informacijami o preskušanju v zvezi z genetsko toksikologijo in pregledom nedavnih sprememb smernic OECD za preskušanje v zvezi z genetsko toksikologijo (6).
2. Namen preskusov genskih mutacij v celicah sesalcev *in vitro* je zaznati genske mutacije, katerih nastanek povzročijo kemikalije. S celičnimi linijami, ki se uporabljajo pri teh preskusih, se merijo napredne mutacije na poročevalskih genih, natančneje endogenem genu za timidin kinazo (*TK* za človeške celice in *Tk* za celice glodavcev, pri tej preskusni metodi skupaj navedene kot *TK*). Pri tej preskusni metodi naj bi se uporabljali dve celični liniji: celična linija limfoma miši L5178Y TK<sup>+/-</sup>-3.7.2C (na splošno imenovana L5178Y) in človeška limfoblastoidna celična linija TK6 (na splošno imenovana TK6). Čeprav se celični liniji razlikujeta po izvoru, celični rasti, statusu proteina p53 itd., se lahko preskusi genskih mutacij na *TK* pri obeh vrstah celic izvedejo podobno, kot je opisano v tej preskusni metodi.
3. Avtosomalne in heterozigotne lastnosti gena za timidin kinazo omogočajo zaznavo viabilnih kolonij, katerih celicam po mutaciji iz *TK*<sup>+/-</sup> v *TK*<sup>-/-</sup> primanjkuje encima timidin kinaze. Ta primanjkljaj je lahko posledica genskih pojavov, ki vplivajo na gen *TK*, vključno z obema genskima mutacijama (točkovne mutacije, mutacije premika

bralnega okvira, majhne delecije itd.), in kromosomskih pojavov (velike delecije, kromosomske prerazporeditve in mitotična rekombinacija). Zadnji navedeni pojavi se izrazijo kot izguba heterozigotnosti, ki je pogosta genska sprememba tumor zavirajočih genov v tumorogenosti pri človeku. Teoretično je izgubo celotnega kromosoma, ki nosi gen *TK*, zaradi okvare delitvenega vretena in/ali mitotičnega nerazdvajanja mogoče zaznati pri preskusu MLA. Dejansko kombinacija citogenetske in molekularne analize jasno pokaže, da so nekatere mutante MLA *TK* posledica nerazdvajanja. Vendar zanesljivost dokazov kaže, da s preskusi mutacij gena *TK* ni mogoče zanesljivo zaznati anevgenov, če se uporabljajo standardna merila za citotoksičnost (kot so opisana v tej preskusni metodi), zato ni ustrezno, da se ti preskusi uporabljajo za zaznavanje anevgenov (7) (8) (9).

4. Pri preskusih mutacij gena *TK* nastaneta dva različna fenotipska razreda mutant *TK*: normalno rastoče mutante, ki rastejo enako hitro kot heterozigotne celice *TK*, in počasi rastoče mutante, ki rastejo z daljšimi podvojitvenimi časi. Normalno rastoče in počasi rastoče mutante se pri preskusu MLA prepoznajo kot mutante z velikimi kolonijami in mutante z majhnimi kolonijami, pri preskusu *TK6* pa kot mutante z zgodaj nastalimi kolonijami in mutante s pozno nastalimi kolonijami. Molekularne in citogenetske lastnosti mutant z velikimi in majhnimi kolonijami so bile podrobno raziskane (8) (10) (11) (12) (13). Prav tako so bile obširno raziskane molekularne in citogenetske lastnosti zgodaj nastalih in pozno nastalih mutant *TK6* (14) (15) (16) (17). Počasi rastoče mutante so pri obeh vrstah celic utrpeli genske poškodbe, ki vključujejo domnevne gene za uravnavanje rasti v bližini lokusa *TK*, kar povzroči daljše podvojitvene čase in tvorbo pozno nastalih ali majhnih kolonij (18). Nastanek počasi rastočih mutant se povezuje s kemikalijami, ki povzročajo obsežne strukturne spremembe na ravni kromosomov. Celice, katerih poškodbe ne vključujejo domnevnih genov za uravnavanje rasti v bližini lokusa *TK*, rastejo podobno hitro kot starševske celice in postanejo normalno rastoče mutante. Nastanek primarno normalno rastočih mutant se povezuje s kemikalijami, ki primarno delujejo kot točkovni mutageni. Zato je nujno, da se preštejejo tako počasi rastoče kot tudi normalno rastoče mutante, da se dobijo vse mutante in se zagotovi določen vpogled v vrste poškodb (mutagene proti klastogenim), ki jih povzroča preskusna kemikalija (10) (12) (18) (19).
5. Preskusna metoda iz smernice za preskušanje je urejena tako, da zagotavlja splošne informacije, ki veljajo za MLA in *TK6*, ter posebna navodila za posamezne preskuse.
6. Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

## **ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE**

7. Pri preskusih, izvedenih *in vitro*, je običajno treba uporabiti zunanji vir presnovne aktivacije. Zunanji sistem presnovne aktivacije pogojev *in vivo* ne posnema v celoti.
8. Paziti je treba, da se preprečijo pogoji, ki bi lahko vodili do lažno pozitivnih rezultatov (tj. morebitnega medsebojnega delovanja s preskusnim sistemom), ki jih ne bi povzročilo medsebojno delovanje preskusne kemikalije in genetskega materiala celice; med take pogoje spadajo spremembe vrednosti pH ali osmolarnosti, medsebojno delovanje sestavin gojišča (20) (21) ali previsoke ravni citotoksičnosti (22) (23) (24). Za citotoksičnost, ki presega priporočene najvišje ravni citotoksičnosti, kot so opredeljene v odstavku 28, se šteje, da je prevelika za preskusa MLA in TK6. Poleg tega je treba opozoriti, da se lahko zaradi preskusnih kemikalij, ki so analogi timidina ali se obnašajo kot analogi timidina, poveča pogostnost mutant s selektivno rastjo spontanih mutant v ozadju med tretiranjem celic in zahtevajo dodatne preskusne metode za ustrezno oceno (25).
9. Pri proizvedenih nanomaterialih so morda potrebne posebne prilagoditve te preskusne metode, ki pa pri tej metodi niso opisane.
10. Preden se preskusna metoda uporabi za preskušanje zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni.
11. Mutirane celice brez delovanja encima timidin kinaza (TK) zaradi mutacije  $TK^{+/-}$  do  $TK^{-/-}$  so odporne proti citostatičnim učinkom pirimidinskega analoga trifluorotimidina (TFT). Celice s  $TK$  so občutljive za TFT, ki zavira celično presnovo in ustavi celično delitev. Mutirane celice so tako sposobne množitve v navzočnosti TFT in tvorijo vidne kolonije, celice, ki vsebujejo encim timidin kinaza, pa ne.

## NAČELO PRESKUSA

12. Celice v suspenziji se za ustrezno časovno obdobje (glej odstavek 33) izpostavijo preskusni kemikaliji z zunanjim virom presnovne aktivacije in brez njega (glej odstavek 19), nato pa se kultivirajo na novem gojišču, da se določi citotoksičnost in omogoči izražanje fenotipa pred selekcijo mutant. Citotoksičnost je določena z relativno skupno rastjo (RTG – glej odstavek 25) pri preskusu MLA in relativnim preživetjem (RS – glej odstavek 26) pri preskusu TK6. Tretirane kulture se v gojišču vzdržujejo dovolj dolgo obdobje, značilno za vsako vrsto celic (glej odstavek 37), ki omogoči skoraj optimalno izražanje fenotipa induciranih mutacij. Po izražanju fenotipa se pogostnost mutant določi z nasaditvijo znanega števila celic v gojišče s selektivno snovjo, da se zaznajo mutirane kolonije, in v gojišče brez selektivne snovi, da se določi učinkovitost tvorbe klonov (viabilnost). Po ustrezno dolgi inkubaciji se

preštejejo kolonije. Pogostnost mutant se izračuna iz števila mutiranih kolonij, korigiranega z učinkovitostjo tvorbe klonov ob selekciji mutant.

## OPIS METODE

### Pripravki

#### *Celice*

13. Za preskus MLA: ker je bil preskus MLA razvit in opredeljen z uporabo podlinije  $TK^{+/-}$ -3.7.2C celic L5178Y, je treba pri preskusu MLA uporabiti to specifično podlinijo. Celična linija L5178Y je bila pridobljena iz z metilkolantrenom povzročenege timičnega limfoma pri miši DBA-2 (26). Clive in sodelavci so celice L5178Y (ki jih je Clive označil kot  $TK^{+/+}$ -3) tretirali z etil-metan-sulfonatom in izolirali klon  $TK^{-/-}$  (označen kot  $TK^{-/-}$ -3.7), pri čemer so kot selektivno snov uporabili bromdeoksiuridin. Iz klona  $TK^{-/-}$  sta bila izolirana spontani klon  $TK^{+/-}$  (označen kot  $TK^{+/-}$ -3.7.2.) in podklon (označen kot  $TK^{+/-}$ -3.7.2C) ter sta bila opredeljena za uporabo pri preskusu MLA (27). Kariotip celične linije je bil objavljen (28) (29) (30) (31). Modalno kromosomsko število je 40. Obstaja metacentrični kromosom (t12;13), ki ga je treba šteti kot en kromosom. Lokus *TK* pri miši je na distalnem koncu kromosoma 11. Celična linija L5178Y  $TK^{+/-}$ -3.7.2C ima mutacije na obeh alelih p53 in proizvaja mutiran protein p53 (32) (33). Status proteina p53 v celični liniji  $TK^{+/-}$ -3.7.2C je verjetno odgovoren za to, da je mogoče s preskusom zaznati obsežne poškodbe (17).
14. Za preskus TK6: TK6 je človeška limfoblastoidna celična linija. Starševska celična linija je z Epstein-Barrovim virusom transformirana celična linija, WI-L2, ki je bila prvotno pridobljena od petletnika z dedno sferocitozo. Prvi izolirani klon HH4 je bil mutiran z ICR191 in nastala je heterozigotna celična linija *TK* – TK6 (34). Celice TK6 so skoraj diploidi, reprezentativni kariotip pa je 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Lokus človeškega *TK* je na dolgem kraku kromosoma 17. TK6 je s p53 kompetentna celična linija, ker ima sekvenco divjega tipa p53 na obeh alelih in izraža samo divji tip proteina p53 (36).
15. Tako pri preskusu MLA kot tudi pri preskusu TK6 je priporočljivo, da preskuševalni laboratorij ob prvi vzpostavitvi ali dopolnitvi osnovne zaloge zagotovi, da ni okužbe z *mikoplazmo*, določi kariotip celic ali pobarva kromosome z lokusom *TK* ter preveri podvojitvene čase populacije. Določiti je treba običajno trajanje celičnega cikla celic, uporabljenih v preskuševalnem laboratoriju, ki mora biti skladno z objavljenimi lastnostmi celic (16) (19) (37). To osnovno zalogo je treba hraniti pri  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$  ali manj in uporabiti za pripravo vseh delovnih zalog celic.

16. Pred vzpostavitvijo velikega števila delovnih zalog, shranjenih z zamrzovanjem, ali tik pred uporabo v poskusu je iz kultur morda treba odstraniti že obstoječe mutirane celice (razen če je pogostnost mutant v kontroli s topilom že znotraj sprejemljivega razpona – glej preglednico 2 za preskus MLA). Za to sta potrebna uporaba metotreksata (aminopterin), da se ne izberejo celice brez TK ter dodajanje timidina, hipoksantina in glicina (L5178Y) ali 2'-deoksicitidina (TK6) v kulturo, da se zagotovi optimalna rast s TK kompetentnih celic (19) (38) (39), in (40) za TK6). Splošna navodila za dobro prakso pri vzdrževanju celičnih kultur ter posebna navodila za celice L5178Y in TK6 so na voljo v virih (19) (31) (37) (39) (41). Za laboratorije, ki potrebujejo zaloge izvornih celic za iniciacijo MLA ali TK6 ali pridobitev novih zalog izvornih celic, je na voljo celična shramba z dobro opredeljenimi celicami (37).

### **Gojišča in pogoji kultiviranja**

17. Pri obeh preskusih je treba za vzdrževanje kultur uporabiti ustrezno gojišče in pogoje inkubacije (npr. posode za gojenje, vlažno ozračje s 5 % CO<sub>2</sub>, temperatura inkubacije 37 °C). Celične kulture je treba vedno vzdrževati v pogojih, ki zagotavljajo njihovo rast v logaritemski fazi. Posebno pomembno je, da se izberejo takšna gojišča in pogoji kultiviranja, ki zagotavljajo optimalno rast celic v obdobju izražanja in tvorbo klonov mutiranih in nemutiranih celic. Pri preskusih MLA in TK6 je tudi pomembno, da pogoji kultiviranja zagotavljajo optimalno rast mutant TK z velikimi kolonijami/ki se pojavijo zgodaj in z majhnimi kolonijami/ki se pojavijo pozno. Več podrobnosti o kultiviranju, vključno s potrebo po ustreznem segrevanju neaktivnega konjskega seruma, če se pri selekciji mutant uporablja medij RPMI, je na voljo v virih (19) (31) (38) (39) (40) (42).

### **Priprava kultur**

18. Celice se namnožijo iz osnovnih kultur in nasadijo v gojišče tako na gosto, da suspenzijske kulture med obdobji tretiranja in izražanja še naprej eksponentno rastejo.

### **Presnovna aktivacija**

19. Pri uporabi celic L5178Y in TK6 je treba uporabiti zunanje presnovne sisteme, ker imajo neustrezno notranjo sposobnostjo presnavljanja. Najpogosteje uporabljeni sistem, ki je priporočen kot privzet, razen če ni drugače utemeljeno, je s kofaktorjem dopolnjena postmitohondrijska frakcija (S9), pripravljena iz jeter glodavcev (običajno podgan), ki so bila tretirana s sredstvi za encimsko indukcijo, kot je Aroclor 1254 (43) (44) (45), ali mešanico fenobarbitala in  $\beta$ -naftoflavona (46) (47) (48) (49) (50) (51). Ta mešanica ni v nasprotju s Stockholmsko konvencijo o obstojnih organskih onesnaževalih (52) ter se je v primerjavi s sredstvom Aroclor 1254 izkazala kot enako učinkovita za povzročanje oksidaz z mešano funkcijo (45) (46) (47) (48) (49). Frakcija S9 se na končnem preskusnem gojišču običajno uporablja v koncentracijah, ki se gibljejo v razponu od 1 do 2 vol. %, lahko pa se poveča na 10 vol. %. Na izbiro

vrste in koncentracije zunanjega sistema presnovne aktivacije ali sredstva za indukcijo presnove lahko vpliva razred preskusnih kemikalij.

### **Priprava preskusne kemikalije**

20. Trdne preskusne kemikalije je treba pred tretiranjem celic pripraviti v ustreznih topilih, in če je ustrezno, razredčiti (glej odstavek 21). Tekoče preskusne kemikalije se lahko dodajo neposredno v preskusni sistem in/ali razredčijo pred tretiranjem preskusnega sistema. Plinaste ali hlapne preskusne kemikalije je treba preskusiti z ustrezno prilagojenimi standardnimi protokoli, kot je tretiranje v zatesnjenih posodah za gojenje (53) (54) (55). Preskusne kemikalije je treba pripraviti tik pred tretiranjem, razen če podatki o stabilnosti kažejo, da je shranjevanje sprejemljivo.

## **PRESKUSNI POGOJI**

### **Topila**

21. Izbrati je treba tako topilo, ki optimira topnost preskusne kemikalije in ne vpliva negativno na izvedbo preskusa, npr. ne spremeni rasti celic, ne vpliva na celovitost preskusne kemikalije, ne reagira s posodami za gojenje, ne ovira sistema presnovne aktivacije. Priporočljivo je, da se, kadar koli je to mogoče, najprej razmisli o uporabi vodnega topila (ali gojišča). Zelo uveljavljeni topili sta na primer voda ali dimetil sulfoksid. Organska topila na končnem obdelovalnem gojišču v splošnem ne smejo presežati 1 vol. %, vodna topila (fiziološka raztopina ali voda) pa ne 10 vol. %. Če se uporabljajo neuveljavljena topila (npr. etanol ali aceton), je treba njihovo uporabo podpreti s podatki, ki dokazujejo njihovo združljivost s preskusnimi kemikalijami in preskusnim sistemom ter odsotnost genotoksičnosti pri uporabljeni koncentraciji. Če takšnih podpornih podatkov ni, je treba dodati netretirane kontrole (glej Dodatek 1, Opredelitve pojmov), ki dokazujejo, da izbrano topilo ne povzroča škodljivih ali mutagenih učinkov.

## **MERJENJE CITOTOKSIČNOSTI IN IZBIRA KONCENTRACIJ ZA TRETIRANJE**

22. Pri določanju najvišje koncentracije preskusne kemikalije se je treba izogibati koncentracijam, pri katerih se lahko pojavijo lažno pozitivni odzivi, kot so tisti, ki povzročajo preveliko citotoksičnost (glej odstavek 28), obarjanje (glej odstavek 29) v gojišču ali znatne spremembe vrednosti pH ali osmolarnosti (glej odstavek 8). Če preskusna kemikalija ob dodajanju povzroči znatno spremembo vrednosti pH v gojišču, se lahko vrednost pH prilagodi z dodajanjem pufru v končno obdelovalno gojišče, da se preprečijo lažno pozitivni rezultati in vzdržujejo ustrezni pogoji kultiviranja.

23. Izbira koncentracije temelji na citotoksičnosti in drugih preudarkih (glej odstavke 27–30). Čeprav je lahko koristno, da se zaradi boljšega določanja koncentracij, ki jih je treba uporabiti v glavnem preskusu, citotoksičnost oceni v začetnem preskusu, ta preskus ni obvezen. Tudi če se izvede začetna ocena citotoksičnosti, je treba pri glavnem preskusu še vedno izmeriti citotoksičnost vsake kulture. Če se izvede poskus za določanje območja, mora zajemati širok razpon koncentracij in se lahko konča prvi dan po tretiranju ali pa se nadaljuje drugi dan izražanja in do selekcije mutant (če se zdi, da so uporabljene koncentracije ustrezne).
24. Citotoksičnost je treba določiti za vsako posamezno preskusno kulturo in kontrolno kulturo: metode za preskus MLA (2) in preskus TK6 (15) so opredeljene z mednarodno dogovorjeno prakso.
25. Za različici preskusa MLA z agarjem in mikrotitrsko ploščo: citotoksičnost je treba oceniti z uporabo relativne skupne rasti (RTG), ki sta jo prvotno opredelila Clive in Spector leta 1975 (2). Ta meritev vključuje relativno rast v suspenziji (RSG: preskusna kultura glede na kontrolo s topilom) med tretiranjem celic, čas izražanja in relativno učinkovitost tvorbe klonov (RCE: preskusna kultura glede na kontrolo s topilom) ob selekciji mutant (2). Opozoriti je treba, da relativna rast v suspenziji vključuje morebitno izgubo celic v preskusni kulturi med tretiranjem (za formule glej Dodatek 2).
26. Za preskus TK6: citotoksičnost je treba oceniti na podlagi relativnega preživetja, tj. učinkovitosti tvorbe klonov celic, nasajenih na ploščo takoj po tretiranju, prilagojeni za morebitno izgubo celic med tretiranjem na podlagi štetja celic v primerjavi z negativno kontrolo (ki se ji pripiše 100-odstotno preživetje) (za formulo glej Dodatek 2).
27. Oceniti je treba vsaj štiri preskusne koncentracije (v kar niso vključeni topilo in pozitivne kontrole), ki izpolnjujejo merila za sprejemljivost (ustrezna citotoksičnost, število celic itd.). Čeprav je priporočljiva uporaba podvojenih kultur, se lahko pri vsaki preskušeni koncentraciji uporabi ponovljeni vzorec kulture ali le ena sama tretirana kultura. Rezultate, pridobljene za ponovljene vzorce kultur pri zadevni koncentraciji, je treba navesti ločeno, vendar se lahko za podatkovno analizo združijo (55). Za preskusne kemikalije, ki kažejo malo ali nič citotoksičnosti, so ustrezni približno 2- do 3-kratni intervali med koncentracijami. V primeru citotoksičnosti je treba koncentracije izbrati tako, da zajemajo območje citotoksičnosti od koncentracije, ki povzroča citotoksičnost, kot je opisano v odstavku 28, do vključno koncentracij, pri katerih je citotoksičnost zmerna oziroma majhna ali je ni. Pri številnih preskusnih kemikalijah so vidne strme krivulje odziva na koncentracijo, zato je treba za zajem celotnega območja citotoksičnosti ali podrobno preučevanje odziva na koncentracijo morda uporabiti večje število koncentracij, ki so tesno skupaj, in več

kot štiri koncentracije, zlasti kadar je treba poskus ponoviti (glej odstavek 70). Uporaba več kot štirih koncentracij je lahko še zlasti pomembna, če se uporabi ena sama kultura.

28. Če največja koncentracija temelji na citotoksičnosti, si je treba pri najvišji koncentraciji pri preskusu MLA prizadevati za od 20- do 10- odstotno relativno skupno rast, pri preskusu TK6 pa za od 20-do 10-odstotno relativno preživetje (odstavek 67).
29. Pri slabo topnih preskusnih kemikalijah, ki pri koncentracijah, nižjih od najnižje netopne koncentracije, niso citotoksične, mora najvišja analizirana koncentracija ob koncu tretiranja s preskusno kemikalijo povzročiti nastanek motnosti ali oborine, ki je vidna s prostim očesom ali pod invertnim mikroskopom. Tudi če se citotoksičnost pojavi nad najnižjo netopno koncentracijo, je priporočljivo, da se preskusi le pri eni koncentraciji, ki povzroči nastanek motnosti ali vidne oborine, saj lahko oborina povzroči lažne učinke. Ker se pri preskusih MLA in TK6 uporabljajo suspenzijske kulture, je treba še zlasti paziti, da oborina ne vpliva na izvedbo preskusa. Koristno je lahko tudi, če se pred preskusom določi topnost v gojišču.
30. Če oborina ni vidna ali ni opažene mejne citotoksičnosti, mora najvišja preskusna koncentracija ustrezati 10 mM, 2 mg/ml ali 2 µl/ml, pri čemer se upošteva najnižja od teh koncentracij (57) (58). Če preskusna kemikalija nima določene sestave, kot so snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali (tj. kemijske snovi z neznano ali spremenljivo sestavo (UVCB)), okoljski ekstrakti itd., je v primeru odsotnosti ustrezne citotoksičnosti morda treba povečati najvišjo koncentracijo (npr. 5 mg/ml), da bi se povečala koncentracija vsake posamezne sestavine. Vendar je treba opozoriti, da se lahko pri zdravilih za uporabo v humani medicini te zahteve razlikujejo (59).

## Kontrole

31. Za vsak preskusni pogoj je treba vključiti sočasne negativne kontrole (glej odstavek 21), sestavljene le iz topila v obdelovalnem gojišču, ki je obdelano enako kot kulture za tretiranje.
32. Sočasne pozitivne kontrole so potrebne, da se dokažejo zmožnost laboratorija, da odkrije mutagene pod pogoji uporabljenega preskusnega protokola, učinkovitost zunanega sistema presnovne aktivacije (če je ustrezno) in ustrezna zaznava majhnih/pozno nastalih in velikih/zgodaj nastalih mutant *TK*. Primeri pozitivnih kontrol so navedeni v preglednici 1. Za pozitivno kontrolo se lahko uporabijo tudi druge snovi, če je to utemeljeno. Ker so preskusi genske toksičnosti *in vitro* za celice sesalcev dovolj standardizirani za kratkotrajna tretiranja (3–4 ure), ki se izvedejo sočasno s presnovno aktivacijo in brez nje ter z enakim trajanjem tretiranja, je

uporaba pozitivnih kontrol lahko omejena na mutagen, pri katerem je potrebna presnovna aktivacija. V tem primeru en sam odziv pri pozitivni kontroli dokaže tako dejavnost sistema presnovne aktivacije kot tudi odzivnost preskusnega sistema. Vendar je treba pri dolgotrajnem tretiranju (tj. 24 ur brez S9), če se uporablja, uporabiti lastno pozitivno kontrolo, saj se trajanje tretiranja razlikuje od preskusa, pri katerem se uporablja presnovna aktivacija. Vsako pozitivno kontrolo je treba uporabiti pri eni ali več koncentracijah, pri katerih se pričakuje obnovljivo in zaznavno povečanje glede na ozadje, da se dokaže občutljivost preskusnega sistema, odziva pa ne sme ogroziti citotoksičnost, ki bi presegla meje, določene za to preskusno metodo (glej odstavek 28).

**Preglednica 1:** Referenčne snovi, ki se priporočajo za ocenjevanje usposobljenosti laboratorija in izbor pozitivne kontrole

Kategorija	Snov	Št. CAS
<b>1. Mutageni, aktivni brez presnovne aktivacije</b>		
Metil metansulfonat	66-27-3	
Mitomycin C	50-07-7	
4-nitrokvinolin-N-oksid	56-57-5	
<b>2. Mutageni, pri katerih je potrebna presnovna aktivacija</b>		
Benzo(a)piren	50-32-8	
Ciklofosfamid (monohidrat)	50-18-0 (6055-19-2)	
7,12-dimetilbenzoantracen	57-97-6	
3-metilholantren	56-49-5	

## POSTOPEK

### Tretiranje s preskusno kemikalijo

33. Množeče se celice se tretirajo s preskusno kemikalijo v prisotnosti in odsotnosti sistema presnovne aktivacije. Čas izpostavljenosti mora biti ustrezno dolg (navadno je ustrezno 3–4 ure). Vendar je treba opozoriti, da se lahko pri zdravilih za uporabo v humani medicini te zahteve razlikujejo (59). Pri preskusu MLA se v primerih, ko kratkotrajno tretiranje da negativne rezultate in informacije kažejo, da je potrebno daljše tretiranje (npr. nukleozidni analogi, slabo topne kemikalije (5) (59)), je treba razmisliti o izvedbi preskusa z daljšim tretiranjem, tj. 24 ur brez S9.
34. Najmanjše število celic, ki se za vsako preskusno kulturo (kontrolno in tretirano) uporabijo v vsaki fazi preskusa, mora temeljiti na pogostnosti spontanih mutant. Splošno vodilo je, da se tretira in pasajira dovolj celic v vsaki preskusni kulturi, da se

v vseh fazah preskusa (tretiranje, izražanje fenotipa in selekcija mutant) vzdržuje vsaj 10, v idealnem primeru pa 100 spontanih mutant (56).

35. Pri preskusu MLA je priporočena sprejemljiva pogostnost spontanih mutant med  $35-140 \times 10^{-6}$  (različica z agarjem) in  $50-170 \times 10^{-6}$  (različica z mikrotitrsko ploščo) (glej preglednico 2). Da se za vsako preskusno kulturo dobi vsaj 10 in v idealnem primeru 100 spontanih mutant, ki preživijo tretiranje, je treba tretirati vsaj  $6 \times 10^6$  celic. S tretiranjem takega števila celic in vzdrževanjem dovolj celic med izražanjem in kloniranjem za selekcijo mutant se zagotovi zadostno število spontanih mutant (10 ali več) med vsemi fazami poskusa, tudi za kulture, tretirane pri koncentracijah, ki povzročijo 90-odstotno citotoksičnost (kot je izmerjena z 10-odstotno relativno skupno rastjo) (19) (38) (39).
36. Pri preskusu TK6 pogostnost spontanih mutant na splošno znaša med 2 in  $10 \times 10^{-6}$ . Da se za vsako kulturo dobi vsaj 10 spontanih mutant, ki preživijo tretiranje, je treba tretirati vsaj  $20 \times 10^6$  celic. S tretiranjem takega števila celic se zagotovi zadostno število spontanih mutant (10 ali več), in to tudi za kulture, tretirane pri koncentracijah, ki povzročijo 90-odstotno citotoksičnost med tretiranjem (10-odstotno relativno preživetje). Poleg tega je treba v obdobju izražanja kultivirati zadostno število celic in jih nasaditi na ploščo za selekcijo mutant (60).

#### **Čas izražanja fenotipa ter merjenje citotoksičnosti in pogostnosti mutant**

37. Ob koncu obdobja tretiranja se celice določen čas kultivirajo, da se omogoči skoraj optimalno izražanje fenotipa na novo induciranih mutant; specifičnih za vsako celično linijo. Pri preskusu MLA obdobje izražanja fenotipa traja 2 dni. Pri preskusu TK6 obdobje izražanja fenotipa traja 3–4 dni. Če se uporabi 24-urno tretiranje, se obdobje izražanja začne po koncu tretiranja.
38. V obdobju izražanja fenotipa se celice preštejejo vsak dan. Pri preskusu MLA se na podlagi dnevnega štetja celic izračuna dnevna rast v suspenziji. Po dvodnevem obdobju izražanja se celice suspendirajo v gojišču s selektivno snovjo in brez nje, da se določita število mutant (plošče za selekcijo) oziroma učinkovitost tvorbe klonov (plošče za viabilnost). Pri preskusu MLA obstajata dve enako sprejemljivi metodi kloniranja za selekcijo mutant; pri eni se na 96-jamičnih ploščah uporabi mehki agar, pri drugi pa tekoči medij (19) (38) (39). Kloniranje v TK6 se izvede s tekočim medijem in 96-jamičnimi ploščami (16).
39. Edina priporočena selektivna snov za mutante *TK* je trifluorotimidin (TFT) (61).
40. Pri preskusu MLA se plošče z agarjem in mikrotitrške plošče preštejejo po 10–12 dneh inkubacije. Pri preskusu TK6 se v kolonijah na mikrotitrskih ploščah po 10–14 dneh preštejejo zgodaj nastale mutante. Da se pridobijo počasi rastoče (pozno nastale) mutante TK6, je treba celice po preštetju zgodaj nastalih mutant znova napojiti z

rastnim medijem in TFT ter nato plošče inkubirati še nadaljnjih 7–10 dni (62). Za razpravo v zvezi s štetjem počasi in normalno rastočih mutant *TK* glej odstavka 42 in 44.

41. Ustrezni izračuni za oba preskusa, vključno z obema metodama (z agarjem in mikrotitrsko ploščo), za preskus MLA so v Dodatku 2. Pri metodi MLA z agarjem se kolonije preštejejo, število mutiranih kolonij pa se prilagodi z učinkovitostjo tvorbe klonov, da se izračuna pogostnost mutant. Pri različici preskusov MLA in TK6 z mikrotitrsko ploščo se učinkovitost tvorbe klonov na ploščah za selekcijo in učinkovitost tvorbe klonov določi v skladu s Poissonovo porazdelitvijo (63). Pogostnost mutant se izračuna na podlagi teh dveh učinkovitosti tvorbe klonov.

### **Opredelitev lastnosti mutirane kolonije**

42. Če da preskusna kemikalija pri preskusu MLA pozitiven rezultat (glej odstavka 62 in 63), je treba opredeliti lastnosti kolonij z razvrstitvijo kolonij po velikosti ali rasti pri vsaj eni od preskusnih kultur (običajno najvišja sprejemljiva pozitivna koncentracija) ter pri negativnih in pozitivnih kontrolnih vzorcih. Če da preskusna kemikalija negativen rezultat (glej odstavek 64), je treba opredeliti lastnosti mutirane kolonije pri negativnih in pozitivnih kontrolnih vzorcih. Pri metodi preskusa MLA z mikrotitrsko ploščo so mutante z majhnimi kolonijami opredeljene kot tiste, ki prekrivajo manj kot 25 % premera jamice, mutante z velikimi kolonijami pa kot tiste, ki prekrivajo več kot 25 % premera jamice. Pri metodi z agarjem se za štetje mutiranih kolonij in razvrstitev kolonij po velikosti uporablja avtomatski števec kolonij. Pristopi k razvrščanju kolonij po velikosti so podrobno opisani v virih (19) (38) (40). Opredelitev lastnosti kolonij pri negativnem in pozitivnem kontrolnem vzorcu je potrebna kot dokaz, da se študije izvajajo ustrezno.
43. Za preskusno kemikalijo ni mogoče ugotoviti, da daje negativen rezultat, če mutante z velikimi in majhnimi kolonijami v pozitivnem kontrolnem vzorcu niso ustrezno zaznane. Z opredelitvijo lastnosti kolonij se lahko zagotovijo splošne informacije v zvezi s sposobnostjo preskusne kemikalije, da povzroči točkovne mutacije in/ali kromosomske pojave (odstavek 4).
44. TK6: normalno rastoče in počasi rastoče mutante se razlikujejo po različnem času inkubacije (glej odstavek 40). Na splošno se pri TK6 zgodnje in pozno nastale mutante preštejejo v vseh kulturah, vključno z negativnimi in pozitivnimi kontrolnimi vzorci. Opredelitev lastnosti kolonij pri negativnem in pozitivnem kontrolnem vzorcu je potrebna kot dokaz, da se študije izvajajo ustrezno. Za preskusno kemikalijo ni mogoče ugotoviti, da daje negativen rezultat, če zgodaj nastale in pozno nastale mutante v pozitivnem kontrolnem vzorcu niso ustrezno zaznane. Z opredelitvijo lastnosti kolonij se lahko zagotovijo splošne informacije v zvezi s sposobnostjo

preskusne kemikalije, da povzroči točkovne mutacije in/ali kromosomske pojave (odstavek 4).

### **Usposobljenost laboratorija**

45. Preden se začne laboratorij uporabljati za rutinsko preskušanje, mora izvesti sklop preskusov z referenčnimi pozitivnimi snovmi, ki delujejo z različnimi mehanizmi (vsaj ena aktivna s presnovno aktivacijo in ena aktivna brez presnovne aktivacije, izbrani med snovmi s seznama v preglednici 1), in različnimi negativnimi kontrolami (vključno z netretiranimi kulturami in različnimi topili/vehikli), s čimer dokaže, da ima zadostne izkušnje s preskusom. Ti odzivi pozitivnih in negativnih kontrol morajo biti skladni z viri. Ta zahteva ne velja za laboratorije, ki imajo izkušnje, tj. ki imajo na voljo zbirko podatkov iz preteklih preskusov, kot je opredeljena v odstavkih 47–50. Pri preskusu MLA morajo biti vrednosti, dobljene za pozitivni in negativni kontrolni vzorec, skladne s priporočili IWGT (glej preglednico 2).
46. Izbor snovi za pozitivno kontrolo (glej preglednico 1) je treba preiskati s kratkotrajnim in dolgotrajnim tretiranjem (če se uporablja dolgotrajno tretiranje) brez presnovne aktivacije ter kratkotrajnim tretiranjem ob presnovni aktivaciji, da se dokaže usposobljenost za odkrivanje mutagenih kemikalij, določi učinkovitost sistema presnovne aktivacije ter dokaže ustreznost pogojev za rast celic med tretiranjem, izražanjem fenotipa in selekcijo mutant ter dokaže ustreznost postopkov štetja. Izbrati je treba območje koncentracij izbranih kemikalij, kar omogoča ponovljiva in s koncentracijo povezana povečanja glede na ozadje, da se pokažeta občutljivost in dinamično območje preskusnega sistema.

### **Podatki o kontrolah iz preteklih preskusov**

47. Laboratorij mora določiti:
  - območje in porazdelitev pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov ter
  - območje in porazdelitev negativnih kontrol (netretirane, topilo) iz preteklih preskusov.
48. Ko se podatki za porazdelitev negativnih kontrol iz preteklih preskusov pridobivajo prvič, morajo biti sočasne negativne kontrole skladne z objavljenimi podatki o negativnih kontrolah. Ko se k porazdelitvi kontrol doda več podatkov o preskusu, sočasne negativne kontrole po možnosti ne bi smele preseči 95-odstotne kontrolne meje za navedeno porazdelitev (64) (65).
49. Zbirka podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov mora sprva temeljiti na vsaj 10 preskusih, po možnosti pa mora biti sestavljena iz vsaj 20 preskusov, izvedenih v primerljivih preskusnih pogojih. Laboratoriji morajo uporabljati metode nadzora kakovosti, kot so kontrolne karte (npr. c-karte ali karte ,X-

črta' (65)), da opredelijo, kako variabilni so njihovi podatki o pozitivnih in negativnih kontrolah, in pokažejo, da je metodologija v njihovem laboratoriju ‚pod nadzorom‘ (66). Nadaljnje podrobnosti in priporočila o tem, kako zbrati in uporabiti podatke iz preteklih preskusov, so navedeni v virih (64).

50. V podatke o negativnih kontrolah je treba vključiti pogostnost mutant iz ene kulture ali po možnosti ponovljenih vzorcev kultur, kot je opisano v odstavku 27. Sočasne negativne kontrole po možnosti ne smejo preseči 95-odstotne kontrolne meje porazdelitve iz zbirke podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov. Kadar podatki o negativni kontroli presežejo 95-odstotno kontrolno mejo, jih je sprejemljivo vključiti v porazdelitev kontrol iz preteklih preskusov, če ti podatki niso izjemni osamelci ter če obstajata dokaz, da je preskusni sistem ‚pod nadzorom‘ (glej odstavek 49), in dokaz o odsotnosti tehničnih ali človeških napak.
51. Vsako spremembo v protokolu poskusa je treba preučiti glede na skladnost z obstoječimi zbirkami podatkov laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov. Če se pojavijo večje neskladnosti, je treba ustvariti novo zbirko podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov.

## **PODATKI IN POROČANJE**

### **Predstavitev rezultatov**

52. Predstavitev podatkov za preskusa MLA in TK6 mora za tretirane in kontrolne kulture vključevati podatke, potrebne za izračun citotoksičnosti (relativna skupna rast (RTG) oziroma relativno preživetje (RS)) in pogostnosti mutant, kot je opisano v nadaljevanju.
53. Pri preskusu MLA je treba za posamezno kulturo zagotoviti podatke o relativni rasti v suspenziji (RSG), relativni skupni rasti (RTG), učinkovitosti tvorbe klonov ob selekciji mutant in številu mutiranih kolonij (za različico z agarjem) ali številu praznih jamic (za različico z mikrotitrsko ploščo). Pogostnost mutant je treba izraziti kot število mutiranih celic na milijon preživelih celic. Če je odziv pozitiven, je treba navesti pogostnosti mutant z majhnimi in velikimi kolonijami (in/ali delež skupne pogostnosti mutant) vsaj za eno koncentracijo preskusne kemikalije (običajno najvišja pozitivna koncentracija) ter negativno in pozitivno kontrolo. V primeru negativnega odziva je treba pogostnost mutant z majhnimi in velikimi kolonijami navesti za negativno in pozitivno kontrolo.
54. Pri preskusu TK6 je treba za posamezno kulturo zagotoviti podatke o relativnem preživetju (RS), učinkovitosti tvorbe klonov ob selekciji mutant in številu praznih jamic za zgodaj nastale in pozno nastale mutante. Pogostnost mutant je treba izrazi kot število mutiranih celic na število preživelih celic, vključevati pa mora skupno

pogostnost mutant ter pogostnost mutant (in/ali delež skupne pogostnosti mutant) zgodaj nastalih in pozno nastalih mutant.

### **Merila za sprejemljivost**

55. Pri preskusih MLA in TK6 morajo biti izpolnjena naslednja merila, preden se določijo splošni rezultati za posamezno preskusno kemikalijo:

- izvedena sta bila dva preskusna pogoja (kratkotrajno tretiranje s presnovno aktivacijo in brez nje – glej odstavke 33), razen če so bili pri enem dobljeni pozitivni rezultati;
- analizirati mora biti mogoče ustrezno število celic in koncentracij (glej odstavke 27 in od 34 do 36);
- merila za izbor najvišje koncentracije so skladna z merili, opisanimi v odstavkih od 28 do 30.

### *Merila za sprejemljivost negativnih in pozitivnih kontrol*

56. Analiza obsežne količine podatkov o MLA, ki jo je opravila strokovna delovna skupina IWGT za MLA, je privedla do mednarodnega soglasja o posebnih merilih za sprejemljivost preskusa MLA (1) (2) (3) (4) (5). Zato ta preskusna metoda zagotavlja posebna priporočila za določanje sprejemljivosti negativnih in pozitivnih kontrol ter za ocenjevanje rezultatov posameznih snovi pri preskusu MLA. Preskus TK6 ima veliko manjšo zbirko podatkov in ga delovna skupina ni ocenila.

57. Pri preskusu MLA je treba za vsak poskus oceniti, ali netretirana kontrola/kontrola s topilom izpolnjuje merila za sprejemljivost delovne skupine IWGT za MLA ((4) in preglednica 2 v nadaljevanju) v zvezi s: (1) pogostnostjo mutant (upoštevati je treba, da so pogostnosti mutant, sprejemljive po IWGT, različne za različici preskusa MLA z agarjem in mikrotitrsko ploščo), (2) učinkovitostjo tvorbe klonov ob selekciji mutant in (3) rastjo v suspenziji za kontrolo s topilom (za formule glej Dodatek 2).

**Preglednica 2:** Merila za sprejemljivost preskusa MLA

<b>Parameter</b>	<b>Metoda z mehkim agarjem</b>	<b>Metoda z mikrotitrsko ploščo</b>
<b>Pogostnost mutant</b>	35–140 x 10 <sup>-6</sup>	50–170 x 10 <sup>-6</sup>
<b>Učinkovitost tvorbe klonov</b>	65–120 %	65–120 %
<b>Rast v suspenziji</b>	8–32-kratna (3–4-urno tretiranje) 32–180-kratna (24-urno tretiranje, če se izvede)	8–32-kratna (3–4-urno tretiranje) 32–180-kratna (24-urno tretiranje, če se izvede)

58. Pri preskusu MLA je treba za vsak preskus oceniti tudi, ali pozitivne kontrole izpolnjujejo vsaj eno od naslednjih dveh meril za sprejemljivost, ki ju je razvila delovna skupina IWGT:
- pri pozitivni kontroli je treba dokazati absolutno povečanje skupne pogostnosti mutant, tj. povečanje nad spontano pogostnost mutant v ozadju (inducirana pogostnost mutant), ki znaša vsaj  $300 \times 10^{-6}$ . Vsaj 40 % inducirane pogostnosti mutant se mora kazati v pogostnosti mutant v majhni koloniji;
  - pozitivna kontrola ima povečano pogostnost mutant v majhni koloniji, ki znaša vsaj  $150 \times 10^{-6}$  nad tisto v sočasni netretirani kontroli/kontroli s topilom (inducirana pogostnost mutant v majhni koloniji znaša  $150 \times 10^{-6}$ ).
59. Preskus TK6 je sprejemljiv, če se podatki o sočasni negativni kontroli štejejo kot sprejemljivi za vključitev v zbirko podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov, kot je opisano v odstavkih 48 in 49. Poleg tega morajo sočasne pozitivne kontrole (glej odstavek 32) povzročiti odzive, ki so skladni z odzivi iz zbirke podatkov o pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov, in statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo.
60. Pri obeh preskusih mora biti zgornja meja citotoksičnosti, opažene v pozitivni kontrolni kulturi, enaka kot pri poskusnih kulturah. To pomeni, da relativna skupna rast (RTG)/relativno preživetje (RS) ne sme biti manjše od 10 %. Zadostuje, da se uporabi ena koncentracija (ali ena od koncentracij pozitivnih kontrolnih kultur, če se uporabi več kot ena koncentracija) za dokaz, da so izpolnjena merila za sprejemljivost pozitivne kontrole. Dalje, pogostnost mutant v pozitivni kontroli mora biti znotraj sprejemljivega območja, določenega za laboratorij.

### **Vrednotenje in razlaga rezultatov**

61. Za preskus MLA je pomembno delo o biološki pomembnosti in merilih za pozitivni odziv opravila strokovna delovna skupina IWGT za limfom miši (4). Zato ta preskusna metoda zagotavlja specifična priporočila za razlago rezultatov preskusne kemikalije pri preskusu MLA (glej odstavke od 62 do 64). Preskus TK6 ima veliko manjšo zbirko podatkov in ga delovna skupina ni ocenila. Zato so priporočila za razlago podatkov za preskus TK6 splošnejša (glej odstavka 65 in 66). Za oba preskusa veljajo dodatna priporočila (glej odstavke od 67 do 71).

### *MLA*

62. Priporočen je pristop za opredelitev pozitivnih in negativnih odzivov, ki zagotavlja, da je povečana pogostnost mutant biološko pomembna. Namesto statistične analize, ki se običajno uporablja pri drugih preskusih, temelji na uporabi vnaprej določene inducirane pogostnosti mutant (tj. povečanje pogostnosti mutant nad sočasno kontrolo), imenovane splošni ocenjevalni faktor (Global Evaluation Factor (GEF)), ki

temelji na analizi porazdelitve podatkov o pogostnosti mutant pri negativni kontroli, pridobljenih od sodelujočih laboratorijev (4). Pri različici preskusa MLA z agarjem GEF znaša  $90 \times 10^{-6}$ , pri različici preskusa MLA z mikrotitrsko ploščo pa GEF znaša  $126 \times 10^{-6}$ .

63. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje kot jasno pozitivna, če v katerem koli od preučevanih preskusnih pogojev (glej odstavek 33) povečanje pogostnosti mutant nad hkratno ozadje presega GEF in je povečanje povezano s koncentracijo (npr. z uporabo trendnega testa). Za preskusno kemikalijo se nato šteje, da lahko povzroči nastanek mutacij v tem preskusnem sistemu.
64. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno negativno, če v katerem koli od preučevanih preskusnih pogojev (glej odstavek 33) ni odziva, povezanega s koncentracijo, ali pa če v primeru povečanja pogostnosti mutant ta ne presega GEF. Za preskusno kemikalijo se nato šteje, da ne more povzročiti nastanka mutacij v tem preskusnem sistemu.

#### *TK6*

65. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno pozitivno, če se v katerem koli od preučevanih preskusnih pogojev (glej odstavek 33):
- pri vsaj eni od preskusnih koncentracij pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;
  - pojavi povečanje, povezano z odmerkom, kadar se ocenjuje z ustreznim trendnim testom (glej odstavek 33);
  - pojavijo rezultati zunaj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi; glej odstavek 48).

Ko so izpolnjena vsa ta merila, se nato šteje, da lahko preskusna kemikalija povzroči nastanek mutacij v tem preskusnem sistemu. Priporočila glede najustreznejših statističnih metod so navedena v virih (66) (67).

66. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno negativno, če se v katerem koli od preučevanih preskusnih pogojev (glej odstavek 33):
- pri nobeni od preskusnih koncentracij ne pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;
  - ne pojavi povečanje, povezano s koncentracijo, kadar se ocenjuje z ustreznim trendnim testom;

- vsi rezultati nahajajo znotraj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi; glej odstavek 48).

Za preskusno kemikalijo se nato šteje, da ne more povzročiti nastanka mutacij v tem preskusnem sistemu.

*Za preskusa MLA in TK6:*

67. Če največja koncentracija temelji na citotoksičnosti, si je treba pri najvišji koncentraciji prizadevati za od 20- do 10-odstotno relativno skupno rast (RTG)/relativno preživetje (RS). Enotno stališče je, da je potrebna pazljivost pri razlagi pozitivnih rezultatov, ki znašajo samo med 20 in 10 % relativne skupne rasti (RTG)/relativnega preživetja (RS), rezultat pa se ne bi štel za pozitiven, če bi se povečanje pogostnosti mutant pojavilo samo pri 10-odstotni relativni skupni rasti/relativnim preživetjem ali pod tem pragom (če je ocenjeno) (2) (59).
68. V nekaterih okoliščinah so lahko dodatne informacije v pomoč pri določitvi, da preskusna kemikalija ni mutagena, če ni kulture, pri kateri bi vrednost relativne skupne rasti (RTG) znašala 10–20 % relativne skupne rasti/relativnega preživetja. Ti primeri so predstavljeni v nadaljevanju: (1) ni dokazov o mutagenosti (npr. ni odziva na odmerek, ni pogostnosti mutant nad tistimi pri sočasni negativni kontroli ali razponi pri preteklih preskusih v ozadju itd.) v nizu podatkovnih točk znotraj od 100- do 20-odstotne relativne skupne rasti/relativnega preživetja, obstaja pa tudi vsaj ena podatkovna točka med 20- in 25-odstotno relativno skupno rastjo/relativnim preživetjem; (2) ni dokazov o mutagenosti (npr. ni odziva na odmerek, ni pogostnosti mutant nad tistimi pri sočasni negativni kontroli ali razponi pri preteklih preskusih v ozadju itd.) v nizu podatkovnih točk med 100- in 25-odstotno relativno skupno rastjo/relativnim preživetjem, obstaja pa tudi negativna podatkovna točka rahlo pod 10-odstotno relativno skupno rastjo/relativnim preživetjem. V obeh teh primerih je mogoče sklepati, da je preskusna kemikalija negativna.
69. Preverjanje jasno pozitivnega ali jasno negativnega odziva ni potrebno.
70. Če odziv ni niti jasno negativen niti jasno pozitiven, kot je opisano zgoraj, in/ali za podporo pri ugotavljanju biološke pomembnosti rezultatov, je treba podatke oceniti s strokovno presojo in/ali nadaljnji preiskavami. Ponovitev poskusa je lahko koristna, tako da se po možnosti uporabijo spremenjeni poskusni pogoji (npr. razmik med koncentracijami za povečanje verjetnosti, da bodo dosežene podatkovne točke v razponu od 10- do 20-odstotne relativne skupne rasti/relativnega preživetja, z uporabo drugih pogojev za presnovno aktivacijo (tj. koncentracija ali izvor S9) in trajanja tretiranja).

71. Zbirka podatkov v redkih primerih celo po izvedbi nadaljnjih preiskav onemogoča sprejetje sklepa o pozitivnih ali negativnih rezultatih. Zato je treba zaključiti, da je odziv na preskusno kemikalijo dvoumen (kar pomeni, da je enako verjetno pozitiven ali negativen).

## **POROČILO O PRESKUSU**

72. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

### *Preskusna kemikalija:*

- vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;
- stabilnost preskusne kemikalije, če je znana;
- topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu, če sta znani;
- meritve vrednosti pH, osmolarnosti in oborine v gojišču, ki mu je bila dodana preskusna kemikalija, če je ustrezno.

### Snov iz ene sestavine:

- fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;
- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

### Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

- čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

### *Topilo:*

- utemeljitev izbire topila;
- delež topila v končnem gojišču.

### *Celice:*

#### za laboratorijske izvorne kulture:

- vrsta in izvor celic ter pretekli rezultati v preskuševalnem laboratoriju;
- lastnosti kariotipa in/ali modalno število kromosomov;
- metode vzdrževanja celičnih kultur;
- odsotnost mikoplazem;
- podvojitveni čas celic.

#### *Preskusni pogoji:*

- razlogi za izbiro koncentracij in števila celičnih kultur, vključno z npr. podatki o citotoksičnosti in mejah topnosti;
- sestava gojišča, koncentracija CO<sub>2</sub>, stopnja vlažnosti;
- koncentracija preskusne kemikalije, izražena kot končna koncentracija v gojišču (npr. v µg ali mg/ml ali mM gojišča);
- koncentracija (in/ali količina) topila in preskusne kemikalije, ki se dodata v gojišče;
- temperatura inkubacije;
- čas inkubacije;
- trajanje tretiranja;
- gostota celic med tretiranjem;
- vrsta in sestava sistema presnovne aktivacije (vir S9, način priprave zmesi S9, koncentracija ali količina zmesi S9 in S9 v končnem gojišču, nadzor kakovosti S9);
- snovi pozitivne in negativne kontrole, končne koncentracije za vsak pogoj tretiranja;
- dolžina časa izražanja (skupaj s številom nasajenih celic ter programom kultiviranja na novem gojišču in dodajanja hranil, če je to primerno);
- identiteta selektivne snovi in njena koncentracija;
- pri preskusu MLA je treba navesti uporabljeno različico (z agarjem ali mikrotitrsko ploščo);
- merila za sprejemljivost preskusov;
- uporabljene metode za določanje števila viabilnih in mutiranih celic;
- uporabljene metode za merjenje citotoksičnosti;
- vsi dodatni podatki, pomembni za citotoksičnost in uporabljeno metodo;
- trajanje inkubacije po nasaditvi na ploščo;
- opredelitev, katera velikost in tip kolonij se upoštevata (vključno z merili za ‚majhne‘ in ‚velike‘ kolonije, če je to primerno);
- merila za obravnavanje študij kot pozitivnih, negativnih ali dvoumnih;
- uporabljene metode za določitev vrednosti pH, osmolarnosti, če se opravi, in obarjanja, če je ustrezno.

#### *Rezultati:*

- število tretiranih celic in število celic, kultiviranih na novem gojišču, za vsako kulturo;

- parametri toksičnosti (relativna skupna rast za MLA in relativno preživetje za TK6);
- znaki obarjanja in čas odkritja;
- število celic, nasajenih v selektivno in neselektivno gojišče;
- število kolonij v neselektivnem gojišču in število odpornih kolonij v selektivnem gojišču ter s tem povezani pogostnosti mutant;
- razvrščanje kolonij po velikosti pri negativni in pozitivni kontroli, ter če je preskusna kemikalija pozitivna, vsaj ena koncentracija in s tem povezane pogostnosti mutant;
- razmerje med koncentracijo in odzivom, kadar je mogoče;
- podatki o sočasnih negativnih (s topilom) in pozitivnih kontrolah (koncentracije in topila);
- podatki o pretekli negativni (topilo) in pozitivni kontroli (koncentracije in topila) z območji, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni; število preskusov, na katerih temeljijo pretekle kontrole;
- statistične analize (za posamezne kulture in združene ponovljene vzorce, če je ustrezno) in p-vrednosti, če obstajajo; pri MLA pa ocena GEF.

*Razprava o rezultatih*

*Sklepna ugotovitev*

## VIRI

- (1) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J. (poročevalec), 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., in Stankowski, L. F., Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35 (3): 185–190.
- (2) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H., in Stankowski, L. F., Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (april 2000), *Environ. Mol. Mutagen.*, 40 (4): 292–299.
- (3) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L. F., Jr., Thakur, A., Wakuri, S., in Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, *Mutation Res.*, 540: 127–140.
- (4) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L. F., Jr., Thakur, A. K., Van Goethem, F., Wakuri, S., in Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, *Environ. Mol. Mutagen.*, 47 (1): 1–5.
- (5) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D. A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L. F., Jr., Thakur, A. K., in Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the

International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, *Mutation Res.*, 627 (1): 36–40.

- (6) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, št. 234, OECD, Pariz.
- (7) Fellows, M. D., Luker, T., Cooper, A., in O'Donovan, M. R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. *Mutation Res.*, 746 (1): 21–28.
- (8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T., in Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. *Mutation Res.*, 493 (1–2): 101–114.
- (9) Wang, J., Sawyer, J. R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N., in Moore, M. M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol. Sci.*, 109 (1): 96–105.
- (10) Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A., in Hozier, J. C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. *Proc. National. Academy. Sci. USA*, 87 (1): 51–55.
- (11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B., in Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/TK<sup>+/-</sup> Leads to TK<sup>-/-</sup> Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, *Mutation Res.*, 84 (1): 169–181.
- (12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D., in Moore, M. M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y TK<sup>-/-</sup> Mutants Early in their Clonal History, *Mutation Res.*, 147 (5): 237–242.
- (13) Moore, M. M., Clive, D., Hozier, J. C., Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T., in Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/TK<sup>+/-</sup> Mouse Lymphoma Cells. *Mutation Res.*, 151 (1): 161–174.
- (14) Liber, H. L., Call, K. M., in Little, J. B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. *Mutation Res.*, 178 (1): 143–153.
- (15) Li, C. Y., Yandell, D. W., in Little, J. B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. *Somat. Cell Mol. Genet.*, 18 (1): 77–87.

- (16) Honma, M., Hayashi, M., in Sofuni, T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. *Mutation Res.*, 374 (1): 89–98.
- (17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J. B., Sofuni, T., in Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. *Mol. Carcinogen.*, 28 (4): 203–14.
- (18) Amundson, S. A., in Liber, H. L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. *Mutation Res.*, 267 (1): 89–95.
- (19) Schisler, M. R., Moore, M. M., in Gollapudi, B. B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y TK<sup>+/−</sup>-3.7.2C) Forward Mutation Assay. In *Protocols in Genotoxicity Assessment* A. Dhawan and M. Bajpayee (ur.), Springer Protocols, Humana Press: 27–50.
- (20) Long, L. H., Kirkland, D., Whitwell, J., in Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, *Mutation Res.*, 634 (1-2): 177–183.
- (21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I., in Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environ. Mol. Mutagen.*, 49 (6): 439–452.
- (22) Brusick, D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. *Environ. Mutagen.*, 8 (6): 879–886.
- (23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I., in Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268 (2): 297–305.
- (24) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Jr., Brusick, D., Ashby, J., in Myhr, B. C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257: 147–204.
- (25) Wang, J., Heflich, R. H., in Moore, M. M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. *Mutation Res.*, 626 (1-2): 185–190.
- (26) Fischer, G. A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. *Ann. N.Y. Academy Sci.*, 76: 673–680.

- (27) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson, A. G., in Brown, M. M. M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK<sup>+/-</sup> Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. *Mutation Res.*, 59(1): 61–108.
- (28) Sawyer, J., Moore, M. M., Clive, D., in Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK<sup>+/-</sup> 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 147 (5): 243–253.
- (29) Sawyer, J. R., Moore, M. M., in Hozier, J. C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK<sup>+/-</sup> Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 214 (2): 181–193.
- (30) Sawyer, J. R., Binz, R. L., Wang, J., in Moore, M. M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y TK<sup>+/-</sup>-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Environ. Mol. Mutagen.*, 47 (2): 127–131.
- (31) Fellows, M. D., McDermott, A., Clare, K. R., Doherty, A., in Aardema, M. J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y TK<sup>+/-</sup> Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, *Environ. Mol. Mutagen.*, 55 (1): 35–42.
- (32) Storer, R. D., Jraynak, A. R., McKelvey, T. W., Elia, M. C., Goodrow, T. L., in DeLuca, J. G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y TK<sup>+/-</sup> Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. *Mutation. Res.*, 373 (2): 157–165.
- (33) Clark, L. S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S. H., in Moore, M. M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. *Mutagen.*, 19 (4): 263–268.
- (34) Skopek, T. R., Liber, H. L., Penman, B. W., in Thilly, W. G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 84 (2): 411–416.
- (35) Honma, M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45 (2-3): 162–176.
- (36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y. H., Tsang, N. M., Yandell, D. W., Kelsey, K. T., in Liber, H. L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. *Cancer. Res.*, 55 (1): 12–15.

- (37) Lorge, E., 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., in Kirkland, D. J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Rokopis v pripravi).
- (38) Lloyd, M., in Kidd, D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ur. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35–54.
- (39) Mei, N., Guo, X., in Moore, M. M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. V: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan, Z., in Caldwell (ur.) , 2. izdaja, GW; Humana Press, Totowa, NJ.
- (40) Liber, H. L., in Thilly, W. G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. *Mutation Res.*, 94 (2): 467–485.
- (41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, O. W., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G., in Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. *ATLA*, 33 (3): 261–287.
- (42) Moore, M. M., in Howard, B. E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, *Mutation Res.*, 104 (4-5): 287–294.
- (43) Ames, B. N., McCann, J., in Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31 (6): 347–364.
- (44) Maron, D. M., in Ames, B. N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113 (3-4): 173–215.
- (45) Natarajan, A. T., Tates, A. D., Van Buul, P. P. W., Meijers, M., in De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation Res.*, 37 (1): 83–90.

- (46) Matsuoka, A., Hayashi, M., in Ishidate, M., Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. *Mutation Res.*, 66 (3): 277–290.
- (47) Ong, T. M., *et al.* (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4 (1): 55–65.
- (48) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M., in Wolf, R. C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagen.*, 7 (3): 175–177.
- (49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K., in Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. V: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres, F. J., *et al.* (ur.), Elsevier, North-Holland, str. 85–88.
- (50) Galloway, S. M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. *Mutation Res.*, 312 (3): 241–261.
- (51) Johnson, T. E., Umbenhauer, D. R., in Galloway, S. M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28 (1): 51–59.
- (52) UNEP (2001). Stockholmska konvencija o obstojnih organskih onesnaževalih, Program Združenih narodov za okolje (UNEP).
- (53) Krahn, D. F., Barsky, F. C., in McCooey, K. T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. V: Genotoxic Effects of Airborne Agents, Tice, R. R., Costa, D. L., in Schaich, K. M. (ur.) New York, Plenum, str. 91–103.
- (54) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P., in Brooks, A. L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environ. Mutagen.*, 5 (6): 795–801.
- (55) Asakura, M., Sasaki, T., Sugiyama, T., Arito, H., Fukushima, S., in Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. *Mutation Res.*, 652 (2): 122–130.

- (56) Arlett, C. F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. V: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D. J. (ur.), Cambridge University Press, str. 66–101.
- (57) Morita, T., Honma, M., in Morikawa, K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. *Mutation Res.*, 741 (1-2): 32–56.
- (58) Brookmire, L., Chen, J. J., in Levy, D. D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environ. Mol. Mutagen.*, 54 (1): 36–43.
- (59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Na voljo na: [<https://www.federalregister.gov/a/2012-13774>].
- (60) Honma, M., in Hayashi, M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 52 (5): 373–384.
- (61) Moore-Brown, M. M., Clive, D., Howard, B. E., Batson, A. G., in Johnson, K. O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient (TK<sup>-/-</sup>) Mutants from L5178Y/TK<sup>+/-</sup> Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res.*, 85 (5): 363–378.
- (62) Liber, H. L., Yandell, D. W., in Little, J. B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. *Mutation Res.*, 216 (1): 9–17.
- (63) Furth, E. E., Thilly, W. G., Penman, B. W., Liber, H. L., in Rand, W. M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. *Anal. Biochem.*, 110 (1): 1–8.
- (64) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J., in Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, *Mutation Res.*, 723 (2): 87–90.
- (65) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. John Wiley and Sons, New York, 2. izdaja.

- (66) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 199), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (67) Fleiss, J. L., Levin, B., in Paik, M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, tretja izdaja, New York: John Wiley & Sons.

## Dodatek 1

### **OPREDELITVE POJMOV**

Anevgen: vsaka kemikalija ali proces, na podlagi katerega pride do aneuploidije v celicah ali organizmih zaradi reagiranja z elementi mitotskega in mejoznega cikla delitve celic.

Aneuploidija: vsako odstopanje od normalnega diploidnega (ali haploidnega) števila kromosomov za en ali več kot en kromosom, vendar ne za celotni set kromosomov (poliploidija).

Mutageni substitucije baznih parov: kemikalije, ki povzročijo zamenjavo baznih parov v DNK.

Kemikalija: snov ali zmes.

Učinkovitost tvorbe klonov: delež celic, nasajenih na ploščo pri nizki gostoti in sposobnih zrasti v kolonijo, ki jo je mogoče prešteti.

Klastogen: vsaka kemikalija ali proces, ki povzroči strukturne kromosomske aberacije v populacijah celic ali organizmih.

Citotoksičnost: za poskuse, zajete v tej preskusni metodi, je citotoksičnost opredeljena kot zmanjšanje relativne skupne rasti ali relativnega preživetja pri preskusu MLA oziroma preskusu TK6.

Napredna mutacija: genska mutacija starševskega tipa mutirane oblike, ki povzroči spremembo ali izgubo encimskega delovanja ali funkcije kodiranega proteina.

Mutageni premika bralnega okvira: kemikalije, ki povzročijo adicijo ali delecijo enega ali več baznih parov v molekuli DNK.

Genotoksično: splošni izraz, ki zajema vse poškodbe DNK ali kromosomov, vključno s prelomi DNK, adukti, prerazporeditvami, mutacijami, aberacijami kromosomov in aneuploidijo. Vsi genotoksični učinki ne povzročijo nastanka mutacij ali trajnih kromosomskih poškodb.

Mitotična rekombinacija: med mitozo rekombinacija med homolognimi kromatidi, ki lahko povzroči indukcijo prelomov dvojne vijačnice DNK ali izgubo heterozigotnosti.

Mutageno: povzroča dedno spremembo zaporedij baznih parov DNK v genih ali strukture kromosomov (kromosomske aberacije).

Pogostnost mutant: število opaženih mutiranih celic, deljeno s številom viabilnih celic.

Čas izražanja fenotipa: čas po tretiranju, v katerem je genetsko spreminjanje fiksno znotraj genoma, vsi morebitni predhodno obstoječi genski produkti pa se odstranijo,

tako da se spremeni fenotipska lastnost.

Relativno preživetje: relativno preživetje se uporablja kot merilo za citotoksičnost, povezano s tretiranjem, pri preskusu TK6. Pomeni relativno učinkovitost tvorbe klonov celic, nasajenih na ploščo takoj po tretiranju celic, prilagojeno z morebitno izgubo celic med tretiranjem, v primerjavi z učinkovitostjo tvorbe klonov pri negativni kontroli.

Relativna rast v suspenziji: pri preskusu MLA relativna skupna dvodnevna rast preskusne kulture v suspenziji v primerjavi s skupno dvodnevno rastjo negativne kontrole/kontrole s topilom v suspenziji (Clive in Spector, 1975). Relativna rast v suspenziji mora vključevati relativno rast preskusne kulture v primerjavi z negativno kontrolo/kontrolo s topilom v obdobju tretiranja.

Relativna skupna rast: relativna skupna rast se uporablja kot merilo za citotoksičnost, povezano s tretiranjem, pri preskusu MLA. Je merilo relativne (glede na kontrolo z vehiklom) rasti preskusnih kultur med fazami kloniranja v preskusu, ki obsegajo tretiranje, dvodnevno izražanje in selekcijo mutant. Relativna rast vsake preskusne kulture v suspenziji se pomnoži z relativno učinkovitostjo tvorbe klonov pri preskusni kulturi ob selekciji mutant in izrazi glede na učinkovitost tvorbe klonov pri negativni kontroli/kontroli s topilom (Clive in Spector, 1975).

Frakcije S9, pripravljene iz jeter: supernatant iz homogenata jeter po centrifugiranju pri 9 000 g, tj. izvleček surovih jeter.

Mešanica S9: mešanica frakcije S9, pripravljene iz jeter, in kofaktorjev, potrebnih za dejavnosti presnovnih encimov.

Rast v suspenziji: stopnja povečanja števila celic med fazama tretiranja in izražanja pri preskusu MLA. Rast v suspenziji se izračuna tako, da se pri kratkotrajnem (3- ali 4-urnem) tretiranju stopnja povečanja prvega dne pomnoži s stopnjo povečanja drugega dne. Če se uporabi 24-urno tretiranje, je rast v suspenziji stopnja povečanja med 24-urnim tretiranjem, pomnožena s stopnjami povečanja prvi in drugi dan izražanja.

Kontrola s topilom: splošni pojem za opredelitev kontrolnih kultur, ki prejmejo samo topilo, uporabljeno za raztopitev preskusne kemikalije.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

Netretirane kontrole: netretirane kontrole so kulture, ki se ne tretirajo (tj. niti s preskusno kemikalijo niti s topilom), temveč se tretirajo enako kot kulture, v katere se doda preskusna kemikalija.

## Dodatek 2

### FORMULE

#### Citotoksičnost

*Za obe različici preskusa MLA (z agarjem in mikrotitrsko ploščo)*

Citotoksičnost je opredeljena kot relativna skupna rast (RTG – Relative Total Growth), ki vključuje relativno rast v suspenziji (RSG – Relative Suspension Growth) v dvodnevem obdobju izražanja in relativno učinkovitost tvorbe klonov (RCE – Relative Cloning Efficiency), dobljeno ob selekciji mutant. RTG, RSG in RCE se izrazijo kot deleži.

**Izračun RSG:** Rast v suspenziji ena (SG<sub>1</sub>) je hitrost rasti med dnevom 0 in dnevom 1 (koncentracija celic na dan 1/koncentracija celic na dan 0), rast v suspenziji dve (SG<sub>2</sub>) pa je hitrost rasti med dnevom 1 in dnevom 2 (koncentracija celic na dan 2/koncentracija celic na dan 1). RSG je skupna SG (SG<sub>1</sub> x SG<sub>2</sub>) za tretirano kulturo v primerjavi z netretirano kontrolo/kontrolo s topilom. To je:  $RSG = \frac{[SG_{1(\text{preskus})} \times SG_{2(\text{preskus})}]}{[SG_{1(\text{kontrola})} \times SG_{2(\text{kontrola})}]}$  SG<sub>1</sub> je treba izračunati iz začetne koncentracije celic, ki se uporabi ob začetku tretiranja celic. Pomeni morebitno razliko v citotoksičnosti, ki se v celičnih kulturah pojavi med tretiranjem celic.

RCE (Relative Cloning Efficiency) je relativna učinkovitost tvorbe klonov v preskusni kulturi v primerjavi z relativno učinkovitostjo tvorbe klonov v netretirani kontroli/kontroli s topilom, dobljeno ob selekciji mutant.

**Relativna skupna rast (RTG):**  $RTG = RSG \times RCE$

#### TK6

#### Relativno preživetje (RS – Relative Survival)

Citotoksičnost se oceni z relativnim preživetjem, tj. učinkovitostjo tvorbe klonov (CE) celic, nasajenih na ploščo takoj po tretiranju, prilagojeno z morebitno izgubo celic med tretiranjem, v primerjavi z učinkovitostjo tvorbe klonov pri negativnih kontrolah (ki se jim pripiše 100-odstotno preživetje). Prilagoditev zaradi izgube celic med tretiranjem se lahko izračuna kot:

$$\text{prilagojena CE} = CE \times \frac{\text{število celic na koncu tretiranja}}{\text{število celic na začetku tretiranja}}$$

RS za kulturo, tretirano s preskusno kemikalijo, se izračuna kot:

$$RS = \frac{\text{prilagojena CE v tretirani kulturi}}{\text{prilagojena CE v kontroli s topilom}} \times 100$$

## Pogostnost mutant pri preskusih MLA in TK6

Pogostnost mutant (MF – Mutant Frequency) je učinkovitost tvorbe klonov v mutiranih kolonijah v selektivnem gojišču ( $CE_M$ ), prilagojena z učinkovitostjo tvorbe klonov v neselektivnem gojišču ob selekciji mutant ( $CE_V$ ). Torej,  $MF = CE_M/CE_V$ . Izračun teh dveh učinkovitosti tvorbe klonov je v nadaljevanju opisan za metodo kloniranja z agarjem in z mikrotitrsko ploščo.

**Različica preskusa MLA z agarjem:** pri različici preskusa MLA z agarjem se število kolonij na plošči za selekcijo mutant ( $C_M$ ) in število kolonij na neselektivni plošči ali plošči za učinkovitost tvorbe klonov (štetje viabilnih celic) ( $C_V$ ) dobiva z neposrednim štetjem klonov. Ko se nasadi 600 celic za učinkovitost tvorbe klonov ( $CE$ ) na plošče za selekcijo mutant ( $CE_M$ ) in neselektivne plošče ali plošče za učinkovitost tvorbe klonov (štetje viabilnih) ( $CE_V$ ) in se za selekcijo mutant uporabi  $3 \times 10^6$  celic,

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

**Različica preskusov MLA in TK6 z mikrotitrsko ploščo:** pri različici preskusa MLA z mikrotitrsko ploščo se  $C_M$  in  $C_V$  določita kot zmnožek skupnega števila mikrojamic (TW) in verjetnega števila kolonij na jamico (P) na mikrotitrskih ploščah.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

Od ničte Poissonove porazdelitve (Furth *et al.*, 1981) je P podan kot

$$P = -\ln(EW/TW)$$

Pri čemer je EW število praznih jamic, TW pa število vseh jamic. Zato

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

Pri različici preskusa MLA z mikrotitrsko ploščo se enako izračunajo pogostnosti mutant z majhnimi in velikimi kolonijami, tako da se uporabi ustrezno število praznih jamic za majhne in velike kolonije.

Pri preskusu TK6 pogostnosti mutant z majhnimi in velikimi kolonijami temeljijo na zgodaj nastalih in pozno nastalih mutantah.

## **B.68 IN VITRO PRESKUSNA METODA KRATKOTRAJNE IZPOSTAVLJENOSTI ZA OPREDELITEV (i) KEMIKALIJ, KI POVZROČAJO HUDE POŠKODBE OČI, IN (ii) KEMIKALIJ, KI JIH NI TREBA RAZVRSTITI GLEDE NA DRAŽENJE OČI ALI HUDE POŠKODBE OČI**

### **UVOD**

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 491 (2017). Preskusna metoda kratkotrajne izpostavljenosti (Short Time Exposure – STE) je metoda *in vitro*, ki se lahko uporabi v določenih okoliščinah in s posebnimi omejitvami za razvrstitev glede na nevarnost in označevanje kemikalij (snovi in zmesi), ki povzročajo hude poškodbe oči, in tistih, ki jih ni treba razvrstiti glede na hude poškodbe oči ali draženje oči, kot je opredeljeno v globalno usklajenem sistemu Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN) (1) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (uredba CLP)<sup>1</sup>.
2. Že vrsto let se potencialna nevarnost kemikalij za oči ocenjuje predvsem z uporabo *in vivo* preskusa draženja oči na kuncih (preskusna metoda B.5 (8), ki je enakovredna Smernici OECD za preskušanje 405). Na splošno velja, da *in vivo* preskusa draženja oči na kuncih v bližnji prihodnosti ne bo mogoče v celoti nadomestiti z enim samim alternativnim preskusom *in vitro*, da bi se predvidel celoten razpon hudih poškodb oči/učinkov draženja oči za različne kemijske razrede. Strateške kombinacije alternativnih preskusnih metod, uporabljenih pri (večstopenjski) strategiji preskušanja, pa bi morda lahko v celoti nadomestile preskus draženja oči na kuncih (2). Pristop od zgoraj navzdol je zasnovan za preskušanje kemikalij, ko se na podlagi obstoječih informacij pričakuje, da bo imela kemikalija visok potencial draženja ali da bo povzročila hude poškodbe oči. Nasprotno pa je pristop od spodaj navzgor zasnovan za preskušanje kemikalij, ko se na podlagi obstoječih informacij pričakuje, da kemikalija ne bo povzročila tolikšnega draženja oči, da bi jo bilo treba razvrstiti. Čeprav se preskusna metoda STE ne obravnava kot celovit nadomestek za *in vivo* preskus draženja oči na kuncih, je primerna za uporabo kot del večstopenjske strategije preskušanja za regulativno razvrščanje in označevanje, kot je pristop od zgoraj navzdol/od spodaj navzgor, da se brez dodatnega preskušanja opredelijo (i) kemikalije, ki povzročajo hude poškodbe oči (kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP),

---

<sup>1</sup> Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 13.12.2008, str. 1).

in (ii) kemikalije (pri čemer so izključene zelo hlapne snovi in vse trdne kemikalije, razen površinsko aktivnih snovi), ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči (brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP) (1)(2). Vendar bi bilo treba kemikalijo, za katero se s preskusno metodo STE ne napove, da povzroča hude poškodbe oči (kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP) niti da spada med snovi brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP (ne povzroča niti hudih poškodb oči niti draženja oči), dodatno preskusiti, da se določi končna razvrstitev. Poleg tega se je treba pred uporabo pristopa od spodaj navzgor pri preskusni metodi STE v okviru drugih sistemov za razvrščanje, ki niso GHS ZN/uredba CLP, posvetovati z ustreznimi regulativnimi organi. Izbiro najustreznejše preskusne metode in uporabo te preskusne metode je treba obravnavati v okviru smernice OECD za celostne pristope k testiranju in ocenjevanju (IATA) v zvezi s hudimi poškodbami oči in draženjem oči (14).

3. V tej preskusni metodi so opisani postopki za oceno potencialne nevarnosti preskusne kemikalije za oči glede na njeno zmožnost, da pri preskusni metodi kratke izpostavljenosti povzroči citotoksičnost. Citotoksični učinek kemikalij na epitelne celice roženice je pomemben način delovanja, ki povzroča poškodbe roženičnega epitelijskega tkiva in draženje oči. Viabilnost celic se pri preskusni metodi STE oceni s kvantitativnim merjenjem – po ekstrakciji iz celic – soli modrega formazana, ki jo žive celice proizvedejo z encimsko pretvorbo vitalnega barvila MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid), znanega tudi kot tiazolil modro tetrazol bromid (3). Dobljena viabilnost celic se primerja s kontrolo s topilom (relativna viabilnost) in uporabi za oceno potencialne nevarnosti preskusne kemikalije za oči. Preskusna kemikalija se razvrsti v kategorijo 1 po GHS ZN/uredbi CLP, če 5-odstotna in 0,05-odstotna koncentracija povzročita največ ( $\leq$ ) 70-odstotno viabilnost celic. Nasprotno pa se za kemikalijo predvideva, da je brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP, če 5-odstotna in 0,05-odstotna koncentracija povzročita več kot ( $>$ ) 70-odstotno viabilnost celic.
4. Pojem ‚preskusna kemikalija‘ se pri tej preskusni metodi nanaša na to, kar se preskuša, in ni povezan z uporabnostjo preskusne metode STE za preskušanje snovi in/ali zmesi. Opredelitve pojmov so navedene v Dodatku.

## **ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE**

5. Ta preskusna metoda temelji na protokolu, ki ga je razvila družba Kao Corporation (4) in je bil predmet dveh različnih validacijskih študij: eno je izvedel validacijski odbor japonske družbe za alternative poskusom na živalih (JSAAE) (5), drugo pa japonski center za validacijo alternativnih metod (JaCVAM) (6). Medsebojni strokovni pregled sta izvedla NICEATM/ICCVAM na podlagi poročil o validacijskih študijah in dokumentov o pregledu ozadja v zvezi s preskusno metodo (7).

6. Ko je bila preskusna metoda STE uporabljena za opredelitev kemikalij (snovi in zmesi), ki povzročajo hude poškodbe oči (kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP) (1), so podatki, pridobljeni za 125 kemikalij (med katerimi so bile snovi in zmesi), pokazali 83-odstotno splošno točnost (104/125), 1-odstotni delež lažno pozitivnih rezultatov (1/86) in 51-odstotni delež lažno negativnih rezultatov (20/39) v primerjavi z *in vivo* preskusom draženja oči na kuncih (7). Delež lažno negativnih rezultatov v tem primeru ni ključen, saj se vse preskusne kemikalije, ki povzročajo viabilnost celic  $\leq 70\%$  pri 5-odstotni koncentraciji in  $> 70\%$  pri 0,05-odstotni koncentraciji, naknadno preskusijo še z drugimi ustrezno validiranimi preskusnimi metodami *in vitro* ali – kot zadnja možnost – z *in vivo* preskusom draženja oči na kuncih, in sicer glede na regulativne zahteve ter v skladu s trenutno priporočeno strategijo zaporednega preskušanja in pristopi, ki temeljijo na zanesljivosti dokazov (1) (8). V glavnem so bile preskušene snovi iz ene sestavine, čeprav obstaja tudi omejena količina podatkov o preskušanju zmesi. Preskusna metoda je kljub temu tehnično ustrezna tudi za preskušanje snovi z več sestavinami in zmesi. Preden pa se ta preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni. Preskusna metoda STE ni pokazala drugih posebnih pomanjkljivosti, ko je bila uporabljena za opredelitev preskusnih kemikalij kot kemikalij kategorije 1 po GHS ZN/uredbi CLP. Raziskovalci lahko razmislijo o uporabi te preskusne metode za preskusne kemikalije, pri čemer je treba viabilnost celic  $\leq 70\%$  pri 5-odstotni in tudi 0,05-odstotni koncentraciji sprejeti kot kazalnik za odziv, ki povzroča hude poškodbe oči in ga je treba brez nadaljnjega preskušanja razvrstiti v kategorijo 1 po GHS ZN/uredbi CLP.
7. Ko je bila preskusna metoda STE uporabljena za opredelitev kemikalij (snovi in zmesi), ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči in hude poškodbe oči (tj. brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP), so podatki, pridobljeni za 130 kemikalij (med katerimi so bile snovi in zmesi), pokazali 85-odstotno splošno točnost (110/130), 12-odstotni delež lažno negativnih rezultatov (9/73) in 19-odstotni delež lažno pozitivnih rezultatov (11/57) v primerjavi z *in vivo* preskusom draženja oči na kuncih (7). Če se iz podatkovnega niza izključijo zelo hlapne snovi in trdne snovi, razen površinsko aktivnih, se splošna točnost izboljša na 90% (92/102), delež lažno negativnih rezultatov na 2% (1/54), delež lažno pozitivnih rezultatov pa na 19% (9/48) (7). Posledično sta potencialni pomanjkljivosti preskusne metode STE, če se uporabi za opredelitev preskusnih kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči in hude poškodbe oči (brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP), visoka lažno negativna deleža za (i) zelo hlapne snovi s parnim tlakom nad 6 kPa ter (ii) trdne kemikalije (snovi in zmesi), ki niso površinsko aktivne snovi, in zmesi, ki jih sestavljajo samo

površinsko aktivne snovi. Take kemikalije so izključene iz področja uporabe preskusne metode STE (7).

8. Poleg kemikalij, navedenih v odstavkih 6 in 7, podatkovni niz, ustvarjen s preskusno metodo STE, vsebuje tudi interne podatke o 40 zmesih, ki so v primerjavi z Draizovim preskusom draženja oči *in vivo* pokazali 88-odstotno točnost (35/40), 50-odstotni delež lažno pozitivnih rezultatov (5/10) in 0-odstotni delež lažno negativnih rezultatov (0/30) za napovedovanje zmesi, ki jih ni treba razvrstiti glede na sistema za razvrščanje po GHS ZN/uredbi CLP (9). Preskusna metoda STE se torej lahko uporabi za opredelitev zmesi kot zmesi brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP z uporabo pristopa od spodaj navzgor, razen za trdne zmesi, ki jih ne sestavljajo samo površinsko aktivne snovi, kot razširitev njene omejitve na trdne snovi. Poleg tega je treba zmesi, ki vsebujejo snovi s parnim tlakom nad 6 kPa, ocenjevati pazljivo, da se preprečijo morebitne razvrstitve v prenizko kategorijo, in jih utemeljiti za vsak primer posebej.
9. Preskusna metoda STE se ne more uporabiti za opredelitev preskusnih kemikalij kot kemikalij kategorije 2 po GHS ZN/uredbi CLP, kategorije 2A po GHS ZN (draženje oči) ali 2B (blažje draženje oči), saj je precejšnje število kemikalij kategorije 1 po GHS ZN/uredbi CLP razvrščenih v prenizko kategorijo, in sicer v kategorijo 2, 2A ali 2B, precejšnje število kemikalij brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP pa je razvrščenih previsoko, in sicer v kategorijo 2, 2A ali 2B (7). Zato je morda potrebno nadaljnje preskušanje z drugo ustrežno metodo.
10. Preskusna metoda STE je primerna za preskusne kemikalije, ki se raztopijo ali vsaj 5 minut enakomerno suspendirajo v fiziološki raztopini, 5-odstotnem dimetil sulfoksidu (DMSO) v fiziološki raztopini ali mineralnem olju. Po drugi strani ni primerna za preskusne kemikalije, ki niso topne ali jih ni mogoče vsaj 5 minut enakomerno suspendirati v fiziološki raztopini, 5-odstotnem DMSO v fiziološki raztopini ali mineralnem olju. Uporaba mineralnega olja pri preskusni metodi STE je mogoča zaradi kratkotrajne izpostavljenosti. Zato je preskusna metoda STE primerna za napovedovanje potencialne nevarnosti v vodi netopnih preskusnih kemikalij (npr. dolgoveričnih maščobnih alkoholov ali ketonov) za oči, če se mešajo z vsaj enim od treh zgoraj predlaganih topil (4).

11. Pojem ‚preskusna kemikalija‘ se pri tej preskusni metodi nanaša na to, kar se preskuša<sup>11</sup>, in ni povezan z uporabnostjo preskusne metode STE za preskušanje snovi in/ali zmesi.

## NAČELO PRESKUSA

12. Preskusna metoda STE je preskus *in vitro* na podlagi citotoksičnosti, ki se izvede na konfluentnem monosloju celic roženice kunca Statens Seruminstitut (SIRC), kultiviranih na 96-jamični polikarbonski mikrotitrski plošči (4). Po petminutni izpostavljenosti preskusni kemikaliji se citotoksičnost kvantitativno izmeri kot relativna viabilnost celic SIRC z uporabo preskusa MTT (4). Zmanjšana viabilnost celic se lahko uporabi za napoved potencialnih škodljivih učinkov, ki povzročajo očasne poškodbe.
13. V skladu s poročili se 80 % raztopine, nakapane v oko kunca, izloči skozi mešiček veznice v treh do štirih minutah, medtem ko se več kot 80 % raztopine, nakapane v človeško oko, izloči v eni do dveh minutah (10). Preskusna metoda STE se poskuša približati tem časom izpostavljenosti in uporablja citotoksičnost kot končno točko za oceno poškodovanosti celic SIRC po petminutni izpostavljenosti preskusni kemikaliji.

## DOKAZOVANJE USPOSOBLJENOSTI

14. Pred redno uporabo preskusne metode STE, opisane v tej preskusni metodi, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost, tako da pravilno razvrstijo 11 snovi, priporočenih v preglednici 1. Te snovi so bile izbrane, ker predstavljajo celoten razpon odzivov pri hudih poškodbah oči ali draženju oči, temeljijo pa na rezultatih *in vivo* preskusa draženja oči na kuncih (TG 405) in sistemu za razvrščanje po GHS ZN/uredbi CLP (1). Druga merila za izbiro so vključevala razpoložljivost snovi na trgu, razpoložljivost visokokakovostnih referenčnih podatkov *in vivo* in razpoložljivost visokokakovostnih podatkov *in vitro*, pridobljenih s preskusno metodo STE (3). V primerih, ko snov s seznama ni na voljo ali ko je to utemeljeno, se lahko uporabi druga snov, za katero so na voljo ustrezni referenčni podatki *in vivo* in *in vitro*, če se uporabijo enaka merila, kot so opisana tukaj.

### Preglednica 1: Seznam snovi za preverjanje usposobljenosti

---

<sup>1</sup> Junija 2013 je bil na skupnem zasedanju sprejet dogovor, da bi bilo zdaj treba v novih in posodobljenih preskusnih metodah pojem ‚preskusna kemikalija‘, ki opisuje, kaj se preskuša, uporabljati dosledneje, kjer je to mogoče.

Snov	Št. CAS	Kemijski razred <sup>1</sup>	Agregatno stanje	Kat. <i>in vivo</i> po GHS ZN/uredbi CLP <sup>2</sup>	Topilo pri preskusu STE	Kat. STE po GHS ZN/uredbi CLP
Benzalkonijev klorid (10 %, vodni)	8001-54-5	onijska spojina	tekoče	kategorija 1	fiziološka raztopina	kategorija 1
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	eter	tekoče	kategorija 1	fiziološka raztopina	kategorija 1
Kislo rdeča 92	18472-87-2	heterociklična spojina; bromova spojina; klorova spojina;	trdno	kategorija 1	fiziološka raztopina	kategorija 1
Natrijev hidroksid	1310-73-2	baza; anorganska kemikalija	trdno	kategorija 1 <sup>3</sup>	fiziološka raztopina	kategorija 1
Butirolakton	96-48-0	lakton; heterociklična spojina	tekoče	kategorija 2A (kategorija 2 po uredbi CLP)	fiziološka raztopina	napoved ni mogoča
1-oktanol	111-87-5	alkohol	tekoče	Kategorija 2A/B <sup>4</sup> (kategorija 2 po uredbi CLP)	mineralno olje	napoved ni mogoča
Ciklopentanol	96-41-3	alkohol; ogljikovodik, ciklični	tekoče	Kategorija 2A/B <sup>5</sup> (kategorija 2 po uredbi CLP)	fiziološka raztopina	napoved ni mogoča
2-etoksietil acetat	111-15-9	alkohol; eter	tekoče	brez kategorije	fiziološka raztopina	brez kategorije
Dodekan	112-40-3	ogljikovodik, aciklični	tekoče	brez kategorije	mineralno olje	brez kategorije
Metil izobutil keton	108-10-1	keton	tekoče	brez kategorije	mineralno olje	brez kategorije
n,n-dimetilgvanidin sulfat	598-65-2	amidin; žveplova spojina	trdno	brez kategorije	fiziološka raztopina	brez kategorije

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS).

<sup>1</sup> Kemijski razredi so bili dodeljeni na podlagi informacij iz prejšnjih objav centra NICEATM, če te niso bile na voljo, pa na podlagi sistema za razvrščanje MeSH<sup>®</sup> (National Library of Medicine Medical Subject Headings) (prek ChemIDplus<sup>®</sup> (National Library of Medicine), na voljo na <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>) in strukturnih določitev, ki jih je opravil center NICEATM.

<sup>2</sup> Na podlagi rezultatov *in vivo* preskusa draženja oči na kuncih (OECD TG 405) in z uporabo GHS ZN/uredbe CLP (1).

<sup>3</sup> Razvrstitev v kategorijo 1 temelji na potencialu jedkosti za kožo, ki ga ima 100-odstotni natrijev hidroksid (v OECD TG 435 uvrščen na seznam kemikalij za preverjanje usposobljenosti s potencialom jedkosti za kožo), in merilu za kategorijo 1 po GHS ZN/uredbi CLP (1).

<sup>4</sup> Razvrstitev v kategorijo 2A ali 2B je odvisna od razlage merila za razlikovanje med obema kategorijama po GHS ZN, in sicer dve od šestih oziroma štiri od šestih živali, ki imajo sedmi dan učinke, zaradi katerih je treba kemikalijo razvrstiti v kategorijo 2A. Podatkovni niz *in vivo* je vključeval dve študiji s po tremi živalmi. V eni študiji sta dve od treh živali pokazali učinke sedmi dan, tako da je bila upravičena razvrstitev v kategorijo 2A (11), medtem ko so se v drugi študiji vse končne

točke pri vseh treh živalih do sedmega dne popravile in so dosegle vrednost nič, zato je bila upravičena razvrstitev v kategorijo 2B (12).

<sup>5</sup> Razvrstitev v kategorijo 2A ali 2B je odvisna od razlage merila za razlikovanje med obema kategorijama po GHS ZN, in sicer ena od treh oziroma dve od treh živali, ki imajo sedmi dan učinke, zaradi katerih je treba kemikalijo razvrstiti v kategorijo 2A. V študijo *in vivo* so bile vključene tri živali. Vse končne točke, razen motnjave roženice in rdečine veznice na eni živali, so se do sedmega dne ali prej popravile in so dosegle vrednost nič. Pri eni živali, ki si do sedmega dne ni popolnoma opomogla, je motnjava roženice (sedmi dan) dosegla vrednost 1 in rdečina veznice vrednost 1, popolnoma pa si je opomogla 14. dan (11).

## **POSTOPEK**

### **Priprava celičnega monosloja**

15. Za izvedbo preskusne metode STE je treba uporabiti celično linijo roženice kunca, SIRC. Priporočljivo je, da se celice SIRC pridobijo iz celične banke z dobrimi kvalifikacijami, kot je American Type Culture Collection CCL60.
16. Celice SIRC se gojijo pri 37 °C v navlaženi atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub> v steklenički za gojenje celičnih kultur, ki vsebuje gojišče z Eagleovim minimalnim osnovnim gojiščem (MEM), dopolnjeno z 10-odstotnim fetusnim serumom goveda (FBS), 2 mM L-glutamina, 50–100 enotami/ml penicilina in 50–100 µg/ml streptomocina. Celice, ki v steklenički za gojenje postanejo konfluentne, je treba s celičnim strgalom ali brez njega ločiti z raztopino tripsin-etilendiamintetraocetne kisline. Celice se najprej namnožijo (npr. 2 do 3 pasaže) v steklenički za gojenje, nato pa uporabijo za rutinsko preskušanje, in sicer do največ 25 pasaž po odtajanju.
17. Celice, ki so na voljo za uporabo pri preskusu STE, se nato pripravijo z ustrezno gostoto in nasadijo na 96-jamične plošče. Priporočena gostota nasaditve celic je  $6,0 \times 10^3$  celic na jamico, če se celice uporabijo štiri dni po nasaditvi, ali  $3,0 \times 10^3$  celic na jamico, če se celice uporabijo pet dni po nasaditvi, pri čemer prostornina kulture znaša 200 µl. Celice, ki se uporabijo pri preskusu STE in so nasajene v gojišče z ustrezno gostoto, bodo ob preskušanju, tj. štiri ali pet dni po nasaditvi, dosegle več kot 80-odstotno konfluenco.

### **Nanos preskusnih kemikalij in kontrolnih snovi**

18. Kot topilo za raztapljanje ali suspendiranje preskusnih kemikalij se najprej izbere fiziološka raztopina. Če se preskusna kemikalija izkaže za slabo topno ali je ni mogoče vsaj pet minut enakomerno raztopiti ali suspendirati v fiziološki raztopini, se kot druga izbira za topilo uporabi 5-odstotni DMSO (CAS#67-68-5) v fiziološki raztopini. Za preskusne kemikalije, ki jih ni mogoče enakomerno raztopiti ali vsaj pet minut suspendirati v fiziološki raztopini ali 5-odstotnem DMSO, se kot tretja izbira za topilo uporabi mineralno olje (CAS#8042-47-5).

19. Preskusne kemikalije se enakomerno raztopijo ali suspendirajo v izbranem topilu do koncentracije 5 mas. % in nadalje razredčijo z zaporednim 10-stopenjskim redčenjem do 0,5- in 0,05-odstotne koncentracije. Vsako preskusno kemikalijo je treba preskusiti pri 5- in 0,05-odstotni koncentraciji. Celice, gojene na 96-jamični plošči, se za pet minut pri sobni temperaturi izpostavijo 5- ali 0,05-odstotni koncentraciji raztopine (ali suspenzije) preskusne kemikalije, in sicer se uporabi 200  $\mu$ l/jamico. Preskusne kemikalije (snovi iz ene sestavine, snovi z več sestavinami ali zmesi) se štejejo za nerazredčene snovi in se razredčijo ali suspendirajo v skladu z metodo ne glede na svojo čistost.
20. Na vsaki plošči se za vsako ponovitev kot kontrola z medijem uporabi gojišče, opisano v odstavku 16. Prav tako je treba celice na vsaki plošči za vsako ponovitev izpostaviti tudi vzorcem kontrole s topilom. Topila, navedena v odstavku 18, potrjeno nimajo škodljivih učinkov na viabilnost celic SIRC.
21. Pri preskusni metodi STE je treba kot pozitivno kontrolo na vsaki plošči za vsako ponovitev uporabiti 0,01-odstotni natrijev lavril sulfat (SLS) v fiziološki raztopini. Da se izračuna viabilnost celic v pozitivni kontroli, mora vsaka plošča za vsako ponovitev vključevati tudi kontrolo s topilom v fiziološki raztopini.
22. Za določitev izravnave optične gostote je potreben slepi vzorec, ki ga je treba izvesti na jamicah, ki vsebujejo samo fosfatni pufer s soljo, ne pa tudi kalcija in magnezija (PBS-) ali celic.
23. Vsak vzorec (preskusna kemikalija pri 5- in 0,05-odstotni koncentraciji, kontrola z medijem, kontrola s topilom in pozitivna kontrola) je treba preskusiti v treh ponovitvah, tako da se celice za pet minut pri sobni temperaturi izpostavijo 200  $\mu$ l ustrezne preskusne ali kontrolne kemikalije.
24. Primerjalne snovi so primerne za ocenjevanje potenciala za draženje oči, ki ga imajo neznane kemikalije določenega kemijskega ali proizvodnega razreda, ali za ocenjevanje relativnega potenciala snovi za draženje oči v določenem razponu dražilnih učinkov.

#### **Meritev viabilnosti celic**

25. Po izpostavitvi se celice dvakrat sperejo z 200  $\mu$ l PBS in doda se 200  $\mu$ l raztopine MTT (0,5 mg MTT/ml gojišča). Po dvournem reakcijskem času v inkubatorju (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) se raztopina MTT odlije, formazan MTT se 60 minut v temi pri sobni temperaturi ekstrahira z dodajanjem 200  $\mu$ l 0,04 N klorovodikove kisline-izopropanola, absorbanca raztopine formazana MTT pa se izmeri pri 570 nm z uporabo čitalca plošče. Interferenca preskusnih kemikalij s preskusom MTT (z barvili ali snovmi, ki neposredno zmanjšujejo MTT) se pojavi samo, če v preskusnem sistemu po spiranju po izpostavitvi ostane znatna količina preskusne kemikalije, kar

velja za tridimenzionalno rekonstruirano človeško roženico ali tkiva rekonstruirane človeške pokožnice, ni pa pomembno za dvodimenzionalne celične kulture, ki se uporabljajo pri preskusni metodi STE.

### Razlaga rezultatov in napovedni model

26. Vrednosti optične gostote (OD), pridobljene za vsako preskusno kemikalijo, se nato uporabijo za izračun viabilnosti celic glede na kontrolo s topilom, katere viabilnost je 100-odstotna. Relativna viabilnost celic je izražena kot delež, dobi pa se tako, da se optična gostota preskusne kemikalije deli z optično gostoto kontrole s topilom, potem ko se od obeh vrednosti odšteje optična gostota slepega vzorca.

$$\text{viabilnost celic (\%)} = \frac{(OD_{570}\text{preskusne kemikalije}) - (OD_{570}\text{slepega vzorca})}{(OD_{570}\text{kontrole s topilom}) - (OD_{570}\text{slepega vzorca})} \times 100$$

Podobno je kot delež izražena relativna viabilnost celic vsake kontrole s topilom, dobi pa se tako, da se optična gostota vsake kontrole s topilom deli z optično gostoto kontrole z medijem, potem ko se od obeh vrednosti odšteje optična gostota slepega vzorca.

27. Izvesti je treba tri neodvisne ponovitve, pri čemer vsaka vsebuje tri jamice s ponovljenimi vzorci (tj.  $n = 9$ ). Za izračun aritmetične sredine relativne viabilnosti celic se uporabi aritmetična sredina vseh treh jamic za vsako preskusno kemikalijo in kontrolo s topilom pri vsaki neodvisni ponovitvi. Končna aritmetična sredina viabilnosti celic se izračuna iz treh neodvisnih ponovitev.
28. Mejne vrednosti viabilnosti celic za opredelitev preskusnih kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči (kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP), in preskusnih kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči (brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP), so navedene v nadaljevanju.

**Preglednica 2:** Napovedni model preskusne metode STE

Viabilnost celic		Razvrstitev po GHS ZN/uredbi CLP	Uporaba
Pri 5 %	Pri 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	brez kategorije	snovi in zmesi, razen: (i) zelo hlapnih snovi s parnim pritiskom nad 6 kPa <sup>1</sup> in (ii) trdnih kemikalij (snovi in zmesi), ki niso površinsko aktivne snovi in zmesi, ki jih sestavljajo samo površinsko aktivne snovi
≤ 70 %	> 70 %	napoved ni mogoča	ni relevantno
≤ 70 %	≤ 70 %	kategorija 1	snovi in zmesi <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Zmesi, ki vsebujejo snovi s parnim tlakom nad 6 kPa, je treba ocenjevati pazljivo, da se preprečijo morebitne prenizke razvrstitve, in jih utemeljiti za vsak primer posebej.

<sup>2</sup> Na podlagi rezultatov, dobljenih v glavnem za snovi iz ene sestavine, čeprav obstaja tudi omejena količina podatkov o preskušanju zmesi. Preskusna metoda je kljub temu tehnično ustrezna tudi za preskušanje snovi z več sestavinami in zmesi. Preden se ta preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni.

## **Merila za sprejemljivost**

29. Rezultati preskusa se štejejo za sprejemljive, če so izpolnjena vsa merila, navedena v nadaljevanju.

- a) Ko se odšteje optična gostota slepega vzorca, mora biti optična gostota kontrole z medijem (izpostavljene gojišču) 0,3 ali višja.
- b) Viabilnost kontrole s topilom mora biti 80-odstotna ali višja glede na kontrolo z medijem. Če se pri vsaki ponovitvi uporabi več kontrol s topilom, je več kot 80-odstotna viabilnost celic pri vsaki od teh kontrol pogoj, da se kemikalije, preskušene s temi topili, štejejo za ustrezne.
- c) Viabilnost celic, dobljena s pozitivno kontrolo (0,01-odstotni SLS), mora biti znotraj dveh standardnih odklonov srednje vrednosti iz preteklih preskusov. Zgornjo in spodnjo mejo sprejemljivosti za pozitivno kontrolo je treba pogosto posodabljati, tj. vsake tri mesece ali vedno, kadar preskus izvajajo laboratoriji, ki preskuse izvajajo redko (tj. manj kot enkrat mesečno). Kadar laboratorij ne izvede zadostnega števila poskusov za določitev statistično zanesljive porazdelitve pozitivnih kontrol, je sprejemljivo uporabiti zgornjo in spodnjo mejo sprejemljivosti, ki ju je določil razvijalec metode, tj. med 21,1 % in 62,3 % glede na podatke laboratorija iz preteklih preskusov, medtem ko se notranja porazdelitev razvije med prvimi rutinskimi preskusi.
- d) Standardni odklon končne viabilnosti celic, ki izhaja iz treh neodvisnih ponovitev, mora znašati manj kot 15 % pri 5- in 0,05-odstotni koncentraciji preskusne kemikalije.

Če eno ali več teh meril ni izpolnjenih, je treba rezultate zavreči in izvesti nove tri neodvisne ponovitve.

## **PODATKI IN POROČANJE**

### **Podatki**

30. Navesti je treba podatke za vsako posamezno jamico (npr. vrednosti viabilnosti celic) pri vsaki ponovitvi ter skupno srednjo vrednost, standardni odklon in razvrstitev.

### **Poročilo o preskusu**

31. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

#### *Preskusna kemikalija in kontrolne snovi*

- Snov iz ene sestavine: kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, registrska številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;
- snov z več sestavinami, UVCB in zmesi: čim obsežnejša opredelitev lastnosti, na primer s kemijsko identiteto (glej zgoraj), čistostjo, kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi (glej zgoraj) sestavin, če so na voljo;
- agregatno stanje, hlapnost, vrednost pH, LogP, molekulska masa, kemijski razred in dodatne zadevne fizikalno-kemijske lastnosti, pomembne za izvedbo študije, če so na voljo;
- čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo.

#### *Pogoji in postopki preskusne metode*

- Ime in naslov naročnika, preskuševalnega laboratorija in vodje študije;
- opis uporabljene preskusne metode;
- uporabljena celična linija, njen izvor, številka pasaže in konfluenta celic, uporabljenih za preskušanje;
- podrobnosti o uporabljenem preskusnem postopku;
- uporabljeno število ponovitev in ponovljenih vzorcev;
- uporabljene koncentracije preskusnih kemikalij (če se razlikujejo od priporočenih);
- utemeljitev izbire topila za vsako preskusno kemikalijo;
- trajanje izpostavljenosti preskusni kemikaliji (če se razlikuje od priporočenega);
- opis morebitnih prilagoditev preskusnega postopka;
- opis uporabljenih meril za ocenjevanje in odločitve;
- sklic na srednjo vrednost pozitivne kontrole iz preteklih preskusov in standardni odklon;
  
- dokaz usposobljenosti laboratorija za izvedbo preskusne metode (npr. s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti) ali prikaz ponovljivosti izvedbe preskusne metode v daljšem časovnem obdobju.

#### *Rezultati*

- Za vsako preskusno kemikalijo in kontrolno snov ter vsako preskušeno koncentracijo je treba v preglednici navesti posamezne vrednosti optične gostote na jamico s ponovljenimi vzorci, aritmetično sredino vrednosti optične gostote za vsako neodvisno ponovitev, delež viabilnosti celic za vsako neodvisno ponovitev ter končno aritmetično sredino deleža viabilnosti celic in standardnega odklona v treh ponovitvah;
- rezultate za kontrolo z medijem, kontrolo s topilom in pozitivno kontrolo, ki dokazujejo ustrezna merila za sprejemljivost študije;
- opis drugih opaženih učinkov;
- splošno izpeljano razvrstitev z navedbo uporabljenega napovednega modela/meril za odločitev.

*Razprava o rezultatih*

*Sklepne ugotovitve*

## VIRI

- (1) Združeni narodi (ZN) (2013). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS). Peta revidirana izdaja. New York in Ženeva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Na voljo na: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev05/05files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html).
- (2) Scott, L., *et al.* (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1–9.
- (3) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- (4) Takahashi, Y., *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22, 760–770.
- (5) Sakaguchi, H., *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25, 796–809.
- (6) Kojima, H., *et al.* (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, str. 1855–1869.
- (7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Na voljo na: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox\_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].
- (8) Poglavje B.5 te priloge: Akutno draženje oči/jedkost za oči.
- (9) Saito, K., *et al.* (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.
- (10) Mikkelsen, T. J., Chrai, S. S., in Robinson, J. R. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm. Sci.* 1648–1653.
- (11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (št. 48. (2)), Bruselj, Belgija.

- (12) Gautheron, P., *et al.* (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. *Fundam Appl Toxicol.* 18, 442–449.
- (13) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 34). Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (14) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 263). Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

## Dodatek

### OPREDELITVE POJMOV

**Točnost:** stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz skladnost se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravih rezultatov preskusne metode (13).

**Primerjalna snov:** snov, ki se uporablja kot standard za primerjavo s preskusno kemikalijo. Primerjalna snov mora imeti naslednje lastnosti: (i) ima trajen in zanesljiv vir; (ii) je strukturno in funkcijsko podobna kemikalijam iz preskušane razreda; (iii) ima znane fizikalne/kemijske lastnosti; (iv) ima spremne podatke o znanih učinkih in (v) ima znano jakost v razponu želenega odziva.

**Pristop od spodaj navzgor:** stopenjski pristop, ki se uporablja za preskusno kemikalijo, za katero se domneva, da ne potrebuje razvrstitve glede na draženje oči ali hude poškodbe oči, pri čemer se najprej določijo kemikalije, ki ne potrebujejo razvrstitve (negativni rezultat), nato pa druge kemikalije (pozitivni rezultat).

**Kemikalija:** snov ali zmes.

**Draženje oči:** je povzročitev sprememb v očesu po nanosu preskusne kemikalije na sprednjo površino očesa, ki so v celoti povračljive v 21 dneh po nanosu. Ta pojem je sopomenka za 'povračljive učinke na oči' in kategorijo 2 po GHS ZN/uredbi CLP.

**Delež lažno negativnih rezultatov:** delež vseh pozitivnih kemikalij, ki jih preskusna metoda zmotno prikaže kot negativne. To je eden od kazalnikov učinkovitosti preskusne metode.

**Delež lažno pozitivnih rezultatov:** delež vseh negativnih kemikalij, ki jih preskusna metoda zmotno prikaže kot pozitivne. To je eden od kazalnikov učinkovitosti preskusne metode.

**Nevarnost:** neločljiva lastnost sredstva ali stanje, ki lahko ob izpostavljenosti temu sredstvu povzroči neželen učinek na organizem, sistem ali (pod)populacijo.

**Kontrola z medijem:** netretiran ponovljen vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema. Ta vzorec se obdela z vzorci, tretiranimi s preskusno kemikalijo, in drugimi kontrolnimi vzorci, da se ugotovi, ali topilo reagira s preskusnim sistemom.

**Zmes:** zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi.

**Snov iz ene sestavine:** snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je vsaj 80 mas. % glavne sestavine.

**MTT:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid; tiazolil modro tetrazol bromid.

**Snov z več sestavinami:** snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je več glavnih sestavin s koncentracijo  $\geq 10$  mas. % in  $< 80$  mas. %. Snov z več sestavinami je rezultat proizvodnega postopka. Razlika med zmesjo in snovjo z več sestavinami je v tem, da je zmes pridobljena z mešanjem dveh ali več snovi brez kemične reakcije. Snov z več sestavinami je rezultat kemične reakcije.

**OD:** optična gostota.

**Pozitivna kontrola:** ponovljen vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s snovjo, za katero je znano, da povzroči pozitiven odziv. Za zagotovitev, da se lahko variabilnost odziva pozitivne kontrole oceni v daljšem časovnem obdobju, pa stopnja pozitivnega odziva ne sme biti prevelika.

**Ustreznost:** opis razmerja med preskusom in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere se s preskusom pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Pri ustreznosti se upošteva tudi točnost (skladnost) preskusne metode (10).

**Zanesljivost:** stopnja obnovljivosti preskusne metode v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih in interne laboratorijske obnovljivosti (13).

**Občutljivost:** delež vseh pozitivnih/aktivnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (10).

**Huda poškodba oči:** povzročitev poškodbe očesnega tkiva ali resne fizične okvare vida po nanosu preskusne kemikalije na sprednjo površino očesa, ki ni v celoti povračljiva v 21 dneh po nanosu. Ta pojem je sopomenka za ‚nepovračljive učinke na oči‘ in kategorijo 1 po GHS ZN/uredbi CLP.

**Kontrola s topilom/vehiklom:** netretiran vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema, vključno s topilom ali vehiklom, ki se obdela s kontrolnimi vzorci, tretiranimi s preskusno kemikalijo, in drugimi kontrolnimi vzorci, da se določi izhodiščni odziv za vzorce, tretirane s preskusno kemikalijo, raztopljeno v istem topilu ali vehiklu. Pri preskušanju s sočasno kontrolo z medijem ta vzorec tudi pokaže, ali topilo ali vehikel reagira s preskusnim sistemom.

**Specifičnost:** delež vseh negativnih/neaktivnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (13).

**Snov:** kemijski element in njegove spojine v naravnem stanju ali pridobljene s kakršnim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev njene obstojnosti, in vsemi nečistotami, ki nastanejo pri uporabljenem postopku, ne vključuje pa topil, ki se lahko izločijo, ne da bi to vplivalo na obstojnost snovi ali spremenilo njeno sestavo.

**Površinsko aktivna snov:** kemikalija, kot je detergent, ki lahko zmanjša površinsko napetost tekočine in tako omogoči, da se speni ali prodre v trdne snovi; znana je tudi kot omakalno sredstvo.

**Preskusna kemikalija:** vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

**Večstopenjska strategija preskušanja:** stopenjsko preskušanje, pri katerem se v posebnem vrstnem redu pregledajo vsi obstoječi podatki o preskusni kemikaliji, pri čemer se na vsaki stopnji uporabi postopek, ki temelji na zanesljivosti dokazov, da se določi, ali je pred nadaljevanjem na naslednji stopnji na voljo dovolj podatkov za odločitev o razvrstitvi kemikalije glede na nevarnost, ki jo povzroča. Če se za preskusno kemikalijo na podlagi razpoložljivih podatkov lahko določi potencial za draženje, dodatno preskušanje ni potrebno. Če preskusni kemikaliji na podlagi razpoložljivih podatkov ni mogoče določiti potenciala za draženje, se izvede postopno zaporedno testiranje na živalih, dokler kemikalije ni mogoče jasno razvrstiti.

**Pristop od zgoraj navzdol:** stopenjski pristop, ki se uporablja za preskusno kemikalijo, za katero se domneva, da povzroča hude poškodbe oči, pri čemer se najprej določijo kemikalije, ki povzročajo hude poškodbe oči (pozitivni rezultat), nato pa še druge kemikalije (negativni rezultat).

**Globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN):** sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se sporočile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudje (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (1).

**Kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP:** glej ‚Huda poškodba oči‘.

**Kategorija 2 po GHS ZN/uredbi CLP:** glej ‚Draženje oči‘.

**Brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP:** kemikalije, ki niso razvrščene v kategorijo 1 ali 2 po GHS ZN/uredbi CLP (ali kategorijo 2A ali 2B po GHS ZN).

**UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski proizvodi ali biološki materiali.**

## **B.69 PRESKUSNA METODA REKONSTRUIRANEGA EPITELIJA, PODOBNEGA ČLOVEŠKEMU ROŽENIČNEMU EPITELIJU (RhCE), ZA OPREDELITEV KEMIKALIJ, KI JIH NI TREBA RAZVRSTITI IN OZNAČITI V ZVEZI Z DRAŽENJEM OČI ALI HUDIMI POŠKODBAMI OČI**

### **UVOD**

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 492 (2017). *Huda poškodba oči* pomeni povzročitev poškodbe očesnega tkiva ali resne fizične okvare vida po nanosu preskusne kemikalije na sprednjo površino očesa, ki ni v celoti povračljiva v 21 dneh po nanosu, kot je opredeljeno v globalno usklajenem sistemu Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN) (1) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (uredba CLP)<sup>1</sup>. Prav tako v skladu z GHS ZN in uredbo CLP *draženje oči* pomeni povzročitev sprememb v očesu po nanosu preskusne kemikalije na sprednjo površino očesa, ki so v celoti povračljive v 21 dneh po nanosu. Preskusne kemikalije, ki povzročajo hude poškodbe oči, se razvrstijo v kategorijo 1 po GHS ZN in uredbi CLP, tiste, ki povzročajo draženje oči, pa v kategorijo 2 po GHS ZN in uredbi CLP. Preskusne kemikalije, ki niso razvrščene glede na draženje oči ali hude poškodbe oči, so opredeljene kot kemikalije, ki ne izpolnjujejo meril za razvrstitev v kategorijo 1 ali 2 (2A ali 2B) po GHS ZN in uredbi CLP, kar pomeni, da se nanje sklicuje kot na kemikalije brez kategorije po GHS ZN in uredbi CLP.
2. Ocena hude poškodbe oči/draženja oči običajno poteka z uporabo laboratorijskih živali (TM B.5 (2)). Izbiro najustreznejše preskusne metode in uporabo te preskusne metode je treba obravnavati v okviru smernic OECD za celostne pristope k testiranju in ocenjevanju (IATA) v zvezi s hudimi poškodbami oči in draženjem oči (39).
3. Ta preskusna metoda opisuje postopek *in vitro*, ki omogoča opredelitev kemikalij (snovi in zmesi), ki jih ni treba razvrstiti in označiti v zvezi z draženjem oči ali hudimi poškodbami oči v skladu z GHS ZN in uredbo CLP. Pri njej se uporablja rekonstruiran epitelij, podoben človeškemu roženičnemu epiteliju (RhCE), ki ima zelo podobne histološke, morfološke, biokemijske in fiziološke značilnosti kot epitelij človeške roženice. Da bi se obravnavala končna točka hude poškodbe oči/draženja oči z vidika zdravja ljudi, so bile validirane, obravnavane kot znanstveno veljavne in

---

<sup>1</sup> Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 13.12.2008, str. 1).

sprejete še štiri druge preskusne metode *in vitro*, in sicer preskusne metode B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) in B.68 (6).

4. V to preskusno metodo sta vključena dva validirana preskusa z uporabo na trgu dostopnih modelov rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju. Validacijske študije za oceno draženja oči/hudih poškodb oči so bile izvedene (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) z uporabo preskusov EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) in SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). Pri vsakem od teh preskusov se kot preskusni sistem uporabijo na trgu dostopne konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, v nadaljevanju pa sta navedena kot validirani referenčni metodi – VRM 1 oziroma VRM2. Na podlagi teh validacijskih študij in njunega neodvisnega medsebojnega strokovnega pregleda (9) (12) je bilo ugotovljeno, da se lahko s preskusoma EpiOcular™ EIT in SkinEthic™ HCE EIT pravilno opredelijo kemikalije (tako snovi kot zmesi), ki jih ni treba razvrstiti in označiti v zvezi z draženjem oči ali hudimi poškodbami oči v skladu z GHS ZN, preskusa pa sta bila v ta namen priporočena kot znanstveno veljavna (13).
5. Zdaj na splošno velja, da Draizovega preskusa draženja oči *in vivo* v bližnji prihodnosti ne bo mogoče v celoti nadomestiti z eno samo preskusno metodo *in vitro* (2) (14), da bi se predvidel celoten razpon odzivov na hude poškodbe oči/ draženje oči za različne kemijske razrede. Draizov preskus draženja oči pa bi morda lahko v celoti nadomestile strateške kombinacije več alternativnih preskusnih metod v okviru (večstopenjskih) strategij preskušanja, kot je pristop od spodaj navzgor/od zgoraj navzdol (15). Pristop od spodaj navzgor (15) je treba uporabiti takrat, ko se na podlagi obstoječih informacij pričakuje, da kemikalija ne bo povzročila tolikšnega draženja oči, da bi jo bilo treba razvrstiti, pristop od zgoraj navzdol (15) pa takrat, ko se na podlagi obstoječih informacij pričakuje, da bo kemikalija povzročila hudo poškodbo oči. Preskusa EpiOcular™ EIT in SkinEthic™ HCE EIT se priporočata za opredelitev kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči v skladu z GHS ZN/uredbo CLP (brez kategorije) brez nadaljnjega preskušanja, v okviru strategije preskušanja, kot je pristop od spodaj navzgor/od zgoraj navzdol, ki ga Scott *et al.* na primer priporočajo kot prvi korak pri pristopu od spodaj navzgor ali enega od zadnjih korakov pri pristopu od zgoraj navzdol (15). Vendar preskusa EpiOcular™ EIT in SkinEthic™ HCE EIT nista namenjena razlikovanju med kategorijo 1 po GHS ZN/uredbi CLP (huda poškodba oči) in kategorijo 2 po GHS ZN/uredbi CLP (draženje oči). To razlikovanje bo treba obravnavati z drugo stopnjo preskusne strategije (15). Preskusno kemikalijo, za katero se s preskusom EpiOcular™ EIT ali SkinEthic™ HCE EIT ugotovi, da jo je treba razvrstiti glede na draženje oči/hude poškodbe oči, bo torej treba dodatno preskusiti (*in vitro* in/ali *in vivo*), da se sprejme dokončen sklep (brez kategorije, kategorija 1 ali kategorija 2 po

GHS ZN/uredbi CLP), na primer z uporabo preskusne metode B.47, B.48, B.61 ali B.68.

6. V tej preskusni metodi je opisan postopek za oceno potencialne nevarnosti preskusne kemikalije za oči glede na njeno zmožnost, da v konstrukciji tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, povzroči citotoksičnost, kot je izmerjena s preskusom MTT (16) (glej odstavek 21). Viabilnost tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, po izpostavitvi preskusni kemikaliji se določi glede na tkiva, tretirana z negativno kontrolno snovjo (delež viabilnosti), nato pa se uporabi za napoved potencialne nevarnosti preskusne kemikalije za oči.
7. Na voljo so standardi izvajanja (17), da se olajša validacija novih ali prilagojenih *in vitro* preskusov na podlagi rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, ki so podobni preskusoma EpiOcular™ EIT in SkinEthic™ HCE EIT, v skladu z načeli iz smernic OECD št. 34 (18), in omogoči pravočasna sprememba smernic OECD za preskušanje 492 za njihovo vključitev. Medsebojno priznavanje podatkov v skladu s sporazumom OECD bo zagotovljeno le za preskuse, validirane v skladu s standardi izvajanja, če je te preskuse pregledala OECD in jih vključila v ustrezno smernico za preskušanje.

## **OPREDELITVE POJMOV**

8. Opredelitve so navedene v Dodatku 1.

## **ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE**

9. Ta preskusna metoda temelji na tridimenzionalnih konstrukcijah tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju (RhCE), ki so dostopne na trgu in se proizvajajo bodisi iz primarnih keratinocitov človeške pokožnice (tj. EpiOcular™ OCL-200) bodisi iz nesmrtnih človeških epitelnih celic roženice (tj. SkinEthic™ HCE/S). Konstrukciji tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, EpiOcular™ OCL-200 in SkinEthic™ HCE/S, sta podobni tridimenzionalni strukturi roženičnega epitelija *in vivo* in se proizvajata iz celic preiskovane vrste (19) (20). Poleg tega se s preskusoma neposredno meri citotoksičnost, ki je posledica prehajanja kemikalije skozi roženico ter nastanka poškodb celic in tkiva; od citotoksičnega odziva je nato odvisen splošni rezultat hude poškodbe oči/draženja oči *in vivo*. Poškodbe celic lahko nastanejo zaradi različnih načinov delovanja (glej odstavek 20), vendar ima citotoksičnost pomembno, če ne glavno mehanistično vlogo pri določanju skupnega odziva na kemikalijo s hudo poškodbo oči/draženjem oči, ki se *in vivo* kaže predvsem z motnjavo roženice,

vnetjem šarenice, rdečino veznice in/ali hemozo veznice, ne glede na fizikalno-kemijske procese, ki povzročajo poškodbo tkiva.

10. V validacijski študiji, na kateri temelji ta preskusna metoda, je bil preskušen širok nabor kemikalij, ki zajemajo najrazličnejše kemijske vrste, kemijske razrede, molekulske mase, LogP, kemijske strukture itd. Validacijska zbirka podatkov o preskusu EpiOcular™ EIT je vsebovala skupaj 113 kemikalij, ki zajemajo 95 različnih organskih funkcionalnih skupin glede na analizo z orodjem OECD QSAR (8). Večino teh kemikalij so predstavljale snovi iz ene sestavine, vendar je bilo v študijo vključenih tudi več snovi z več sestavinami (vključno s tremi homopolimeri, petimi kopolimeri in desetimi kvazipolimeri). Glede na agregatno stanje in kategorije po GHS ZN/uredbi CLP je bilo 113 preskušanih kemikalij razvrščenih tako: 13 tekočih snovi kategorije 1, 15 trdnih snovi kategorije 1, 6 tekočih snovi kategorije 2A, 10 trdnih snovi kategorije 2A, 7 tekočih snovi kategorije 2B, 7 trdnih snovi kategorije 2B, 27 tekočih snovi brez kategorije in 28 trdnih snovi brez kategorije (8). Validacijska zbirka podatkov o preskusu SkinEthic™ HCE EIT je vsebovala skupaj 200 kemikalij, ki zajemajo 165 različnih organskih funkcionalnih skupin (8) (10) (11). Večino teh kemikalij so predstavljale snovi iz ene sestavine, vendar je bilo v študijo vključenih tudi več snovi z več sestavinami (vključno z 10 polimeri). Glede na agregatno stanje in kategorije po GHS ZN/uredbi CLP je bilo 200 preskušanih kemikalij razvrščenih tako: 27 tekočih snovi kategorije 1, 24 trdnih snovi kategorije 1, 19 tekočih snovi kategorije 2A, 10 trdnih snovi kategorije 2A, 9 tekočih snovi kategorije 2B, 8 trdnih snovi kategorije 2B, 50 tekočih snovi brez kategorije in 53 trdnih snovi brez kategorije (10) (11).
11. Ta preskusna metoda se uporablja za snovi in zmesi ter trdne snovi, tekoče snovi, poltrdne snovi in voske. Tekoče snovi so lahko vodne raztopine ali ne, trdne snovi so lahko topne ali netopne v vodi. Če je mogoče, je treba trdne snovi pred nanosom zmleti v fin prah; druga predhodna obdelava vzorca ni potrebna. Plini in aerosoli v validacijski študiji niso bili ocenjeni. Čeprav se lahko preskusijo z uporabo tehnologije rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, veljavna preskusna metoda ne dovoljuje preskušanja plinov in aerosolov.
12. Preskusne kemikalije, ki absorbirajo svetlobo v enakem razponu kot formazan MTT (naravno ali po tretiranju), in preskusne kemikalije, ki lahko povzročijo neposredno redukcijo vitalnega barvila MTT (v formazan MTT), lahko vplivajo na meritve viabilnosti tkiva, zato je treba za popravke uporabiti prilagojene kontrole. Vrsta prilagojenih kontrol, ki so lahko potrebne, je odvisna od vrste interference, ki jo povzroča preskusna kemikalija, in postopka za kvantifikacijo formazana MTT (glej odstavke 36–42).

13. Rezultati, dobljeni s predvalidacijsko (21) (22) in popolno validacijsko (8) (10) (11) študijo, dokazujejo, da se lahko preskusa EpiOcular™ EIT in SkinEthic™ HCE EIT preneseta v laboratorije, za katere se šteje, da nimajo izkušenj z izvajanjem preskusov, ter da ju je mogoče obnoviti znotraj laboratorija in med laboratoriji. Na podlagi teh študij je stopnja obnovljivosti v smislu ujemanja napovedi, ki jo je mogoče pričakovati pri preskusu EpiOcular™ EIT glede na podatke o 113 kemikalijah, v enem laboratoriju 95-odstotna, v več laboratorijih pa 93-odstotna. Stopnja obnovljivosti v smislu ujemanja napovedi, ki jo je mogoče pričakovati pri preskusu SkinEthic™ HCE EIT glede na podatke o 120 kemikalijah, je v enem laboratoriju 92-odstotna, v več laboratorijih pa 95-odstotna.
14. Preskus EpiOcular™ EIT se lahko uporabi za opredelitev kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči v skladu s sistemom za razvrščanje po GHS ZN in uredbi CLP. Glede na podatke, pridobljene v validacijski študiji (8), ima preskus EpiOcular™ EIT 80-odstotno splošno točnost (na podlagi 112 kemikalij), 96-odstotno občutljivost (na podlagi 57 kemikalij), 4-odstotni delež lažno negativnih rezultatov (na podlagi 57 kemikalij), 63-odstotno specifičnost (na podlagi 55 kemikalij) in 37-odstotni delež lažno pozitivnih rezultatov (na podlagi 55 kemikalij) v primerjavi s podatki *in vivo* preskusa draženja oči na kuncih (preskusna metoda B.5) (2) (14), razvrščenimi v skladu s sistemom za razvrščanje po GHS ZN in uredbi CLP. Študija, v kateri je bilo s preskusom EpiOcular™ EIT preskušanih 97 tekočih agrokemijskih pripravkov, je dokazala podobno učinkovitost preskusne metode za to vrsto zmesi, kot je bila dobljena v validacijski študiji (23). 97 pripravkov je bilo razvrščenih tako: 21 kategorije 1, 19 kategorije 2A, 14 kategorije 2B in 43 brez kategorije, razvrščenih v skladu s sistemom za razvrščanje po GHS ZN na podlagi podatkov *in vivo* preskusa draženja oči na kuncih (preskusna metoda B.5) (2) (14). Dobljeni so bili 82-odstotna splošna točnost (na podlagi 97 pripravkov), 91-odstotna občutljivost (na podlagi 54 pripravkov), 9-odstotni delež lažno negativnih rezultatov (na podlagi 54 pripravkov), 72-odstotna specifičnost (na podlagi 43 pripravkov) in 28-odstotni delež lažno pozitivnih rezultatov (na podlagi 43 pripravkov) (23).
15. Preskus SkinEthic™ HCE EIT se lahko uporabi za opredelitev kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči v skladu s sistemom za razvrščanje po GHS ZN in uredbi CLP. Glede na podatke, pridobljene v validacijski študiji (10) (11), ima preskus SkinEthic™ HCE EIT 84-odstotno splošno točnost (na podlagi 200 kemikalij), 95-odstotno občutljivost (na podlagi 97 kemikalij), 5-odstotni delež lažno negativnih rezultatov (na podlagi 97 kemikalij), 72-odstotno specifičnost (na podlagi 103 kemikalij) in 28-odstotni delež lažno pozitivnih rezultatov (na podlagi 103 kemikalij) v primerjavi s podatki *in vivo* preskusa draženja oči na kuncih (preskusna metoda B.5) (2) (14), razvrščenimi v skladu s sistemom za razvrščanje po GHS ZN in uredbi CLP.

16. Deleža lažno negativnih rezultatov, dobljena z obema preskusoma rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, za snovi ali zmesi spadata v okvir 12-odstotne splošne verjetnosti, da bodo kemikalije z Draizovim preskusom draženja oči *in vivo* pri ponovljenih preskusih opredeljene kot kategorija 2 po GHS ZN in uredbi CLP ali brez kategorije po GHS ZN in uredbi CLP; razlog za to je variabilnost znotraj preskusa, ki je neločljivo povezana z metodo (24). Deleža lažno pozitivnih rezultatov, dobljena z obema preskusnima metodama rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, za snovi ali zmesi, nista ključna v okviru te preskusne metode, saj je za vse preskusne kemikalije, ki povzročajo viabilnost tkiva, ki je največ enaka določenim mejnim vrednostim (glej odstavek 44), potrebno nadaljnje preskušanje z drugimi preskusnimi metodami *in vitro* ali – kot zadnja možnost pri kuncih –, odvisno od regulativnih zahtev, uporaba strategije zaporednega preskušanja s pristopom, ki temelji na zanesljivosti dokazov. Ti preskusni metodi se lahko uporabita za vse vrste kemikalij, pri čemer je treba negativni rezultat sprejeti, kot da ne razvršča kemikalije glede na draženje oči ali hude poškodbe oči (brez kategorije po GHS ZN in uredbi CLP). Pred uporabo preskusov EpiOcular™ EIT in SkinEthic™ HCE EIT v okviru drugih sistemov za razvrščanje, ki niso sistemi po GHS ZN/uredbi CLP, se je treba posvetovati z ustreznimi regulativnimi organi.
17. Omejitev te preskusne metode je, da ne omogoča razlikovanja med draženjem oči/povračljivimi učinki na oči (kategorija 2) in hudo poškodbo oči/nepovračljivimi učinki na oči (kategorija 1), kot so opredeljeni z GHS ZN in uredbo CLP, niti med dražilnimi snovmi za oči (neobvezna kategorija 2A) in blagimi dražilnimi snovmi za oči (neobvezna kategorija 2B), kot so opredeljene z GHS ZN (1). Za te namene je potrebno nadaljnje preskušanje z drugimi preskusnimi metodami *in vitro*.
18. Pojem ‚preskusna kemikalija‘ se pri tej preskusni metodi nanaša na to, kar se preskuša<sup>1</sup>, in ni povezan z uporabnostjo preskusne metode rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, za preskušanje snovi in/ali zmesi.

## NAČELO PRESKUSA

19. Preskusna kemikalija se nanese topično na vsaj dve tridimenzionalni konstrukciji tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, nato

---

<sup>1</sup> Junija 2013 je bil na skupnem zasedanju OECD sprejet dogovor, da bi bilo treba v novih in posodobljenih smernicah OECD za preskušanje pojem ‚preskusna kemikalija‘, ki opisuje, kaj se preskuša, zdaj dosledneje uporabljati, kjer je to mogoče.

pa se po izpostavljenosti in inkubacijski dobi po tretiranju izmeri viabilnost tkiv. Tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, se rekonstruirajo iz primarnih keratinocitov človeške pokožnice ali nesmrtnih človeških epitelnih celic roženice, ki so se gojile več dni, tako da tvorijo razslojen, zelo diferenciran skvamozni epitelij, ki je morfološko podoben tistemu v človeški roženici. Konstrukcijo tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, pri preskusu EpiOcular™ sestavljajo vsaj tri plasti živih celic in neporoženela površina, katere struktura je podobna roženici *in vivo*. Konstrukcijo tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, pri preskusu SkinEthic™ HCE sestavljajo vsaj štiri plasti živih celic, ki vključujejo stebričaste bazalne celice, prehodne krilaste celice in površinske skvamozne celice, podobne celicam normalnega človeškega roženičnega epitelija (20) (26).

20. S kemikalijo izzvane hude poškodbe oči/draženje oči, ki se *in vivo* kažejo predvsem z motnjavo roženice, vnetjem šarenice, rdečino veznice in/ali hemozo veznice, so rezultat kaskadnih reakcij, ki se začnejo s prodiranjem kemikalije skozi roženico in/ali veznico in nastankom poškodb celic. Poškodbe celic lahko nastanejo z različnimi načini delovanja, vključno z: lizo celične membrane (npr. s površinsko aktivnimi snovmi, organskimi topili); koagulacijo makromolekul (zlasti proteinov) (npr. s površinsko aktivnimi snovmi, organskimi topili, bazami in kislinami); umiljenjem lipidov (npr. z bazami) in alkilacijo ali drugimi kovalentnimi interakcijami z makromolekulami (npr. z belili, peroksidi in alkilatorji) (15) (27) (28). Vendar je bilo dokazano, da ima citotoksičnost pomembno, če ne glavno mehanistično vlogo pri določanju skupnega odziva na kemikalijo s hudo poškodbo oči/draženjem oči, ne glede na fizikalno-kemijske procese, ki povzročijo poškodbo tkiva (29) (30). Poleg tega je potencial kemikalije, da povzroči hude poškodbe oči/draženje oči, odvisen predvsem od obsega začetne poškodbe (31), ki je v korelaciji z obsegom celične smrti (29) ter obsegom poznejših odzivov in morebitnih rezultatov (32). Tako rahlo dražilne snovi običajno prizadenejo samo površinski epitelij roženice, blago in zmerno dražilne snovi poškodujejo predvsem epitelij in površinsko stromo, zelo dražilne snovi pa poškodujejo epitelij, globoko stromo in včasih roženični endotelij (30) (33). Merjenje viabilnosti konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, po topični izpostavitvi preskusni kemikaliji, da bi se opredelile kemikalije, ki jih ni treba razvrstiti glede na hude poškodbe oči/draženje oči (brez kategorije po GHS ZN in uredbi CLP), temelji na domnevi, da vse kemikalije, ki povzročajo hude poškodbe oči ali draženje oči, povzročajo citotoksičnost v roženičnem epiteliju in/ali veznici.
21. Viabilnost tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, se običajno meri z encimsko pretvorbo vitalnega barvila MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid; tiazolil modro tetrazol bromid;

številka CAS 298–93-1), ki jo povzročijo viabilne celice tkiva, v sol modrega formazana MTT, količina katere se kvantitativno izmeri po ekstrakciji iz tkiv (16). Kemikalije, ki jih ni treba razvrstiti in označiti v skladu z GHS ZN/uredbo CLP (brez kategorije), so opredeljene kot kemikalije, ki ne zmanjšujejo viabilnosti tkiva pod določen prag (tj. viabilnost tkiva > 60 % pri preskusih EpiOcular™ EIT in SkinEthic™ HCE EITL<sup>1</sup> ali > 50 % pri preskusu SkinEthic™ HCE EITS<sup>2</sup>) (glej odstavek 44).

## DOKAZOVANJE USPOSOBLJENOSTI

22. Pred redno uporabo preskusov rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, za regulativne namene morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost, tako da pravilno napovejo 15 kemikalij za preverjanje usposobljenosti, navedenih v preglednici 1. Te kemikalije so bile izbrane med kemikalijami, uporabljenimi v validacijskih študijah VRM (8) (10) (11). Kolikor je mogoče, so bile v izbor vključene kemikalije, ki: (i) zajemajo različna agregatna stanja; (ii) zajemajo celoten razpon odzivov *in vivo* s hudimi poškodbami oči/draženjem oči na podlagi visokokakovostnih rezultatov, dobljenih v referenčnem *in vivo* preskusu draženja oči na kuncih (preskusna metoda B.5) (2) (14), ter sistema za razvrščanje po GHS ZN (tj. kategorije 1, 2A, 2B ali brez kategorije) (1) in sistema za razvrščanje po uredbi CLP (tj. kategoriji 1 in 2 ali brez kategorije); (iii) zajemajo različne dejavnike razvrščanja *in vivo* (24) (25); (iv) predstavljajo kemijske razrede, uporabljene v validacijski študiji (8) (10) (11); (v) dobro in široko predstavljajo organske funkcionalne skupine (8) (10) (11); (vi) imajo dobro opredeljene kemijske strukture (8) (10) (11); (vii) so obarvane in/ali neposredno zmanjšujejo MTT; (viii) so povzročile obnovljive rezultate pri preskusnih metodah rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, med njihovo validacijo; (ix) so bile pravilno napovedane s preskusnimi metodami rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, med njihovimi validacijskimi študijami; (x) zajemajo celoten razpon odzivov *in vitro* na podlagi visokokakovostnih podatkov o preskusnih metodah rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju (od 0- do 100-odstotna viabilnost); (xi) so na voljo na trgu in (xii) se ne povezujejo s previsokimi stroški pridobivanja in/ali odstranjevanja. V primerih, ko kemikalija s seznama ni na voljo ali je ni mogoče uporabiti iz drugih utemeljenih

---

<sup>1</sup> EITL: EIT za tekočine v primeru preskusa SkinEthic™ HCE.

<sup>2</sup> EITS: EIT za trdne snovi v primeru preskusa SkinEthic™ HCE.

razlogov, se lahko uporabi druga kemikalija, ki izpolnjuje zgoraj opisana merila, npr. spada med kemikalije, ki so bile uporabljene pri validaciji VRM. Taka odstopanja je treba sicer utemeljiti.

**Preglednica 1:** Seznam kemikalij za preverjanje usposobljenosti

Kemijsko ime	Št. CAS	Organska funkcionalna skupina <sup>1</sup>	Agregatno stanje	Viabilnost VRM1 (%) <sup>2</sup>	Viabilnost VRM2 (%) <sup>3</sup>	Napoved VRM	Snov, ki zmanjšuje MTT	Barvna interf.
<b>Kategorija 1 in vivo<sup>4</sup></b>								
Metil tioglikolat	2365-48-2	karboksilna kislina, ester; tioalkohol	tekoče	10,9 ± 6,4	5,5 ± 7,4	napoved ni mogoča	da (močen)	ne
Hidroksietil akrilat	818-61-1	akrilat; alkohol	tekoče	7,5 ± 4,7 <sup>5</sup>	1,6 ± 1,0	napoved ni mogoča	ne	ne
2,5-dimetil-2,5-heksandiol	110-03-2	alkohol	trdno	2,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	napoved ni mogoča	ne	ne
Natrijev oksalat	62-76-0	oksokarboksilna kislina	trdno	29,0 ± 1,2	5,3 ± 4,1	napoved ni mogoča	ne	ne
<b>Kategorija 2A in vivo<sup>4</sup></b>								
2,4,11,13-tetraazatetradekan-diimidamid, N,N <sup>6</sup> -bis(4-klorofenil)-3,12-diimino-, di-D-glukonat (20 %, vodni) <sup>6</sup>	18472-51-0	aromatski heterociklični halid; aril halid; dihidroksilna skupina; gvanidin	tekoče	4,0 ± 1,1	1,3 ± 0,6	napoved ni mogoča	ne	da (šibek)
Natrijev benzoat	532-32-1	aril; karboksilna kislina	trdno	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	napoved ni mogoča	ne	ne
<b>Kategorija 2B in vivo<sup>4</sup></b>								
Dietil toluamid	134-62-3	benzamid	tekoče	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	napoved ni mogoča	ne	ne
2,2-dimetil-3-metilenbiciklo [2.2.1] heptan	79-92-5	alkan, razvejan s terciarnim ogljikom; alken; bicikloheptan; premoščene karbociklične spojine; cikloalkan	trdno	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	napoved ni mogoča	ne	ne
<b>Brez kategorije in vivo<sup>4</sup></b>								
1-etil-3-metilimidazolijev etilsulfat	342573-75-5	alkoksi; amonijeva sol; aril; imidazol; sulfat	tekoče	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	brez kat.	ne	ne
Dikaprilil eter	629-82-3	alkoksi; eter	tekoče	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	brez kat.	ne	ne

Kemijsko ime	Št. CAS	Organska funkcionalna skupina <sup>1</sup>	Agregatno stanje	Viabilnost VRM1 (%) <sup>2</sup>	Viabilnost VRM2 (%) <sup>3</sup>	Napoved VRM	Snov, ki zmanjšuje MTT	Barvna interf.
Piperonil butoksid	51-03-6	alkoksi; benzodioksol; benzil; eter	tekoče	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	brez kat.	ne	ne
Polietilen glikol (PEG-40) hidrogenirano ricinusovo olje	61788-85-0	acilal; alkohol; alil; eter	viskozno	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	brez kat.	ne	ne
1-(4-klorofenil)-3-(3,4-diklorofenil) ureja	101-20-2	aromatski heterociklični halid; aril halid; derivati ureje	trdno	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6,6	brez kat.	ne	ne
2,2'-metilen-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenol)	103597-45-1	alkan, razvejan s kvarternim ogljikom; združena aromatska karbociklična spojina; združeni nasičeni heterocikli; prekurzorske kvinoidne spojine; terc-butil	trdno	102,7 ± 13,4	97,7 ± 5,6	brez kat.	ne	ne
Kalijev tetrafluoroborat	14075-53-7	anorganska sol	trdno	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	Brez kat.	ne	ne

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS); GHS ZN = globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (1); VRM1 = validirana referenčna metoda, EpiOcular™ EIT; VRM2 = validirana referenčna metoda, SkinEthic™ HCE EIT; barvna interf. = barvna interferenca pri meritvi standardne absorbance (optična gostota (OD)) formazana MTT.

<sup>1</sup> Organska funkcionalna skupina, dodeljena glede na ugnezdno analizo z orodjem OECD Toolbox 3.1 (8).

<sup>2</sup> Na podlagi rezultatov, dobljenih s preskusom EpiOcular™ EIT, v validacijski študiji EURL ECVAM/Cosmetics Europe Eye Irritation Validation Study (EIVS) (8).

<sup>3</sup> Na podlagi rezultatov, dobljenih s preskusom SkinEthic™ HCE EIT, v validacijski študiji (10) (11).

<sup>4</sup> Na podlagi rezultatov *in vivo* preskusa draženja oči na kuncih (preskusna metoda B.5/OECD TG 405) (2) (14) in z uporabo GHS ZN.

<sup>5</sup> Na podlagi rezultatov, dobljenih v CEFIC CONsortium, za študijo strategije preskušanja draženja oči *in vitro* (CON4EI).

<sup>6</sup> Razvrstitev v kategorijo 2A ali 2B je odvisna od razlage merila za razlikovanje med obema kategorijama po GHS ZN, in sicer ena od treh oziroma dve od treh živali, ki imajo na sedmi dan učinke, zaradi katerih je treba kemikalijo razvrstiti v kategorijo 2A. V študijo *in vivo* so bile vključene tri živali. Vse končne točke, razen motnjave roženice na eni živali, so se do sedmega dne ali prej popravile in so dosegle vrednost nič. Pri eni živali, ki si do sedmega dne ni popolnoma opomogla, je motnjava roženice (na sedmi dan) dosegla vrednost 1, popolnoma pa si je opomogla deveti dan.

23. V okviru preskušanja usposobljenosti se priporoča, naj uporabniki po prejetju preverijo značilnosti pregrade tkiv, kakor to določa proizvajalec konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju (glej odstavke 25, 27 in 30). To je zlasti pomembno, če tkiva potujejo na dolge razdalje/dalj časa. Potem ko je preskus uspešno vzpostavljen ter je pridobljena in dokazana usposobljenost za njegovo uporabo, tako redno preverjanje ni več potrebno. Vendar se priporoča, da se ob redni uporabi preskusa še naprej ocenjujejo značilnosti pregrade v rednih časovnih razmikih.

## **POSTOPEK**

24. Preskusa, ki sta zdaj zajeta s to preskusno metodo, sta znanstveno veljavna EpiOcular™ EIT in SkinEthic™ HCE EIT (9) (12) (13), imenovana validirana referenčna metoda (VRM1 oziroma VRM2). Na voljo so standardni delovni postopki za preskusne metode rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, ki jih je treba uporabljati pri izvajanju in uporabi preskusnih metod v laboratoriju (34) (35). V naslednjih odstavkih in Dodatku 2 so opisani glavni elementi in postopki preskusov rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju.

## **ELEMENTI PRESKUSNE METODE REKONSTRUIRANEGA EPITELIJA, PODOBNEGA ČLOVEŠKEMU ROŽENIČNEMU EPITELIJU**

### **Splošni pogoji**

25. Za rekonstrukcijo tridimenzionalnega tkiva epitelija, podobnega roženičnemu epiteliju, ki mora biti sestavljen iz postopno razslojenih, vendar ne poroženih celic, je treba uporabiti ustrezne človeške celice. Konstrukcija tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, se pripravi v vstavkih s porozno sintetično membrano, skozi katero lahko hranila prehajajo do celic. V rekonstruiranem epiteliju, podobnem roženičnemu epiteliju, mora biti več slojev živih, neporoženih epiteljskih celic. Epitelna površina konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, mora biti v neposrednem stiku z zrakom, da se omogoči neposredna topična izpostavljenost preskusnim kemikalijam, podobno kot bi bil roženični epitelij izpostavljen *in vivo*. Konstrukcija tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, mora tvoriti dovolj močno funkcionalno pregrado za zaustavitev hitre penetracije citotoksičnih primerjalnih snovi, npr. Tritona X-100 ali natrijevega dodecil sulfata (SDS). Pregradna funkcija mora biti dokazana in se lahko oceni z določitvijo časa izpostavljenosti, ki je potreben za zmanjšanje viabilnosti tkiva za 50 % (ET<sub>50</sub>) po nanosu določene stalne koncentracije primerjalne snovi (npr. 100 µl Tritona X-100 s koncentracijo 0,3 vol. %), ali koncentracije, pri kateri se zaradi

primerjalne snovi po določenem času izpostavljenosti viabilnost tkiv zmanjša za 50 % (IC<sub>50</sub>) (npr. 30-minutno tretiranje s 50 µl SDS) (glej odstavek 30). Zadrževalne značilnosti konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, morajo preprečevati prehod preskusne kemikalije okoli roba viabilnega tkiva, kar bi lahko preprečilo učinkovitost modelov za raziskovanje v zvezi z izpostavljenostjo roženice. Človeške celice, uporabljene za pripravo konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, ne smejo biti okužene z bakterijami, virusi, mikoplazmo ali glivami. Sterilnost konstrukcije tkiva mora preveriti dobavitelj, da izključi okužbo z glivami ali bakterijami.

## **Pogoji za funkcionalnost**

### *Viabilnost*

26. Preskus, ki se uporablja za kvantifikacijo viabilnosti tkiva, je preskus MTT (16). Viabilne celice konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, reducirajo vitalno barvilo MTT v oborino modrega formazana MTT, ki se nato ekstrahira iz tkiva z uporabo izopropanola (ali podobnega topila). Ekstrahirani formazan MTT se lahko kvantificira bodisi z uporabo meritve standardne absorbance (optična gostota (OD)) bodisi z uporabo postopka spektrofotometrije HPLC/UPLC (36). Optična gostota (OD) izvlečka ekstrakcijskega topila mora biti dovolj majhna, tj.  $OD < 0,1$ . Uporabniki konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, morajo zagotoviti, da vsaka serija konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, izpolnjuje merila, določena za negativno kontrolo. Razponi sprejemljivosti za vrednosti optične gostote pri negativni kontroli za validirani preskusni metodi so navedeni v preglednici 2. Uporabnik spektrofotometrije HPLC/UPLC mora razpone optične gostote pri negativni kontroli, navedene v preglednici 2, uporabiti kot merilo za sprejemljivost negativne kontrole. V poročilu o preskusu je treba evidentirati, da so tkiva, tretirana z negativno kontrolno snovjo, obstojna v kulturi (zagotoviti je treba podobne meritve viabilnosti tkiva) med celotnim trajanjem preskusnega obdobja izpostavljenosti. Podoben postopek mora proizvajalec tkiva uporabiti v okviru kontrole kakovosti ob sprostitvi serij tkiv, vendar se lahko v tem primeru uporabijo drugačna merila za sprejemljivost, kot so navedena v preglednici 2. Razpon sprejemljivosti (zgornja in spodnja meja) za vrednosti optične gostote pri negativni kontroli (v pogojih kontrole kakovosti preskusne metode) mora določiti razvijalec/dobavitelj konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju.

**Preglednica 2:** Razponi sprejemljivosti za vrednosti optične gostote pri negativni kontroli (za uporabnike preskusa)

Preskus	Spodnja meja sprejemljivosti	Zgornja meja sprejemljivosti
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (za protokol za tekoče snovi in protokol za trdne snovi)	> 0,8 <sup>1</sup>	< 2,5
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (za protokol za tekoče snovi in protokol za trdne snovi)	> 1,0	≤ 2,5

<sup>1</sup> Pri tej meji sprejemljivosti se upošteva možnost podaljšane časa dobave/hrambe (npr. > 4 dni), ki dokazano ne vpliva na učinkovitost preskusne metode (37).

### *Pregradna funkcija*

27. Konstrukcija tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, mora biti dovolj debela in trdna, da zaustavi hitro penetracijo citotoksičnih primerjalnih snovi, ocenjenih npr. z ET<sub>50</sub> (Triton X-100) ali IC<sub>50</sub> (SDS) (preglednica 3). Pregradno funkcijo vsake serije uporabljene konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, mora dokazati njen razvijalec/prodajalec ob dobavi tkiv končnemu uporabniku (glej odstavek 30).

### *Morfologija*

28. Histološki pregled konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, mora dokazati strukturo epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju (vključno z vsaj tremi plastmi živih epiteljskih celic in neporoženo površino). Za VRM je ustrezno morfologijo določil razvijalec/dobavitelj, zato je uporabniku preskusne metode ni treba znova dokazovati za vsako uporabljeno serijo tkiv.

### *Obnovljivost*

29. Rezultati pozitivnih in negativnih kontrol preskusne metode morajo dokazovati obnovljivost v daljšem časovnem obdobju.

### *Kontrola kakovosti*

30. Konstrukcija tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, se lahko uporabi samo, če razvijalec/dobavitelj dokaže, da vsaka serija konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, izpolnjuje opredeljena merila za sprostitev proizvodnje, med katerimi sta najpomembnejši merili za viabilnost (odstavek 26) in pregradno funkcijo (glej odstavek 27). Razpon sprejemljivosti (zgornja in spodnja meja) za pregradne funkcije, izmerjene z ET<sub>50</sub> ali IC<sub>50</sub> (glej odstavka 25 in 26), mora določiti razvijalec/dobavitelj konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju. Razpon sprejemljivosti ET<sub>50</sub> in IC<sub>50</sub>, ki ga kot merilo za kontrolo kakovosti ob sprostitvi serij uporabi razvijalec/dobavitelj konstrukcij tkiva rekonstruiranega

epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju (uporabljenih v VRM), je naveden v preglednici 3. Podatke, ki dokazujejo skladnost z vsemi merili za sprostitev proizvodnje, mora razvijalec/dobavitelj konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, zagotoviti uporabnikom preskusne metode, da lahko te informacije vključijo v poročilo o preskusu. Za zanesljivo napoved kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti in označiti v zvezi z draženjem oči ali hudimi poškodbami oči v skladu z GHS ZN in uredbo CLP, se lahko sprejmejo samo rezultati, dobljeni s tkivi, ki izpolnjujejo vsa ta merila za sprostitev proizvodnje.

**Preglednica 3:** Merilo za kontrolo kakovosti ob sprostitvi serij

Preskus	Spodnja meja sprejemljivosti	Zgornja meja sprejemljivosti
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (100 µl Tritona X-100 s koncentracijo 0,3 vol. %)	ET <sub>50</sub> = 12,2 min	ET <sub>50</sub> = 37,5 min
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (30-minutno tretiranje s 50 µl SDS)	IC <sub>50</sub> = 1 mg/ml	IC <sub>50</sub> = 3,2 mg/ml

### Nanos preskusne kemikalije in kontrolnih snovi

31. Za vsako preskusno kemikalijo in vsako kontrolno snov je treba pri vsaki ponovitvi uporabiti vsaj dva ponovljena vzorca tkiva. Uporabljata se dva različna protokola tretiranja, in sicer eden za tekoče preskusne kemikalije in eden za trdne preskusne kemikalije (34) (35). Za obe metodi in protokola je treba površino konstrukcije tkiva pred nanosom preskusnih kemikalij navlažiti z Dulbeccovim fosfatnim pufrom s soljo (PBS) brez kalcija in magnezija (DPBS brez Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>), da se posnema vlažnost v človeškem očesu. Tretiranje tkiv se začne z izpostavitvijo preskusnim kemikalijam in kontrolnim snovem. Pri obeh protokolih tretiranja pri obeh VRM je treba nanesti zadostno količino preskusne kemikalije ali kontrolne snovi, da se enakomerno prekrije površina epitelija, pri čemer mora biti odmerek natančno določen (glej odstavka 32 in 33) (Dodatek 2).
32. Pri VRM se kot tekoče snovi obravnavajo preskusne kemikalije, ki jih je mogoče odmeriti s pipeto pri 37 °C ali nižjih temperaturah (po potrebi z uporabo pipete za neposredno izpodrivanje tlaka), sicer jih je treba obravnavati kot trdne snovi (glej odstavek 33). Pri VRM se tekoča preskusna kemikalija enakomerno porazdeli po površini tkiva (tj. vsaj 60 µl/cm<sup>2</sup> nanosa) (glej Dodatek 2 (33) (34)). Kolikor je mogoče, je treba preprečiti kapilarne učinke (učinki površinske napetosti), ki se lahko pojavijo zaradi nanosa majhnih količin v vstavek (na površini tkiva), da se zagotovi pravilno odmerjanje tkiva. Tkiva, tretirana s tekočimi preskusnimi kemikalijami, se 30 minut inkubirajo pri standardnih pogojih gojenja (37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO<sub>2</sub>, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost). Ob koncu obdobja izpostavljenosti je treba tekočo preskusno kemikalijo in kontrolne snovi pazljivo odstraniti s površine tkiva, in sicer z

izdatnim spiranjem z DPBS brez  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  pri sobni temperaturi. Tej fazi spiranja sledi potopitev v sveže gojišče po izpostavljenosti pri sobni temperaturi (da se odstrani preskusna kemikalija, ki se je morda absorbirala v tkivo) za predhodno določen čas, ki je odvisen od uporabljene VRM. Samo pri VMR1 se inkubacija po izpostavljenosti v svežem gojišču pri standardnih pogojih gojenja uporabi pred izvedbo preskusa MTT (glej Dodatek 2 (34) (35)).

33. Preskusne kemikalije, ki jih ni mogoče odmeriti s pipeto pri temperaturi do 37 °C, se pri VRM obravnavajo kot trdne snovi. Nanesti je treba zadostno količino preskusne kemikalije, da prekrije celotno površino tkiva, tj. nanesti je treba vsaj 60 mg/cm<sup>2</sup> (Dodatek 2). Če je mogoče, je treba trdne snovi preskusiti v obliki finega prahu. Tkiva, tretirana s trdnimi preskusnimi kemikalijami, se za predhodno določen čas (odvisno od uporabljene VRM) inkubirajo pri standardnih pogojih gojenja (glej Dodatek 2 (34) (35)). Ob koncu obdobja izpostavljenosti je treba trdno preskusno kemikalijo in kontrolne snovi pazljivo odstraniti s površine tkiva, in sicer z izdatnim spiranjem z DPBS brez  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  pri sobni temperaturi. Tej fazi spiranja pred izvedbo preskusa MTT sledita potopitev v sveže gojišče po izpostavljenosti pri sobni temperaturi (da se odstrani preskusna kemikalija, ki se je morda absorbirala v tkivo) za predhodno določeno obdobje, ki je odvisno od uporabljene VRM, in inkubacija po izpostavljenosti v svežem gojišču pri standardnih pogojih gojenja (glej Dodatek 2 (34) (35)).
34. Pri vsaki ponovitvi je treba vključiti sočasno negativno in pozitivno kontrolo, da se dokaže, da sta viabilnost (določena pri negativni kontroli) in občutljivost (določena pri pozitivni kontroli) tkiv znotraj območij sprejemljivosti, opredeljenih na podlagi podatkov iz preteklih preskusov. Sočasna negativna kontrola je tudi izhodišče (100-odstotna viabilnost tkiva) za izračun relativnega deleža viabilnosti tkiv, tretiranih s preskusno kemikalijo (%Viabilnost<sub>preskus</sub>). Priporočena snov za pozitivno kontrolo, ki se uporabi pri VRM, je čisti metilacetat (št. CAS 79-20-9, na trgu na voljo npr. pri podjetju Sigma-Aldrich, kat. št. 45997; tekočina). Priporočeni snovi za negativno kontrolo, ki se uporabita pri VRM1 in VRM2, sta ultra čista H<sub>2</sub>O oziroma DPBS brez  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ . To so kontrolne snovi, ki so bile uporabljene v validacijskih študijah VRM in za katere obstaja največ podatkov iz preteklih preskusov. Uporaba ustreznih alternativnih snovi za pozitivno ali negativno kontrolo mora biti znanstveno in ustrezno utemeljena. Negativne in pozitivne kontrole je treba preskusiti z enakimi protokoli, kot so bili uporabljeni za preskusne kemikalije, vključene v ponovitev (tj. za tekoče in/ali trdne snovi). Temu nanosu morajo slediti izpostavljenost tretiranju, spiranje, potopitev po izpostavitvi in inkubacija po izpostavitvi, če je ustrezno, kot je opisano za kontrole, izvedene sočasno s tekočimi preskusnimi kemikalijami (glej odstavek 32), ali za kontrole, izvedene sočasno s trdnimi preskusnimi kemikalijami (glej odstavek 33), pred izvedbo preskusa MTT (glej odstavek 35) (34) (35). En sam

niz negativne in pozitivne kontrole zadostuje za vse preskusne kemikalije v istem agregatnem stanju (tekoče ali trdne snovi), vključene v isto ponovitev.

### **Meritve viabilnosti tkiv**

35. Preskus MTT je standardizirana kvantitativna metoda (16), ki jo je treba v okviru te preskusne metode uporabljati za merjenje viabilnosti tkiv. Združljiv je z uporabo tridimenzionalne konstrukcije tkiva. Preskus MTT se izvede takoj po obdobju inkubacije, ki sledi izpostavitvi. Pri VRM se vzorec konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, za  $180 \pm 15$  minut potopi v 0,3 ml raztopine MTT s koncentracijo 1 mg/ml pri standardnih pogojih gojenja. Viabilne celice konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, reducirajo vitalno barvilo MTT v oborino modrega formazana MTT. Oborina modrega formazana MTT se nato ekstrahira iz tkiva z uporabo ustrezne količine izopropanola (ali podobnega topila) (34) (35). Tkiva, preskušena s tekočimi preskusnimi kemikalijami, je treba ekstrahirati iz zgornjega in spodnjega dela tkiv, tkiva, preskušena s trdnimi preskusnimi kemikalijami in obarvanimi tekočinami, pa je treba ekstrahirati samo iz spodnjega dela tkiva (da se zmanjša potencialna kontaminacija ekstrakcijske raztopine izopropanola s preskusno kemikalijo, ki je morda ostala na tkivu). Tkiva, preskušena s tekočimi preskusnimi kemikalijami, ki se težko sperejo, se prav tako lahko ekstrahirajo samo iz spodnjega dela. Sočasno preskušane snovi za negativno in pozitivno kontrolo je treba tretirati podobno kot preskusno kemikalijo. Ekstrahirani formazan MTT se lahko kvantitativno določi z meritvijo standardne absorbance (OD) pri valovni dolžini 570 nm z uporabo filtrirane valovne dolžine največ  $\pm 30$  nm ali s postopkom spektrofotometrije HPLC/UPLC (glej odstavek 42) (11) (36).
36. Optične lastnosti preskusne kemikalije ali njenega kemijskega delovanja na MTT lahko ovirajo meritev formazana MTT, kar lahko povzroči lažno oceno viabilnosti tkiv. Preskusne kemikalije lahko vplivajo na meritev formazana MTT z neposredno redukcijo MTT v modri formazan MTT in/ali z barvno interferenco, če preskusna kemikalija naravno ali zaradi postopkov tretiranja absorbira v istem razponu optične gostote kot formazan MTT (tj. približno 570 nm). Pred preskušanjem je treba izvesti predhodna preverjanja, da se opredelijo morebitne snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, in/ali kemikalije, ki povzročajo barvno interferenco, poleg tega je treba uporabiti dodatne kontrole, da se zazna in popravi morebitna interferenca zaradi takih preskusnih kemikalij (glej odstavke 37–41). To je še zlasti pomembno, če se določena preskusna kemikalija iz konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, s spiranjem ne odstrani v celoti ali če prodre v roženični epitelij, tako da je med preskusom MTT prisotna v konstrukcijah tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju. Za preskusne kemikalije, ki absorbirajo svetlobo v istem razponu kot formazan MTT

(naravno ali po tretiranju) in zaradi premočne interference niso združljive z meritvijo standardne absorbance (OD) formazana MTT, tj. močna absorpcija pri  $570 \pm 30$  nm, se lahko za merjenje formazana MTT uporabi postopek spektrofotometrije HPLC/UPLC (glej odstavka 41 in 42) (11) (36). Za podrobnejši opis načina zaznave in popravka neposredne redukcije MTT in vpliva barvil glej standardne delovne postopke za VRM (34) (35). V dodatkih III oziroma IV so na voljo tudi shematski prikazi z navodili o tem, kako pri VRM1 in VRM2 opredeliti in obravnavati snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, in/ali kemikalije, ki povzročajo barvno interferenco.

37. Za opredelitev morebitne interference zaradi preskusnih kemikalij, ki absorbirajo svetlobo v istem razponu kot formazan MTT (naravno ali po tretiranju), in odločitev, ali so potrebne dodatne kontrole, se preskusna kemikalija doda v vodo in/ali izopropanol ter ustrezno dolgo inkubira pri sobni temperaturi (glej Dodatek 2, (34) (35)). Če preskusna kemikalija v vodi in/ali izopropanolu absorbira dovolj svetlobe v razponu  $570 \pm 20$  nm pri VRM1 (glej Dodatek 3) ali če pri mešanju preskusne kemikalije z vodo nastane obarvana raztopina pri VRM2 (glej Dodatek 4), se domneva, da preskusna kemikalija vpliva na meritev standardne absorbance (OD) formazana MTT, zato je treba izvesti dodatne kontrole z barvilom ali pa uporabiti postopek spektrofotometrije HPLC/UPLC, pri čemer v tem primeru te kontrole niso potrebne (glej odstavka 41 in 42 ter dodatka III in IV) (34) (35). Pri meritvi standardne absorbance (OD) je treba vsako motečo preskusno kemikalijo nanesti na vsaj dva ponovljena vzorca viabilnega tkiva, na katerih se izvede celotni postopek preskušanja, vendar se inkubirajo z gojiščem namesto z raztopino MTT v fazi inkubacije MTT, da se dobi kontrola z nespecifično barvo v živih tkivih (NSC<sub>živo</sub>) (34) (35). Kontrolo z nespecifično barvo (NSC<sub>živo</sub>) je treba izvesti sočasno s preskušanjem obarvane preskusne kemikalije, v primeru večkratnega preskušanja pa je treba zaradi inherentne biološke variabilnosti živih tkiv za vsak izvedeni preskus (pri vsaki ponovitvi) izvesti neodvisno kontrolo z nespecifično barvo (NSC<sub>živo</sub>). Dejanska viabilnost tkiva se izračuna kot: delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi moteči preskusni kemikaliji in inkubiranimi z raztopino MTT (%Viabilnost<sub>preskus</sub>), od katerega se odšteje delež nespecifične barve, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi moteči preskusni kemikaliji in inkubiranimi z gojiščem brez MTT, kar se izvede sočasno s preskusom, ki se popravlja (%NSC<sub>živo</sub>), tj. dejanska viabilnost tkiva = [%Viabilnost<sub>preskus</sub>] – [%NSC<sub>živo</sub>].
38. Za opredelitev snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, je treba vsako preskusno kemikalijo dodati v sveže pripravljeno raztopino MTT. Ustrezna količina preskusne kemikalije se doda v raztopino MTT in zmes se približno tri ure inkubira pri standardnih pogojih gojenja (glej dodatka III in IV) (34) (35). Če se zmes MTT, ki vsebuje preskusno kemikalijo (ali suspenzija pri netopnih preskusnih kemikalijah), obarva modro/vijolično, se šteje, da preskusna kemikalija neposredno zmanjšuje

MTT, zato je treba izvesti dodatno funkcionalno preverjanje na neviabilnih konstrukcijah tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, in to neodvisno od uporabe meritve standardne absorbance (OD) ali postopka spektrofotometrije HPLC/UPLC. Pri tem dodatnem funkcionalnem preverjanju se uporabijo odmrla tkiva, ki imajo samo rezidualno presnovno aktivnost, vendar preskusno kemikalijo absorbirajo in zadržijo podobno kot viabilna tkiva. Odmrla tkiva za VRM1 se pripravijo z izpostavitvijo nizki temperaturi (,odmrla zaradi zamrznitve‘). Odmrla tkiva za VRM2 se pripravijo s podaljšano inkubacijo (npr. vsaj  $24 \pm 1$  uro) v vodi, ki ji sledi hramba pri nizki temperaturi (,odmrla v vodi‘). Vsaka preskusna kemikalija, ki zmanjšuje MTT, se nanese na vsaj dva ponovljena vzorca odmrlega tkiva, na katerih se opravi celoten postopek preskušanja za kontrolo z nespecifično redukcijo MTT (NSMTT) (34) (35). Za vsako preskusno kemikalijo zadostuje ena sama kontrola NSMTT, ne glede na število izvedenih samostojnih preskusov/ponovitev. Dejanska viabilnost tkiva se izračuna kot: delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi snovi, ki zmanjšuje MTT ( $\%Viabilnost_{preskus}$ ), od katerega se odšteje delež nespecifične redukcije MTT, dobljen z odmrli tkivi, izpostavljenimi isti snovi, ki zmanjšuje MTT, izračunan glede na negativno kontrolo, izvedeno sočasno s preskusom, ki se popravlja ( $\%NSMTT$ ), tj. dejanska viabilnost tkiva =  $[\%Viabilnost_{preskus}] - [\%NSMTT]$ .

39. Pri preskusnih kemikalijah, za katere je ugotovljeno, da povzročajo barvno interferenco (glej odstavek 37) in neposredno zmanjšujejo MTT (glej odstavek 38), je poleg kontrol NSMTT in  $NSC_{zivo}$ , opisanih v prejšnjih odstavkih, potreben tudi tretji niz kontrol pri izvajanju meritve standardne absorbance (OD). To po navadi velja za temno obarvane preskusne kemikalije, ki absorbirajo svetlobo v razponu  $570 \pm 30$  nm (npr. modre, vijoličaste, črne), ker njihova lastna barva ovira oceno njihove zmožnosti za neposredno redukcijo MTT, kot je opisana v odstavku 38. Zato je treba kot privzete uporabiti kontrole NSMTT skupaj s kontrolami  $NSC_{zivo}$ . Preskusne kemikalije, za katere se izvedejo tako kontrole NSMTT kot kontrole  $NSC_{zivo}$ , se lahko absorbirajo v živa in odmrla tkiva ter v njih zadržijo. Zato se v tem primeru s kontrolo NSMTT lahko ne le popravi potencialna neposredna redukcija MTT zaradi preskusne kemikalije, ampak tudi barvna interferenca, ki nastane zaradi absorpcije in zadržanja preskusne kemikalije v odmrlih tkivih. To bi lahko vodilo do dvojnega popravka barvne interference, saj se s kontrolo  $NSC_{zivo}$  že popravi barvna interferenca, ki jo povzročata absorpcija in zadržanje preskusne kemikalije v živih tkivih. Za preprečitev morebitnega dvojnega popravka barvne interference je treba izvesti še tretjo kontrolo za nespecifično barvo v odmrlih tkivih ( $NSC_{odmrlo}$ ) (glej dodatka III in IV) (34) (35). Pri tej dodatni kontroli se preskusna kemikalija nanese na vsaj dva ponovljena vzorca odmrlega tkiva, na katerih se izvede celoten postopek preskušanja, vendar se v fazi inkubacije MTT inkubirata z gojiščem namesto z raztopino MTT. Za vsako preskusno kemikalijo zadostuje ena sama kontrola  $NSC_{odmrlo}$  ne glede na število izvedenih

neodvisnih preskusov/ponovitev, vendar jo je treba izvesti sočasno s kontrolo NSMTT in z isto serijo tkiva. Dejanska viabilnost tkiva se izračuna kot: delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi preskusni kemikaliji (%Viabilnost<sub>preskus</sub>), od katerega se odštejeta %NSMTT in %NSC<sub>živo</sub>, prišteje pa se mu delež nespecifične barve, dobljen z odmrli tkivi, izpostavljenimi moteči preskusni kemikaliji in inkubiranimi z medijem brez MTT, izračunan glede na negativno kontrolo, izvedeno sočasno s preskusom, ki se popravlja (%NSC<sub>odmrlo</sub>), tj. dejanska viabilnost tkiva = [%Viabilnost<sub>preskus</sub>] - [%NSMTT] - [%NSC<sub>živo</sub>] + [%NSC<sub>odmrlo</sub>].

40. Pomembno je poudariti, da se lahko zaradi nespecifične redukcije MTT in nespecifičnih barvnih interferenc poveča optična gostota (pri izvajanju meritev standardne absorbance) izvlečka tkiva nad razponom linearnosti spektrofotometra ter da se lahko tudi zaradi nespecifične redukcije MTT poveča površina vrha formazana MTT (pri izvajanju meritev spektrofotometrije HPLC/UPLC) izvlečka tkiva nad razponom linearnosti spektrofotometra. Na tej podlagi je pomembno, da vsak laboratorij najprej določi razpon linearnosti optične gostote/površine vrha svojega spektrofotometra, npr. s formazanom MTT (št. CAS 57360-69-7), ki je na trgu na voljo npr. pri podjetju Sigma-Aldrich (kat. št. M2003), šele nato lahko začne preskušanje preskusnih kemikalij za regulativne namene.
41. Meritev standardne absorbance (OD) z uporabo spektrofotometra je ustrezna za oceno snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, in preskusnih kemikalij, ki povzročajo barvno interferenco, ko zaznana interferenca z meritvijo formazana MTT ni premočna (tj. optične gostote izvlečkov tkiv, dobljene s preskusno kemikalijo brez kakršnega koli popravka za neposredno redukcijo MTT in/ali barvno interferenco, so znotraj linearnega razpona spektrofotometra). Vendar je treba rezultate za preskusne kemikalije, ki povzročajo %NSMTT in/ali %NSC<sub>živo</sub> ≥ 60 % (VRM1 in VRM2 za protokole za tekoče snovi) ali 50 % negativne kontrole (VRM2 za protokole za trdne snovi), obravnavati previdno, saj je to določena mejna vrednost, ki se uporablja pri VRM za razlikovanje med razvrščenimi in nerazvrščenimi kemikalijami (glej odstavek 44). Vendar standardne absorbance (OD) ni mogoče meriti, kadar je interferenca z meritvijo formazana MTT premočna (tj. povzroča nepopravljene OD izvlečkov preskusnih tkiv, ki presegajo linearni razpon spektrofotometra). Obarvane preskusne kemikalije ali preskusne kemikalije, ki se obarvajo ob stiku z vodo ali izopropanolom, ki premočno vplivajo na meritev standardne absorbance (OD) formazana MTT, se še vedno lahko ocenijo z uporabo spektrofotometrije HPLC/UPLC (glej dodatka III in IV). Sistem HPLC/UPLC namreč omogoča, da se formazan MTT pred kvantifikacijo loči od kemikalije (36). Iz tega razloga kontrole NSC<sub>živo</sub> ali NSC<sub>odmrlo</sub> pri uporabi spektrofotometrije HPLC/UPLC niso nikoli potrebne, in to ne glede na to, katera kemikalija se preskuša. Kljub temu je treba

kontrola NSMTT uporabiti v primeru suma, da preskusna kemikalija neposredno zmanjšuje MTT (z uporabo postopka, opisanega v odstavku 38). Kontrole NSMTT je treba uporabiti tudi pri preskusnih kemikalijah, katerih barva (njihova lastna ali tista, ki se pojavi, ko je preskusna kemikalija v vodi) ovira oceno njihove sposobnosti za neposredno redukcijo MTT, kot je opisano v odstavku 38. Kadar se za merjenje formazana MTT uporabi spektrofotometrija HPLC/UPLC, se delež viabilnosti tkiva izračuna kot razmerje med površino vrha formazana MTT, dobljeno z živimi tkivi, izpostavljenimi preskusni kemikaliji, in površino vrha formazana MTT, dobljeno s sočasno negativno kontrolo. Za preskusne kemikalije, ki lahko neposredno zmanjšajo MTT, se dejanska viabilnost tkiva izračuna kot:  $\%Viabilnost_{preskus} \text{ minus } \%NSMTT$ , kot je opisano v zadnjem stavku odstavka 38. Nazadnje je treba opozoriti, da snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, ali snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT in lahko povzročijo tudi barvno interferenco, ki po tretiranju ostanejo v tkivih in zmanjšujejo MTT tako močno, da povzročijo optično gostoto (z uporabo standardne meritve optične gostote) ali površino vrha (z uporabo spektrofotometrije UPLC/HPLC) preskušanih izvlečkov tkiv, ki presega linearni razpon spektrofotometra, ni mogoče oceniti s preskusnimi metodami rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, čeprav naj bi se to zgodilo samo v zelo redkih primerih.

42. Spektrofotometrija HPLC/UPLC se lahko za merjenje formazana MTT uporabi z vsemi vrstami preskusnih kemikalij (obarvanimi, neobarvanimi, kemikalijami, ki zmanjšujejo MTT, in tistimi, ki ne zmanjšujejo MTT) (11) (36). Zaradi raznovrstnosti sistemov spektrofotometrije HPLC/UPLC ni mogoče, da bi vsak uporabnik določil popolnoma enake systemske pogoje. Tako je treba ustreznost sistema spektrofotometrije HPLC/UPLC dokazati pred njegovo uporabo za kvantifikacijo formazana MTT iz izvlečkov tkiv, tako da izpolnjuje merila za sprejemljivost za niz standardnih parametrov ustreznosti na podlagi tistih, ki so opisani v smernicah ameriške uprave za hrano in zdravila za industrijo v zvezi z bioanalitično metodo validacije (36) (38). Ti ključni parametri in njihova merila za sprejemljivost so prikazani v Dodatku 5. Ko so izpolnjena merila za sprejemljivost, opredeljena v Dodatku 5, se sistem spektrofotometrije HPLC/UPLC šteje za ustrezen in pripravljen za merjenje formazana MTT v poskusnih pogojih, opisanih v tej preskusni metodi.

### **Merila za sprejemljivost**

43. Za vsako ponovitev, pri kateri se uporabljajo serije konstrukcij tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, ki ustrezajo kontroli kakovosti (glej odstavek 30), morajo tkiva, tretirana z negativno kontrolno snovjo, izražati optično gostoto, iz katere je razvidna kakovost tkiv po zaključku prevoza in sprejema ter vseh postopkov protokola, ter ki ne sme biti zunaj mej, določenih s preteklimi preskusi in opisanih v preglednici 2 (glej odstavek 26). Podobno morajo tkiva, tretirana s pozitivno kontrolno snovjo, tj. metilacetatom, imeti srednjo

viabilnost < 50 % glede na negativno kontrolo pri VRM1 s protokolom za tekoče snovi ali protokolom za trdne snovi ter  $\leq 30$  % (protokol za tekoče snovi) ali  $\leq 20$  % (protokol za trdne snovi) glede na negativno kontrolo pri VRM2, s čimer kažejo sposobnost tkiv, da se odzovejo na dražilno preskusno kemikalijo v pogojih preskusne metode (34) (35). Variabilnost med ponovljenimi vzorci tkiv s preskusnimi kemikalijami in kontrolnimi snovmi mora biti znotraj sprejemljivih mej (tj. razlika v viabilnosti med dvema ponovljenima vzorcema tkiva mora biti manjša od 20 % oziroma standardni odklon med tremi ponovljenimi vzorci tkiv ne sme presegati 18 %). Če je negativna ali pozitivna kontrola, vključena v ponovitev, zunaj sprejemljivih razponov, se ponovitev šteje za ‚neveljavno‘ in jo je treba ponoviti. Če je variabilnost med ponovljenimi vzorci tkiv s preskusno kemikalijo zunaj sprejemljivega razpona, je treba preskus šteti za ‚neveljaven‘, preskusno kemikalijo pa je treba znova preskusiti.

### Razlaga rezultatov in napovedni model

44. Vrednosti optične gostote/površine vrha, dobljene s ponovljenimi vzorci izvlečkov tkiv za vsako preskusno kemikalijo, je treba uporabiti za izračun povprečnega deleža viabilnosti tkiv (srednja vrednost med ponovljenimi vzorci tkiv), normaliziranega na negativno kontrolo, katere viabilnost znaša 100 %. Mejna vrednost deleža viabilnosti tkiv za opredelitev preskusnih kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči (brez kategorije po GHS ZN in uredbi CLP), je navedena v preglednici 4. Rezultate je torej treba razlagati, kot je navedeno v nadaljevanju.

- Za preskusno kemikalijo se šteje, da je ni treba razvrstiti in označiti v skladu z GHS ZN in uredbo CLP (brez kategorije), če je povprečni delež viabilnosti tkiv po izpostavljenosti in inkubaciji po izpostavljenosti večji od (>) določene mejne vrednosti deleža viabilnosti tkiv, kot je prikazano v preglednici 4. V tem primeru ni potrebno nadaljnje preskušanje z drugimi preskusnimi metodami.
- Če povprečni delež viabilnosti tkiv po izpostavljenosti in inkubaciji po izpostavljenosti znaša manj ali enako ( $\leq$ ) kot določena mejna vrednost deleža viabilnosti tkiv, napoved ni mogoča, kot je prikazano v preglednici 4. V tem primeru je potrebno dodatno preskušanje z drugimi preskusnimi metodami, ker preskusne metode rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, kažejo določeno število lažno pozitivnih rezultatov (glej odstavka 14 in 15) in ne omogočajo razlikovanja med kategorijama 1 in 2 po GHS ZN in uredbi CLP (glej odstavek 17).

**Preglednica 4:** Napovedni modeli glede na razvrstitev po GHS ZN in uredbi CLP

VRM	Brez kategorije	Napoved ni mogoča
-----	-----------------	-------------------

VRM 1 – EpiOcular™ EIT (za oba protokola)	srednja viabilnost tkiv > 60 %	srednja viabilnost tkiv ≤ 60 %
VRM 2 – SkinEthic™ HCE EIT (za protokol za tekoče snovi)	srednja viabilnost tkiv > 60 %	srednja viabilnost tkiv ≤ 60 %
VRM2 – SkinEthic™ HCE EIT (za protokol za trdne snovi)	srednja viabilnost tkiv > 50 %	srednja viabilnost tkiv ≤ 50 %

45. Kadar je rezultat nedvoumen, bi moral za preskusno kemikalijo zadoščati en sam preskus, sestavljen iz vsaj dveh ponovljenih vzorcev tkiv. V primeru mejnih rezultatov, kot so neskladne ponovne meritve in/ali povprečni delež viabilnosti tkiv, enak  $60 \pm 5 \%$  (VRM1 in VRM2 za protokol za tekoče snovi) ali  $50 \pm 5 \%$  (VRM2 za protokol za trdne snovi), pa je morda treba izvesti še drug preskus in nato še tretjega, če rezultati prvih dveh preskusov niso skladni.
46. Za posamezne vrste zmesi se lahko uporabijo različne mejne vrednosti deleža viabilnosti, tako da se razlikuje med razvrščenimi in nerazvrščenimi preskusnimi kemikalijami, če je to ustrezno in utemeljeno, da se poveča splošna učinkovitost preskusne metode za zadevne vrste zmesi (glej odstavek 14). Primerjalne kemikalije so lahko primerne za ocenjevanje potenciala za hude poškodbe oči/draženje oči, ki ga imajo neznane preskusne kemikalije ali proizvodni razred, ali za ocenjevanje relativnega potenciala toksičnosti razvrščene kemikalije za oči v določenem razponu pozitivnih odzivov.

## PODATKI IN POROČANJE

### Podatki

47. Podatke o posameznih ponovljenih vzorcih tkiv v ponovitvi (npr. vrednosti optične gostote/površine vrha formazana MTT in podatke o izračunanem deležu viabilnosti tkiv za preskusno kemikalijo in kontrole ter končno napoved s preskusno metodo rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju) je treba v preglednici navesti za vsako preskusno kemikalijo, po potrebi vključno s podatki iz ponovljenih preskusov. Poleg tega je treba za vsako posamezno preskusno kemikalijo in kontrolo navesti povprečni delež viabilnosti tkiv in razliko v viabilnosti med dvema ponovljenima vzorcema tkiv (če je  $n = 2$  ponovljena vzorca tkiv) ali standardni odklon (če je  $n \geq 3$  ponovljeni vzorci tkiv). Morebitne opažene interferenice preskusne kemikalije pri meritvi formazana MTT z neposrednim zmanjšanjem MTT in/ali barvno interferenco je treba navesti za vsako preskušeno kemikalijo.

### Poročilo o preskusu

48. V poročilu o preskusu je treba navesti informacije, kot so predstavljene v nadaljevanju.

### *Preskusna kemikalija*

#### Snov iz ene sestavine

- Kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, registrska številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;
- agregatno stanje, hlapnost, vrednost pH, LogP, molekulska masa, kemijski razred in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti, pomembne za izvedbo študije, če so na voljo;
- čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo.

#### Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi

- Čim obsežnejša opredelitev lastnosti, na primer s kemijsko identiteto (glej zgoraj), čistostjo, kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi (glej zgoraj) sestavin, če so na voljo;
- agregatno stanje in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti, pomembne za izvedbo študije, če so na voljo;
- čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo.

### *Pozitivne in negativne kontrolne snovi*

- Kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, registrska številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;
- agregatno stanje, hlapnost, molekulska masa, kemijski razred in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti, pomembne za izvedbo študije, če so na voljo;
- čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;
- utemeljitev uporabe druge negativne kontrole in ne ultra čiste H<sub>2</sub>O ali DPBS brez Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>, če je ustrezno;
- utemeljitev uporabe druge pozitivne kontrole in ne metilacetata, če je ustrezno;

- sklicevanje na rezultate pozitivnih in negativnih kontrol iz preteklih preskusov, ki kažejo ustrezna merila za sprejemljivost ponovitev.

*Podatki o naročniku in preskuševalnem laboratoriju*

- Ime in naslov naročnika, preskuševalnega laboratorija in vodje študije.

*Uporabljena konstrukcija tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, in protokol (z navedbo utemeljitve izbire, če je ustrezno)*

*Pogoji preskusne metode*

- Uporabljena konstrukcija tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, vključno s številko serije;
- valovna dolžina in filtrirana valovna dolžina (če je ustrezno), ki se uporabljata za kvantifikacijo formazana MTT, ter linearni razpon merilne naprave (npr. spektrofotometra);
- opis metode, uporabljene za kvantifikacijo formazana MTT;
- opis uporabljenega sistema spektrofotometrije HPLC/UPLC, če je ustrezno;
- popolne informacije v podporo specifični uporabljeni konstrukciji tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, vključno z njeno učinkovitostjo. To mora med drugim vključevati:
  - i) kontrolo kakovosti viabilnosti (dobavitelj);
  - ii) viabilnost v pogojih preskusne metode (uporabnik);
  - iii) kontrolo kakovosti pregradne funkcije;
  - iv) morfologijo, če je na voljo;
  - v) obnovljivost in napovedljivost;
  - vi) druge kontrole kakovosti konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, če so na voljo;
- navedbe podatkov o konstrukciji tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, pridobljenih s preteklimi preskusi. To mora med drugim vključevati: sprejemljivost podatkov o kontroli kakovosti s sklicevanjem na podatke o seriji, pridobljene v preteklosti;
- izjava, da je preskusni laboratorij s preskušanjem kemikalij za preverjanje usposobljenosti dokazal usposobljenost za uporabo preskusne metode pred redno uporabo.

*Merila za sprejemljivost ponovitve in preskusa*

- Srednje vrednosti pozitivne in negativne kontrole ter razponi sprejemljivosti na podlagi podatkov iz preteklih preskusov;

- sprejemljiva variabilnost med ponovljenimi vzorci tkiv za pozitivne in negativne kontrole;
- sprejemljiva variabilnost med ponovljenimi vzorci tkiv za preskusno kemikalijo.

#### *Preskusni postopek*

- Podrobni podatki o uporabljenem preskusnem postopku;
- uporabljeni odmerki preskusne kemikalije in kontrolnih snovi;
- trajanje in temperatura izpostavljenosti, potopitve po izpostavljenosti in obdobji inkubacije po izpostavljenosti (če je ustrezno);
- opis morebitnih prilagoditev preskusnega postopka;
- navedba kontrol, uporabljenih za snovi, ki neposredno zmanjšajo MTT, in/ali barvilnih preskusnih kemikalij, če je ustrezno;
- število ponovljenih vzorcev tkiv, uporabljenih za vsako preskusno kemikalijo in kontrole (pozitivna kontrola, negativna kontrola, NSMTT, NSC<sub>živo</sub> in NSC<sub>odmrlo</sub>, če je ustrezno).

#### *Rezultati*

- Preglednice s podatki o posameznih preskusnih kemikalijah in kontrolnih snoveh za vsako ponovitev (vključno s ponovljenimi poskusi, če je ustrezno) in vsako ponovljeno meritev, vključno z vrednostjo optične gostote in površino vrha formazana MTT, deležem viabilnosti tkiv, povprečnim deležem viabilnosti tkiv, razliko med ponovljenimi vzorci tkiv ali standardnimi odkloni, in končna napoved;
- če je ustrezno, rezultati kontrol, uporabljenih za snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, in/ali obarvane preskusne kemikalije, vključno z vrednostjo optične gostote ali površino vrha formazana MTT, %NSMTT, %NSC<sub>živo</sub>, %NSC<sub>odmrlo</sub>, razliko med ponovljenimi vzorci tkiv ali standardnim odklonom, končnim pravilnim deležem viabilnosti tkiv, in končna napoved;
- rezultati, dobljeni s preskusnimi kemikalijami in kontrolnimi snovmi glede na opredeljena merila za sprejemljivost ponovitve in preskusa;
- opis drugih opaženih učinkov, npr. obarvanja tkiv z obarvano preskusno kemikalijo.

#### *Razprava o rezultatih*

##### *Sklepna ugotovitev*

## VIRI

- (1) ZN (2015). Globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, šesta revidirana izdaja, New York in Ženeva: Združeni narodi. Na voljo na: [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) Poglavje B.5 te priloge: Akutno draženje oči/jedkost za oči.
- (3) Poglavje B.47 te priloge: Preskusna metoda za določanje motnjave in prepustnosti roženice goveda za opredelitev (i) kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči, in (ii) kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči.
- (4) Poglavje B.48 te priloge: Preskusna metoda na izoliranih očeh piščancev za opredelitev (i) kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči, in (ii) kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti.
- (5) Poglavje B.61 te priloge: Preskusna metoda uhajanja fluoresceina za opredeljevanje jedkih in zelo dražilnih snovi za oči.
- (6) Poglavje B.68 te priloge: *In vitro* preskusna metoda kratkotrajne izpostavljenosti za opredelitev (i) kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči, in (ii) kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči.
- (7) Freeman, S. J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010, 261–266.
- (8) EC EURL ECVAM (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Na voljo na: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280>.
- (9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. Mnenje ESAC št. 2014-03 z dne 17. novembra 2014; EUR 28173 EN; doi: 10.2787/043697. Na voljo na: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702>.

- (10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M. H., Lelièvre, D., Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C. S., Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43–53.
- (11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M. H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C. J., Toner, F., Roper, C. S., Van Rompay, A. R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55–70.
- (12) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). Mnenje ESAC št. 2016-02 z dne 24. junija 2016; EUR 28175 EN; doi: 10.2787/390390. Na voljo na: <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. (Rokopis v pripravi).
- (14) Draize, J. H., Woodard, G., Calvery, H. O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. *Journal of Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377–390.
- (15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1–9.
- (16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- (17) OECD (2016). Series on Testing and Assessment (št. 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. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

- (18) OECD (2005). Series on Testing and Assessment (št. 34): Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., in Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339–364.
- (20) Nguyen, D. H., Beuerman, R. W., De Wever, B., in Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. V: Salem, H., Katz, S. A. (ur.). *Alternative Toxicological Methods*, CRC Press, str. 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., in Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619–626.
- (22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., in McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1476–1488.
- (23) Kolle, S. N., Moreno, M. C. R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., in Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1–18.
- (24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., in Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701–723.

- (25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K. R., Millet, M., Templier, M., in McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521–547.
- (26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., in Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113–126.
- (27) Hackett, R. B., in McDonald, T. O. (1991). Eye Irritation. V: *Advances in Modern Toxicology: Dermatotoxicology*, Marzulli, F. N., in Maibach, H. I. (ur.). 4. izdaja, str. 749–815. Washington, DC, ZDA: Hemisphere Publishing Corporation.
- (28) Fox, D. A., in Boyes, W. K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. V: *Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, Klaassen, C. D. (ur.). 7. izdaja, str. 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., in Maurer, J. K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922–936.
- (30) Maurer, J. K., Parker, R. D., in Jester, J. V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106–117.
- (31) Jester, J. V., Li, L., Molai, A., in Maurer, J. K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115–130.
- (32) Jester, J. V., Petroll, W. M., Bean, J., Parker, R. D., Carr, G. J., Cavanagh, H. D., in Maurer, J. K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2610–2625.
- (33) Jester, J. V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41–54.
- (34) EpiOcular™ EIT SOP, različica 8 (5. marec 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Na voljo na:

[<https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>].

- (35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, različica 1. (20. julij 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Na voljo na: <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., in McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741–761.
- (37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., in Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101–127.
- (38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Maj 2001. Na voljo na: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>.
- (39) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment (št. 263). ENV Publications, Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

## Dodatek 1

### OPREDELITVE POJMOV

**Točnost:** stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov ‚ustreznosti‘. Ta izraz in izraz ‚skladnost‘ se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusne metode (18).

**Primerjalna kemikalija:** kemikalija, ki se uporablja kot standard za primerjavo s preskusno kemikalijo. Primerjalna kemikalija mora imeti naslednje značilnosti: (i) ima trajen in zanesljiv vir za njeno opredelitev in določitev lastnosti; (ii) je strukturno, funkcijsko in/ali kemijsko podobna kemikalijam, ki se preskušajo, ali spada v podoben kemijski razred; (iii) ima znane fizikalno-kemijske lastnosti; (iv) ima spremne podatke o znanih učinkih in (v) ima znano jakost v razponu želenega odziva.

**Pristop od spodaj navzgor:** stopenjski pristop, ki se uporablja za preskusno kemikalijo, za katero se domneva, da ne potrebuje razvrstitve in označevanja glede na draženje oči ali hude poškodbe oči, pri čemer se najprej določijo kemikalije, ki ne potrebujejo razvrstitve ali označevanja (negativni rezultat), nato pa druge kemikalije (pozitivni rezultat).

**Kemikalija:** snov ali zmes.

**Skladnost:** glej ‚točnost‘.

**Roženica:** prozoren sprednji del zrkla, ki pokriva šarenico in zenico ter skozi katerega vstopa svetloba.

**KV:** koeficient variacije.

**Dev:** odklon.

**EIT:** preskus draženja oči.

**EURL ECVAM:** European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (referenčni laboratorij Evropske unije za alternative testiranju na živalih).

**Draženje oči:** je povzročitev sprememb v očesu po nanosu preskusne kemikalije na sprednjo površino očesa, ki so v celoti povračljive v 21 dneh po nanosu. Ta pojem je sopomenka za ‚povračljive učinke na oči‘ in ‚kategorijo 2 po GHS ZN/uredbi CLP‘.

**ET<sub>50</sub>:** čas izpostavljenosti, ki je potreben za zmanjšanje viabilnosti tkiv za 50 % po nanosu določene stalne koncentracije primerjalne kemikalije.

**Delež lažno negativnih rezultatov:** delež vseh pozitivnih snovi, ki jih preskusna metoda zmotno prikaže kot negativne. To je eden od kazalnikov učinkovitosti preskusne metode.

**Delež lažno pozitivnih rezultatov:** delež vseh negativnih snovi, ki jih preskusna metoda

zmotno prikaže kot pozitivne. To je eden od kazalnikov učinkovitosti preskusne metode.

**Nevarnost:** neločljiva lastnost sredstva ali stanje, ki lahko ob izpostavljenosti temu sredstvu povzroči neželen učinek na organizem, sistem ali (pod)populacijo.

**HCE:** SkinEthic™ Human Corneal Epithelium.

**HPLC:** tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (High Performance Liquid Chromatography).

**IC<sub>50</sub>:** koncentracija, pri kateri primerjalna kemikalija po določenem času izpostavljenosti (npr. 30-minutnem tretiranju s SDS) zmanjša viabilnost tkiv za 50 %.

**Prevelik odmerek:** količina preskusne kemikalije, nanesene na konstrukcijo tkiva rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, ki je večja od količine, potrebne za celotno in enakomerno prekritje površine epitelijskega tkiva.

**Nepovračljivi učinki na oči:** glej ‚Huda poškodba oči‘.

**LLOQ:** spodnja meja določljivosti.

**LogP:** logaritem porazdelitvenega koeficienta n-oktanol/voda.

**Zmes:** zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi.

**Snov iz ene sestavine:** snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je vsaj 80 mas. % glavne sestavine.

**Snov z več sestavinami:** snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je več glavnih sestavin s koncentracijo  $\geq 10$  mas. % in  $< 80$  mas. %. Snov z več sestavinami je rezultat proizvodnega postopka. Razlika med zmesjo in snovjo z več sestavinami je v tem, da je zmes pridobljena z mešanjem dveh ali več snovi brez kemične reakcije. Snov z več sestavinami je rezultat kemične reakcije.

**MTT:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid; tiazolil modro tetrazol bromid.

**Negativna kontrola:** vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s snovjo, za katero je znano, da ne povzroči pozitivnega odziva v preskusnem sistemu. Ta vzorec se obdela z vzorci, tretiranimi s preskusno kemikalijo, in drugimi kontrolnimi vzorci ter uporabi za določitev 100-odstotne viabilnosti tkiv.

**Brez razvrstitve:** kemikalije, ki niso razvrščene glede na draženje oči (kategorija 2 po GHS ZN/uredbi CLP, kategorija 2A ali 2B po GHS ZN) ali hude poškodbe oči (kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP). Ta pojem je sopomenka za ‚brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP‘.

**NSC<sub>odmrlo</sub>:** nespecifična barva v odmrlih tkivih.

**NSC<sub>živo</sub>:** nespecifična barva v živih tkivih.

**NSMTT:** nespecifična redukcija MTT.

**OD:** optična gostota.

**Standardi izvajanja:** standardi, ki temeljijo na validirani preskusni metodi, ki se je štela za znanstveno veljavno, in so podlaga za oceno primerljivosti predlagane preskusne metode, ki je funkcijsko in mehanistično podobna. Vključujejo: (i) nujne elemente preskusne metode; (ii) najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij, izbranih iz skupine kemikalij, ki se uporabljajo za dokazovanje sprejemljive učinkovitosti validirane preskusne metode, ter (iii) primerljive stopnje točnosti in zanesljivosti, ki temeljijo na rezultatih validirane preskusne metode, ki jih mora dokazati predlagana preskusna metoda pri ocenjevanju ob uporabi najkrajšega možnega seznama referenčnih kemikalij (18).

**Pozitivna kontrola:** vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s snovjo, za katero je znano, da povzroči pozitiven odziv v preskusnem sistemu. Ta vzorec se obdela z vzorci, tretiranimi s preskusno kemikalijo, in drugimi kontrolnimi vzorci. Za zagotovitev, da se lahko variabilnost odziva pozitivne kontrole oceni v daljšem časovnem obdobju, pa stopnja pozitivnega odziva ne sme biti prevelika.

**Ustreznost:** opis razmerja med preskusom in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere se s preskusom pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Pri ustreznosti se upošteva tudi točnost (skladnost) preskusne metode (18).

**Zanesljivost:** stopnja obnovljivosti preskusne metode v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih in interne laboratorijske ponovljivosti (18).

**Nadomestni preskus:** preskus, ki nadomesti preskus, ki se redno uporablja in je uveljavljen za ugotavljanje nevarnosti in/ali oceno tveganja, ter za katerega je bilo ugotovljeno, da v primerjavi z uveljavljenim preskusom v vseh mogočih okoliščinah preskušanja in za vse mogoče preskusne kemikalije zagotavlja enakovredno ali izboljšano varstvo zdravja ljudi ali živali ali okolja, kot je ustrezno (18).

**Obnovljivost:** ujemanje rezultatov, pridobljenih s ponavljajočim se preskušanjem iste kemikalije in uporabo istega preskusnega protokola (glej ‚Zanesljivost‘) (18).

**Povračljivi učinki na oči:** glej ‚Draženje oči‘.

**RhCE:** rekonstruiran epitelij, podoben človeškemu roženičnemu epiteliju.

**Ponovitev:** ponovitev zajema eno ali več preskusnih kemikalij, preskušanih sočasno z negativno kontrolo in pozitivno kontrolo.

**SO:** standardni odklon.

**Občutljivost:** delež vseh pozitivnih/aktivnih preskusnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (18).

**Huda poškodba oči:** povzročitev poškodbe očesnega tkiva ali resne fizične okvare vida po nanosu preskusne snovi na sprednjo površino očesa, ki ni v celoti popravljena v 21 dneh po nanosu. Ta pojem je sopomenka za ‚nepovračljive učinke na oči‘ in ‚kategorijo 1 po GHS ZN/uredbi LP‘.

**Standardni delovni postopki:** formalni pisni postopki, ki podrobno opisujejo, kako je treba izvesti posamezne rutinske in s preskusom povezane laboratorijske postopke. Zahtevajo se z dobro laboratorijsko prakso.

**Specifičnost:** delež vseh negativnih/neaktivnih preskusnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (18).

**Snov:** kemijski element in njegove spojine v naravnem stanju ali pridobljene s kakršnim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev njene obstojnosti, in vsemi nečistotami, ki nastanejo pri uporabljenem postopku, ne vključuje pa topil, ki se lahko izločijo, ne da bi to vplivalo na obstojnost snovi ali spremenilo njeno sestavo.

**Preskus:** sočasno preskušanje iste preskusne kemikalije na vsaj dveh ponovljenih vzorcih tkiv, kot je opredeljeno v zadevnem standardnem delovnem postopku.

**Viabilnost tkiva:** parameter za merjenje celotne dejavnosti celične populacije v rekonstruiranem tkivu kot njihove zmožnosti za redukcijo vitalnega barvila MTT, ki se glede na izmerjeno končno točko in uporabljeni načrt preskusa ujema s skupnim številom in/ali vitalnostjo živih celic.

**Pristop od zgoraj navzdol:** stopenjski pristop, ki se uporablja za kemikalijo, za katero se domneva, da povzroča hude poškodbe oči, pri čemer se najprej določijo kemikalije, ki jih je treba razvrstiti (pozitivni rezultat), nato pa še druge kemikalije (negativni rezultat).

**Preskusna kemikalija:** vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

**Večstopenjska strategija preskušanja:** stopenjska strategija preskušanja, pri kateri se preskusne metode uporabijo zaporedoma. Na vsaki stopnji se pregledajo vsi obstoječi podatki o preskusni kemikaliji, pri čemer se uporabi postopek, ki temelji na zanesljivosti dokazov, da se določi, ali je pred nadaljevanjem na naslednji stopnji na voljo dovolj podatkov za odločitev o razvrstitvi kemikalije glede na nevarnost, ki jo povzroča. Če se za preskusno kemikalijo na podlagi razpoložljivih podatkov lahko določi potencial nevarnosti/jakost, dodatno preskušanje ni potrebno (18).

**ULOQ:** zgornja meja določljivosti.

**Globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij**

**(GHS ZN):** sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudi (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (1).

**Kategorija 1 po GHS ZN in uredbi CLP:** glej ‚Huda poškodba oči‘.

**Kategorija 2 po GHS ZN in uredbi CLP:** glej ‚Draženje oči‘.

**Brez kategorije po GHS ZN in uredbi CLP:** kemikalije, ki ne izpolnjujejo zahtev za razvrstitev v kategorijo 1 ali 2 po GHS ZN/uredbi CLP (ali kategorijo 2A ali 2B po GHS ZN). Ta pojem je sopomenka za ‚brez razvrstitve‘.

**UPLC:** tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti (Ultra-High Performance Liquid Chromatography).

**UVCB:** snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski proizvodi ali biološki materiali.

**Veljavna preskusna metoda:** preskusna metoda, ki se obravnava kot dovolj ustrezna in zanesljiva za določeni namen ter temelji na znanstveno utemeljenih načelih. Preskusna metoda ni nikoli veljavna v absolutnem smislu, ampak samo v zvezi z opredeljenim namenom (18).

**Validirana preskusna metoda:** preskusna metoda, za katero sta bili na podlagi izvedenih validacijskih študij določeni ustreznost (vključno s točnostjo) in zanesljivost za določen namen. Opozoriti je treba, da točnost in zanesljivost validirane preskusne metode nista nujno zadostni, da bi bila sprejemljiva za predlagani namen (18).

**VRM** validirana referenčna metoda.

**VRM1:** Kot validirana referenčna metoda 1 je naveden EpiOcular™ EIT.

**VRM2:** Kot validirana referenčna metoda 2 je naveden SkinEthic™ HCE EIT.

**Zanesljivost dokazov:** postopek obravnavanja prednosti in slabosti različnih informacij v okviru sprejemanja in utemeljevanja sklepne ugotovitve glede potenciala nevarnosti preskusne snovi.

## Dodatek 2

**GLAVNI ELEMENTI PRESKUSOV REKONSTRUIRANEGA EPITELIJA, PODOBNEGA ČLOVEŠKEMU ROŽENIČNEMU EPITELIJU (RHCE), VALIDIRANIH ZA OPREDELITEV KEMIKALIJ, KI JIH NI TREBA RAZVRSTITI IN OZNAČITI V ZVEZI Z DRAŽENJEM OČI ALI HUDIMI POŠKODBAMI OČI**

Elementi preskusa	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
	Tekoče snovi (ki jih je mogoče odmeriti s pipeto pri $37 \pm 1$ °C ali nižjih temperaturah za 15 min)	Trdne snovi (ki jih ni mogoče odmeriti s pipeto)	Tekoče in viskozne snovi (ki jih je mogoče odmeriti s pipeto)	Trdne snovi (ki jih ni mogoče odmeriti s pipeto)
<b>Protokoli</b>				
<b>Površina modela</b>	0,6 cm <sup>2</sup>	0,6 cm <sup>2</sup>	0,5 cm <sup>2</sup>	0,5 cm <sup>2</sup>
<b>Število ponovljenih vzorcev tkiv</b>	vsaj 2	vsaj 2	vsaj 2	vsaj 2

Elementi preskusa	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
<b>Predhodno preverjanje barvne interference</b>	<p>50 µl + 1 ml H<sub>2</sub>O za 60 min pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO<sub>2</sub>, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost (neobarvane preskusne kemikalije) ali</p> <p>50 µl + 2 ml izopropanola, ki se 2–3 ure meša pri sobni temperaturi (obarvane preskusne kemikalije)</p> <p>→ če je optična gostota preskusne kemikalije pri 570 ± 20 nm, potem ko se odšteje optična gostota izopropanola ali vode, &gt; 0,08 (kar ustreza približno 5 % srednje optične gostote negativne kontrole), je treba izvesti žive prilagojene kontrole.</p>	<p>50 mg + 1 ml H<sub>2</sub>O za 60 min pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO<sub>2</sub>, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost (neobarvane preskusne kemikalije) in/ali</p> <p>50 mg + 2 ml izopropanola, ki se 2–3 meša ure pri sobni temperaturi (obarvane in neobarvane preskusne kemikalije)</p> <p>→ če je optična gostota preskusne kemikalije pri 570 ± 20 nm, potem ko se odšteje optična gostota izopropanola ali vode, &gt; 0,08 (kar ustreza približno 5 % srednje optične gostote negativne kontrole), je treba izvesti žive prilagojene kontrole.</p>	<p>10 µl + 90 µl H<sub>2</sub>O se mešata 30 ± 2 min pri sobni temperaturi (18–28 °C)</p> <p>→ če je preskusna kemikalija obarvana, je treba izvesti žive prilagojene kontrole.</p>	<p>10 mg + 90 µl H<sub>2</sub>O se mešata 30 ± 2 min pri sobni temperaturi</p> <p>→ če je preskusna kemikalija obarvana, je treba izvesti žive prilagojene kontrole.</p>
<b>Predhodno preverjanje neposredne redukcije MTT</b>	<p>50 µl + 1 ml raztopine MTT s koncentracijo 1 mg/ml za 180 ± 15 min pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO<sub>2</sub>, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost</p> <p>→ če se raztopina obarva modro/vijolično, je treba izvesti prilagojene kontrole s tkivi, odmrli zaradi zamrznitve (za negativno kontrolo se uporabi 50 µl sterilne deionizirane vode v raztopini MTT).</p>	<p>50 mg + 1 ml raztopine MTT s koncentracijo 1 mg/ml za 180 ± 15 min pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO<sub>2</sub>, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost</p> <p>→ če se raztopina obarva modro/vijolično, je treba izvesti prilagojene kontrole s tkivi, odmrli zaradi zamrznitve (za negativno kontrolo se uporabi 50 µl sterilne deionizirane vode v raztopini MTT).</p>	<p>30 µl + 300 µl raztopine MTT s koncentracijo 1 mg/ml za 180 ± 15 min pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO<sub>2</sub>, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost</p> <p>→ če se raztopina obarva modro/vijolično, je treba izvesti prilagojene kontrole s tkivi, odmrli v vodi (za negativno kontrolo se uporabi 30 µl sterilne deionizirane vode v raztopini MTT).</p>	<p>30 mg + 300 µl raztopine MTT s koncentracijo 1 mg/ml za 180 ± 15 min pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO<sub>2</sub>, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost</p> <p>→ če se raztopina obarva modro/vijolično, je treba izvesti prilagojene kontrole s tkivi, odmrli v vodi (za negativno kontrolo se uporabi 30 µl sterilne deionizirane vode v raztopini MTT).</p>

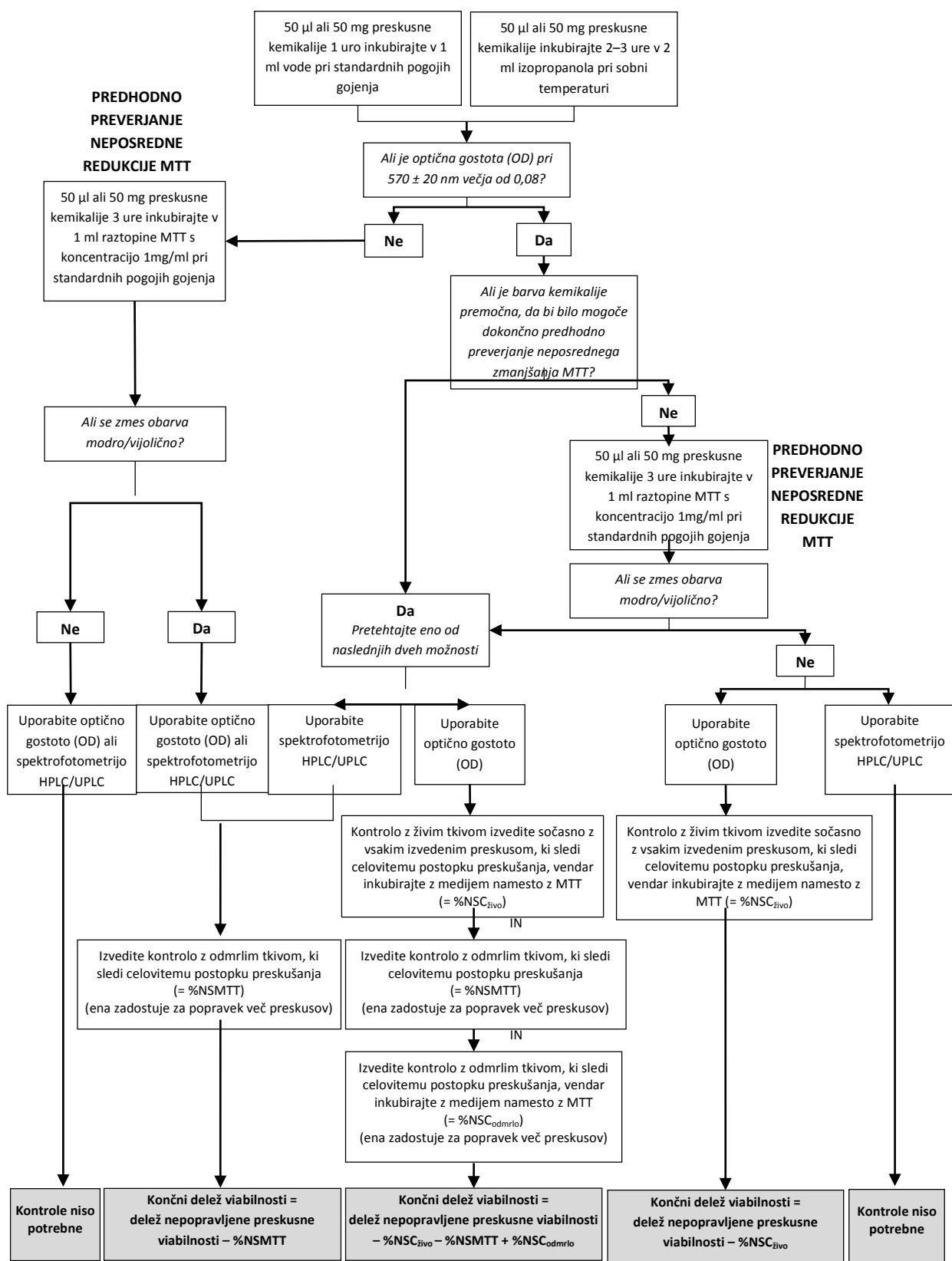
Elementi preskusa	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
<b>Predhodno tretiranje</b>	20 µl DPBS brez Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> za 30 ± 2 min pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO <sub>2</sub> , ≥ 95-odstotna relativna vlažnost, zaščiteno pred svetlobo.	20 µl DPBS brez Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> za 30 ± 2 min pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO <sub>2</sub> , ≥ 95-odstotna relativna vlažnost, zaščiteno pred svetlobo.	–	–
<b>Odmerki pri tretiranju in nanos</b>	50 µl (83,3 µl/cm <sup>2</sup> )	50 mg (83,3 mg/cm <sup>2</sup> ) z uporabo umerjenega orodja (npr. do roba polna žlička, umerjena tako, da drži 50 mg natrijevega klorida).	10 µl DPBS brez Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> + 30 ± 2 µl (60 µl/cm <sup>2</sup> ) Za viskozne snovi uporabite najlonsko mrežico.	30 µl DPBS brez Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> + 30 ± 2 mg (60 mg/cm <sup>2</sup> )
<b>Izpostavljenost in temperatura izpostavljenosti</b>	30 min (± 2 min) v gojišču pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO <sub>2</sub> , ≥ 95-odstotna relativna vlažnost	6 ur (± 0,25 ure) v gojišču pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO <sub>2</sub> , ≥ 95-odstotna relativna vlažnost	30 min (± 2 min) v gojišču pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO <sub>2</sub> , ≥ 95-odstotna relativna vlažnost	4 ure (± 0,1 ure) v gojišču pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO <sub>2</sub> , ≥ 95-odstotna relativna vlažnost
<b>Spiranje pri sobni temperaturi</b>	trikrat v 100 ml DPBS brez Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	trikrat v 100 ml DPBS brez Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	20 ml DPBS brez Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	25 ml DPBS brez Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>
<b>Potopitev izpostavljenosti</b> po	12 min (± 2 min) pri sobni temperaturi v gojišču	25 min (± 2 min) pri sobni temperaturi v gojišču	30 min (± 2 min) pri 37 °C, 5 % CO <sub>2</sub> , 95-odstotni relativni vlažnosti v gojišču	30 min (± 2 min) pri sobni temperaturi v gojišču
<b>Inkubacija izpostavljenosti</b> po	120 min (± 15 min) v gojišču pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO <sub>2</sub> , ≥ 95-odstotna relativna vlažnost	18 ur (± 0,25 ure) v gojišču pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO <sub>2</sub> , ≥ 95-odstotna relativna vlažnost	brez	18 ur (± 0,5 ure) v gojišču pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO <sub>2</sub> , ≥ 95-odstotna relativna vlažnost
<b>Negativna kontrola</b>	50 µl H <sub>2</sub> O preskušeno sočasno	50 µl H <sub>2</sub> O preskušeno sočasno	30 ± 2µl DPBS brez Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> preskušeno sočasno	30 ± 2µl DPBS brez Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> preskušeno sočasno
<b>Pozitivna kontrola</b>	50 µl metilacetata preskušeno sočasno	50 µl metilacetata preskušeno sočasno	30 ± 2µl metilacetata preskušeno sočasno	30 ± 2µl metilacetata preskušeno sočasno
<b>Raztopina MTT</b>	300 µl s koncentracijo 1 mg/ml	300 µl s koncentracijo 1 mg/ml	300 µl s koncentracijo 1 mg/ml	300 µl s koncentracijo 1 mg/ml

Elementi preskusa	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
<b>Inkubacija MTT in temperatura inkubacije MTT</b>	180 min ( $\pm 15$ min) pri $37 \pm 2$ °C, $5 \pm 1$ % CO <sub>2</sub> , $\geq 95$ -odstotna relativna vlažnost	180 min ( $\pm 15$ min) pri $37 \pm 2$ °C, $5 \pm 1$ % CO <sub>2</sub> , $\geq 95$ -odstotna relativna vlažnost	180 min ( $\pm 15$ min) pri $37 \pm 2$ °C, $5 \pm 1$ % CO <sub>2</sub> , $\geq 95$ -odstotna relativna vlažnost	180 min ( $\pm 15$ min) pri $37 \pm 2$ °C, $5 \pm 1$ % CO <sub>2</sub> , $\geq 95$ -odstotna relativna vlažnost
<b>Ekstrakcijsko topilo</b>	2 ml izopropanola (ekstrakcija iz zgornjega in spodnjega dela vstavka s prebadanjem tkiva)	2 ml izopropanola (ekstrakcija iz spodnjega dela vstavka s prebadanjem tkiva)	1,5 ml izopropanola (ekstrakcija iz zgornjega in spodnjega dela vstavka).	1,5 ml izopropanola (ekstrakcija iz spodnjega dela vstavka)
<b>Čas in temperatura ekstrakcije</b>	2–3 ure s stresanjem (~ 120 vrt./min) pri sobni temperaturi ali čez noč pri 4–10 °C	2–3 ure s stresanjem (~ 120 vrt./min) pri sobni temperaturi ali čez noč pri 4–10 °C	4 ure s stresanjem (~ 120 vrt./min) pri sobni temperaturi ali vsaj čez noč brez stresa pri 4–10 °C	vsaj 2 uri s stresanjem (~ 120 vrt./min) pri sobni temperaturi
<b>Odčitek optične gostote</b>	570 nm (550–590 nm) brez referenčnega filtra	570 nm (550–590 nm) brez referenčnega filtra	570 nm (540–600 nm) brez referenčnega filtra	570 nm (540–600 nm) brez referenčnega filtra
<b>Kontrola kakovosti tkiva</b>	tretiranje s 100 $\mu$ l Tritona X-100 s koncentracijo 0,3 vol. % $12,2 \text{ min} \leq \text{ET}_{50} \leq 37,5 \text{ min}$	tretiranje s 100 $\mu$ l Tritona X-100 s koncentracijo 0,3 vol. % $12,2 \text{ min} \leq \text{ET}_{50} \leq 37,5 \text{ min}$	30-minutno tretiranje s SDS (50 $\mu$ l) $1,0 \text{ mg/ml} \leq \text{IC}_{50} \leq 3,5 \text{ mg/ml}$	30-minutno tretiranje s SDS (50 $\mu$ l) $1,0 \text{ mg/ml} \leq \text{IC}_{50} \leq 3,2 \text{ mg/ml}$
<b>Merila sprejemljivost za</b>	<p>1. Srednja optična gostota ponovljenih vzorcev tkiv, tretiranih z negativno kontrolo, mora biti <math>&gt; 0,8</math> in <math>&lt; 2,5</math>.</p> <p>2. Srednja viabilnost ponovljenih vzorcev tkiv, 30 minut izpostavljenih pozitivni kontroli, izražena kot delež negativne kontrole, mora biti <math>&lt; 50</math> %.</p> <p>3. Razlika v viabilnosti med dvema ponovljenima vzorcema tkiv mora biti manjša od 20 %.</p>	<p>1. Srednja optična gostota ponovljenih vzorcev tkiv, tretiranih z negativno kontrolo, mora biti <math>&gt; 0,8</math> in <math>&lt; 2,5</math>.</p> <p>2. Srednja viabilnost ponovljenih vzorcev tkiv, 6 ur izpostavljenih pozitivni kontroli, izražena kot delež negativne kontrole, mora biti <math>&lt; 50</math> %.</p> <p>3. Razlika v viabilnosti med dvema ponovljenima vzorcema tkiv mora biti manjša od 20 %.</p>	<p>1. Srednja optična gostota ponovljenih vzorcev tkiv, tretiranih z negativno kontrolo, mora biti <math>&gt; 1,0</math> in <math>\leq 2,5</math>.</p> <p>2. Srednja viabilnost ponovljenih vzorcev tkiv, 30 minut izpostavljenih pozitivni kontroli, izražena kot delež negativne kontrole, mora biti <math>\leq 30</math> %.</p> <p>3. Razlika v viabilnosti med dvema ponovljenima vzorcema tkiv mora biti manjša od 20 %.</p>	<p>1. Srednja optična gostota ponovljenih vzorcev tkiv, tretiranih z negativno kontrolo, mora biti <math>&gt; 1,0</math> in <math>\leq 2,5</math>.</p> <p>2. Srednja viabilnost ponovljenih vzorcev tkiv, 4 ure izpostavljenih pozitivni kontroli, izražena kot delež negativne kontrole, mora biti <math>\leq 20</math> %.</p> <p>3. Razlika v viabilnosti med dvema ponovljenima vzorcema tkiv mora biti manjša od 20 %.</p>

### **Dodatek 3**

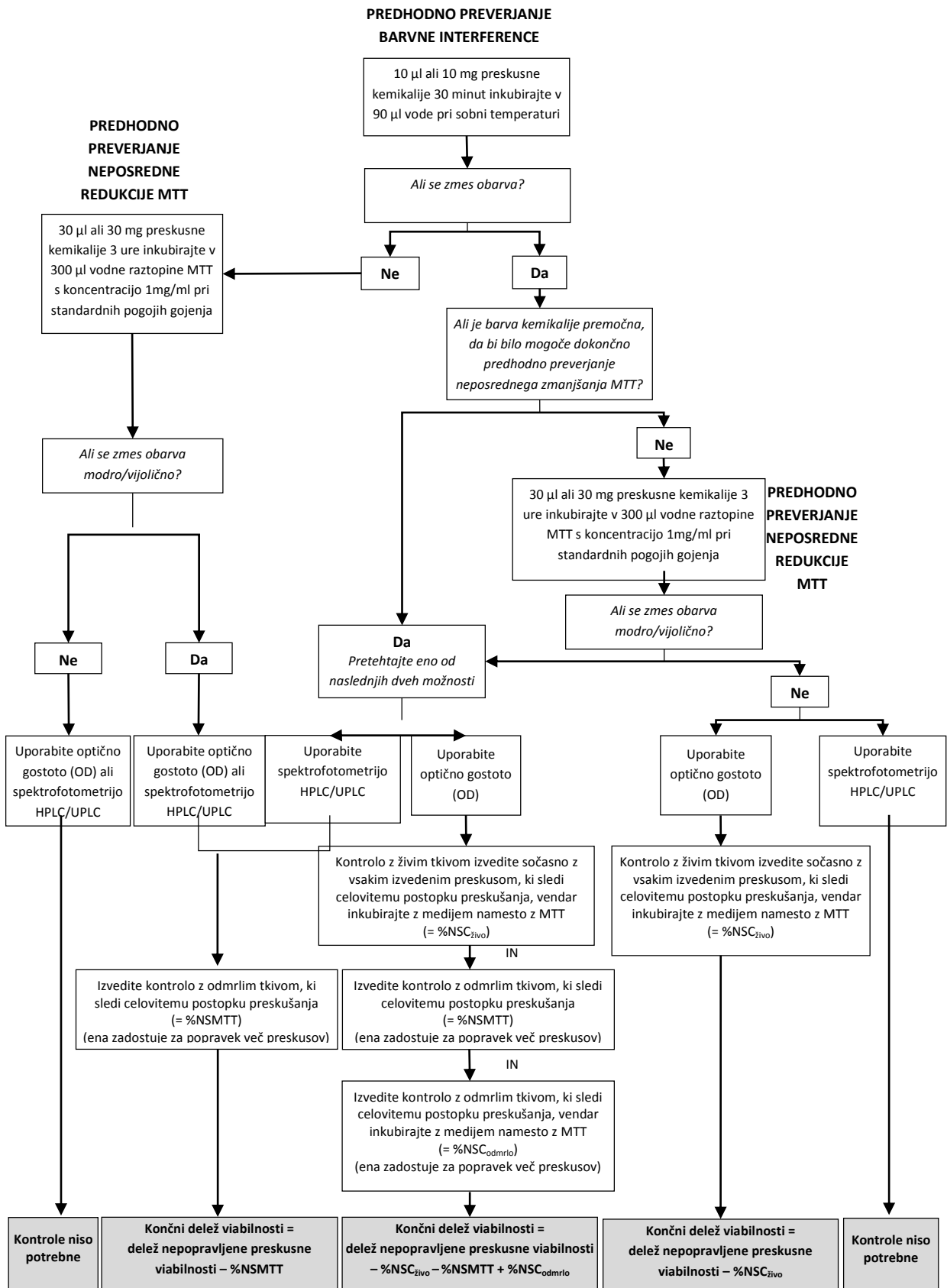
**PONAZORITVENI SHEMATSKI PRIKAZ Z NAVODILI O TEM, KAKO OPREDELITI IN OBRAVNAVATI SNOVI, KI NEPOSREDNO ZMANJŠUJEJO MTT, IN/ALI KEMIČALIJE, KI POVZROČAJO BARVNO INTERFERENCO, NA PODLAGI STANDARDNEGA DELOVNEGA POSTOPKA ZA VRM1**

**PREDHODNO PREVERJANJE  
BARVNE INTERFERENCE**



#### Dodatek 4

**PONAZORITVENI SHEMATSKI PRIKAZ Z NAVODILI O TEM, KAKO OPREDELITI IN OBRAVNAVATI SNOVI, KI NEPOSREDNO ZMANJŠUJEJO MTT, IN/ALI KEMIČALIJE, KI POVZROČAJO BARVNO INTERFERENCO, NA PODLAGI STANDARDNEGA DELOVNEGA POSTOPKA ZA VRM2**



## Dodatek 5

### KLJUČNI PARAMETRI IN MERILA ZA SPREJEMLJIVOST, KI SE UPORABLJANJO ZA UGOTAVLJANJE USTREZNOSTI SISTEMA SPEKTROFOTOMETRIJE HPLC/UPLC ZA MERJENJE FORMAZANA MTT, EKSTRAHIRANEGA IZ KONSTRUKCIJ TKIVA REKONSTRUIRANEGA EPITELIJA, PODOBNEGA ČLOVEŠKEMU ROŽENIČNEMU EPITELIJU

Parameter	Protokol, izpeljan iz smernic FDA (36) (38)	Merila za sprejemljivost
Selektivnost	Analiza izopropanola, živega slepega vzorca (izvlečka izopropanola iz živih konstrukcij tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, brez kakršnega koli tretiranja), odmrlega slepega vzorca (izvlečka izopropanola iz odmrlih konstrukcij tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, brez kakršnega koli tretiranja) in barvila (npr. metilen modrega).	$Površina_{interferenca} \leq 20 \%$ $površine_{LLOQ}^1$ .
Natančnost	Kontrole kakovosti (tj. formazan MTT pri 1,6 µg/ml, 16 µg/ml in 160 µg/ml) v izopropanolu (n = 5).	$KV \leq 15 \%$ ali $\leq 20 \%$ za LLOQ.
Točnost	Kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 5).	$\% Dev \leq 15 \%$ ali $\leq 20 \%$ za LLOQ.
Vpliv matriksa	Kontrole kakovosti v živem slepem vzorcu (n = 5).	$85 \% \leq \% vpliva$ $matriksa \leq 115 \%$
Prenos	Analiza izopropanola po standardu ULOQ <sup>2</sup> .	$Površina_{interferenca} \leq 20 \%$ $površine_{LLOQ}$ .
Obnovljivost (znotraj dneva)	3 neodvisne umeritvene krivulje (na podlagi 6 zaporednih tretjinskih razredčin formazana MTT v izopropanolu, ki se začnejo pri ULOQ, tj. 200 µg/ml); kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 5).	Umeritvene krivulje: $\% Dev \leq 15 \%$ ali $\leq 20 \%$ za LLOQ.
Obnovljivost (med dnevi)	1. dan: 1 umeritvena krivulja in kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 3). 2. dan: 1 umeritvena krivulja in kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 3). 3. dan: 1 umeritvena krivulja in kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 3).	Kontrole kakovosti: $\% Dev \leq 15 \%$ in $KV \leq 15 \%$ .
Kratkoročna stabilnost formazana MTT v izvlečku tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju	Kontrole kakovosti v živih slepih vzorcih (n = 3), analiziranih na dan priprave in po 24 urah hrambe pri sobni temperaturi.	$\% Dev \leq 15 \%$ .
Dolgoročna stabilnost formazana MTT v izvlečku tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu epiteliju, če je	Kontrole kakovosti v živih slepih vzorcih (n = 3), analiziranih na dan priprave in po več dneh hrambe pri -20 °C.	$\% Dev \leq 15 \%$ .

potrebno		
----------	--	--

- <sup>1</sup> LLOQ: spodnja meja določljivosti (Lower Limit of Quantification), opredeljena tako, da zajema 1–2-odstotno viabilnost tkiva, tj. 0,8 µg/ml.
- <sup>2</sup> ULOQ: zgornja meja določljivosti (Upper Limit of Quantification), opredeljena tako, da je vsaj dvakrat višja od najvišje pričakovane koncentracije formazana MTT v izvlečkih izopropanola iz negativnih kontrol (~ 70 µg/ml v VRM), tj. 200 µg/ml.

## **B.70 IN VITRO PRESKUSI S ČLOVEŠKIMI REKOMBINANTNIMI ESTROGENSKIMI RECEPTORJI (hrER) ZA ZAZNAVO KEMIKALIJ Z VEZAVNO AFINITETO ZA ER**

### **SPLOŠNI UVOD**

#### **Smernica OECD za preskušanje na podlagi učinkovitosti**

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 493 (2015). Smernica za preskušanje 493 je na učinkovitosti temelječa smernica za preskušanje, ki opisuje metodologijo za *in vitro* preskuse s človeškimi rekombinantnimi receptorji za zaznavo snovi z afiniteto za vezavo na estrogenske receptorje (v nadaljnjem besedilu: preskusi vezave na hrER). Vključuje dva mehanistično in funkcionalno podobna preskusa za opredelitev snovi, ki se vežejo na estrogenske receptorje (tj. ER $\alpha$ ), ter naj bi olajšala razvoj novih podobnih ali prilagojenih preskusov v skladu z načeli za validacijo, določenimi v Smernici OECD za validacijo in mednarodno priznanje novih ali posodobljenih preskusnih metod za oceno tveganj (1). V celoti validirani referenčni preskusni metodi (Dodatek 2 in Dodatek 3), ki sta podlaga za to preskusno metodo, temelječo na učinkovitosti, sta:

- Freyberger-Wilsonov (FW) preskus vezave na estrogenske receptorje (ER) *in vitro*, pri katerem se uporablja celotni človeški rekombinantni ER $\alpha$  (2), ter
- preskus vezave na estrogenske receptorje *in vitro* z uporabo rekombinantnega človeškega proteina z domeno za vezavo ligandov inštituta CERI (Chemical Evaluation and Research Institute) (2).

Na voljo so standardi izvajanja (3), da se olajšata razvoj in validacija podobnih preskusnih metod za isto končno točko nevarnosti ter omogoči pravočasna sprememba na učinkovitosti temelječe Smernice za preskušanje 493, tako da se lahko posodobljeni na učinkovitosti temelječi smernici za preskušanje dodajo novi podobni preskusi. Vendar bodo podobni preskusi dodani šele, ko jih bo OECD pregledala in potrdila, da so v skladu s standardi izvajanja. Preskusi, vključeni v Smernico za preskušanje 493, se lahko brez razlik uporabljajo za obravnavanje zahtev držav članic OECD po rezultatih preskusov v zvezi z vezavo na estrogenske receptorje, hkrati pa se izkoristi medsebojno priznavanje podatkov OECD.

#### **Ozadje in načela preskusov, vključenih v to preskusno metodo**

2. OECD se je leta 1998 začela ukvarjati s prednostno nalogo revidiranja obstoječih smernic za preskušanje ter priprave novih smernic za presejalne preskuse in preskušanje kemikalij, ki bi lahko povzročale endokrine motnje. Konceptualni okvir OECD za preskušanje in ocenjevanje kemikalij, ki bi lahko povzročale endokrine motnje, je bil revidiran leta 2012. Prvotni in revidirani konceptualni okvir sta kot prilogi vključena v navodila za standardizirane smernice za ocenjevanje kemikalij glede njihovih lastnosti endokrinih motilcev (4). Konceptualni okvir zajema pet ravni, pri čemer vsaka raven ustreza

posamezni stopnji biološke kompleksnosti. Preskusi vezave na estrogenske receptorje, opisani v tej preskusni metodi, so raven 2, ki vključuje ‚preskuse *in vitro*, ki zagotavljajo podatke o izbranih endokrinih mehanizmih/poteh‘. Ta preskusna metoda je za *in vitro* preskuse vezave na receptorje, s katerimi se opredelijo ligandi za človeški estrogenski receptor alfa (ER $\alpha$ ).

3. Ustreznost *in vitro* preskusa vezave na ER za biološke funkcije je bila jasno dokazana. Preskusi vezave na ER so zasnovani, da se opredelijo kemikalije, ki bi lahko zmotile pot hormona estrogena, pri čemer so se v zadnjih dveh desetletjih obširno uporabljali za opredelitev porazdelitve ER v tkivih ter opredelitev agonistov/antagonistov ER. V teh preskusih se kaže interakcija ligand-receptor, ki je začetna faza estrogenske signalne poti in nujna za razmnoževalno funkcijo pri vseh vretenčarjih.
4. Interakcija med estrogeni in ER lahko vpliva na transkripcijo genov, ki jih nadzoruje estrogen, in povzroči negenomske učinke, kar lahko povzroči indukcijo ali inhibicijo celičnih procesov, vključno s tistimi, ki so nujni za celično proliferacijo, normalen razvoj zarodka in razmnoževalno funkcijo (5) (6) (7). Motnja normalnih estrogenskih sistemov ima lahko škodljive učinke na normalen razvoj (ontogenezo), reproduktivno zdravje in celovitost razmnoževalnega sistema. Nepravilno signaliziranje ER ima lahko učinke, kot so povečano tveganje za hormonsko odvisnega raka, zmanjšana plodnost ter spremembe v rasti in razvoju ploda (8).
5. Preskusi vezave *in vitro* temeljijo na neposredni interakciji snovi s specifičnim vezavnim mestom za ligande na receptorju, ki uravnava gensko transkripcijo. Ključni element preskusa s človeškim rekombinantnim estrogenskim receptorjem alfa (hrER $\alpha$ ) meri zmožnost radioaktivno označenega liganda ([ $^3$ H]17 $\beta$ -estradiol), da se veže na ER ob prisotnosti naraščajočih koncentracij preskusne kemikalije (tj. kompetitorja). Preskusne kemikalije, ki imajo visoko afiniteto do ER, tekmujejo z radioaktivno označenim ligandom pri nižji koncentraciji kot kemikalije z nižjo afiniteto do receptorja. Ta preskus je sestavljen iz dveh večjih delov: poskusa vezave z nasičenjem za opredelitev parametrov interakcije receptor-ligand ter dokumentiranja specifičnosti ER, ki mu sledi poskus kompetitivne vezave, za katerega je značilno tekmovanje med preskusno kemikalijo in radioaktivno označenim ligandom za vezavo na ER.
6. Z validacijskimi študijami preskusov vezave inštituta CERI in FW sta bili dokazani njuna ustreznost in zanesljivost za predvideni namen (2).
7. Opredelitve pojmov in kratice, uporabljene pri tej preskusni metodi, so opisane v Dodatku 1.

### **Obseg in omejitve preskusov vezave na receptorje**

8. Ti preskusi so predlagani za namene presejanja in prednostnega razvrščanja, lahko pa zagotovijo tudi podatke za molekularni začetni dogodek, ki se lahko uporabijo pri pristopu,

ki temelji na zanesljivosti dokazov. Z njimi se obravnava vezava kemikalije na domeno za vezavo liganda na ER $\alpha$  v sistemu *in vitro*. Tako se rezultati ne smejo neposredno ekstrapolirati na kompleksno signaliziranje in uravnavanje nedotaknjene endokrinega sistema *in vivo*.

9. Vezava naravnega liganda, 17 $\beta$ -estradiola, je prva faza v nizu molekularnih dogodkov, ki sproži transkripcijo tarčnih genov in nazadnje doseže vrh s fiziološko spremembo (9). Tako se vezava na domeno za vezavo liganda na ER $\alpha$  šteje za enega od ključnih mehanizmov z ER povzročenih motenj endokrinega sistema, čeprav obstajajo še drugi mehanizmi, prek katerih lahko pride do takih motenj, vključno z (i) interakcijami z drugimi mesti ER $\alpha$ , ki niso žep za vezavo liganda, (ii) interakcijami z drugimi receptorji, pomembnimi za estrogensko signaliziranje, ER $\beta$  in estrogenskim receptorjem, sklopljenim s proteinom G, drugimi receptorji in encimskimi sistemi znotraj endokrinega sistema, (iii) sintezo hormonov, (iv) presnovno aktivacijo in/ali inaktivacijo hormonov, (v) porazdelitvijo hormonov v ciljna tkiva in (vi) očistkom hormonov iz telesa. Ti načini delovanja se ne obravnavajo z nobenim od preskusov v okviru te preskusne metode.
10. S to preskusno metodo se obravnava zmožnost snovi, da se vežejo na človeški ER $\alpha$ , in ne razlikuje med agonisti ali antagonistami ER $\alpha$ . Prav tako se s temi preskusi ne obravnavajo niti nadaljnji sledeči dogodki, kot so genska transkripcija ali fiziološke spremembe. Glede na to, da so bile med validacijo uporabljene samo posamezne snovi iz ene sestavine, uporaba za preskušanje zmesi ni bila obravnavana. Ne glede na to so preskusi teoretično ustrezni za preskušanje snovi z več sestavinami in zmesi. Preden se preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni.
11. Brezcelični receptorski sistemi nimajo endogene presnovne zmogljivosti in niso bili validirani v povezavi z encimskimi presnovnimi sistemi. Kljub temu bi bilo mogoče presnovno aktivnost vključiti v zasnovo študije, vendar bi bilo za to potrebno dodatno validacijsko delo.
12. Kemikalije, ki lahko denaturirajo protein (tj. receptorski protein), kot so površinsko aktivne snovi, ali kemikalije, ki lahko spremenijo pH analiznega pufru, se ne smejo preskušati oziroma se lahko preskušajo samo pri koncentracijah, ki ne povzročajo takih interakcij. Sicer pa je območje koncentracije, ki se lahko preskusi pri preskusih s preskusno kemikalijo, omejeno z njeno topnostjo v analiznem pufru.
13. Informativno so v preglednici 1 navedeni rezultati preskusov za 24 snovi, ki so bile preskušene v obeh v celoti validiranih preskusih, opisanih v tej preskusni metodi. Od teh snovi jih je na podlagi objavljenih poročil, vključno s preskusi *in vitro* za transkripcijsko aktivacijo ER in/ali uterotropni preskus (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15), 17 razvrščenih med snovi, ki se vežejo na ER, 6 pa med snovi, ki se ne vežejo. V zvezi s podatki,

povzetimi v preglednici 1, je obstajalo skoraj 100-odstotno ujemanje med obema preskusoma v zvezi z razvrščanjem vseh snovi do  $10^{-4}$  M, vse snovi pa so bile pravilno razvrščene med snovi, ki se vežejo na ER, ali snovi, ki se ne vežejo. Dodatne informacije o tej skupini snovi in dodatnih snoveh, preskušeni v preskusih vezave na ER med validacijskimi študijami, so na voljo v standardih izvajanja za preskus vezave s človeškim rekombinantnim endogenim receptorjem (3), Dodatek 2 (preglednice 1, 2 in 3).

**Preglednica 1:** Razvrstitev snovi med snovi, ki se vežejo na ER, ali snovi, ki se ne vežejo, pri preskusih vezave s človeškim rekombinantnim endogenim receptorjem FW in CERI skupaj s primerjavo s pričakovanim odzivom

	Ime snovi	Št. CAS	Pričakovani odziv	Preskus FW		Preskus CERI		Kemijski razred po MESH	Skupina proizvodov
				Območje koncentracije (M)	Razvrstitev	Območje koncentracije (M)	Razvrstitev		
1	17β-estradiol	50-28-2	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-11}$ do $1 \times 10^{-6}$	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-11}$ do $1 \times 10^{-6}$	snov, ki se veže	steroid	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
2	Noretinodrel	68-23-5	snov, ki se veže	od $3 \times 10^{-9}$ do $30 \times 10^{-4}$	snov, ki se veže	od $3 \times 10^{-9}$ do $30 \times 10^{-4}$	snov, ki se veže	steroid	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
3	Noretindron	68-22-4	snov, ki se veže	od $3 \times 10^{-9}$ do $30 \times 10^{-4}$	snov, ki se veže	od $3 \times 10^{-9}$ do $30 \times 10^{-4}$	snov, ki se veže	steroid	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
4	Di-n-butil ftalat	84-74-2	snov, ki se ne veže*	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-4}$	snov, ki se ne veže**	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-4}$	snov, ki se ne veže**	ogljikovodik (ciklični), ester	mehčalo, kemijski vmesni proizvod
5	DES	56-53-1	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se veže	ogljikovodik (ciklični), fenol	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
6	17α-etinilestradiol	57-63-6	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se veže	steroid	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
7	Mezohexestrol	84-16-2	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se veže	ogljikovodik (ciklični), fenol	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
8	Genistein	446-72-0	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se veže	ogljikovodik (heterociklični), flavonoid	naravni proizvod
9	Ekvol	531-95-3	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se veže	fitoestrogenski metabolit	naravni proizvod
10	Butil paraben (n-butyl-4-hidroksibenzoat)	94-26-8	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se veže	paraben	konzervans
11	Nonilfenol (zmes)	84852-15-3	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se veže	alkilfenol	vmesna spojina
12	o,p'-DDT	789-02-6	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se veže	organoklorin	insekticid
13	Kortikosteron	50-22-6	snov, ki se ne veže*	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-4}$	snov, ki se ne veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-4}$	snov, ki se ne veže	steroid	naravni proizvod
14	Zearalenon	17924-92-4	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se veže	ogljikovodik (heterociklični), lakton	naravni proizvod

15	Tamoksifen	10540-29-1	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se veže	ogljikovodik (ciklični)	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
16	5 $\alpha$ -dihidrotestosteron	521-18-6	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se veže	steroid, nefenolni	naravni proizvod
17	Bisfenol A	80-05-7	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se veže	fenol	kemijski vmesni proizvod
18	4- <i>n</i> -heptilfenol	1987-50-4	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	dvoumno <sup>a</sup>	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se veže	alkilfenol	vmesni proizvod
19	Kepon (klordekon)	143-50-0	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se veže	ogljikovodik (halogenirani)	pesticid
20	Benz(a)antracen	56-55-3	snov, ki se ne veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se ne veže <sup>b</sup>	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se ne veže <sup>b</sup>	aromatski ogljikovodik	vmesni proizvod
21	Enterolakton	78473-71-	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se veže	fitoestrogen	naravni proizvod
22	Progesteron	57-83-0	snov, ki se ne veže*	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-4}$	snov, ki se ne veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-4}$	snov, ki se ne veže	steroid	naravni proizvod
23	Oktiltrietoksilan	2943-75-1	snov, ki se ne veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se ne veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-3}$	snov, ki se ne veže	silan	površinski modifikator
24	Atrazin	1912-24-9	snov, ki se ne veže*	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-4}$	snov, ki se ne veže	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-4}$	snov, ki se ne veže	heterociklična spojina	herbicid

\* Meja topnosti  $< 1 \times 10^{-4}$  M.

\* Uporaba in razvrstitev di-*n*-butil ftalata (DBP) kot snovi, ki se ne veže, sta temeljili na preskušanju do  $10^{-4}$  M, ker je bilo med predvalidacijskimi študijami v nekaterih laboratorijih ugotovljeno, da snov ni topna pri  $10^{-3}$  M (npr. motnost).

† Med validacijsko študijo je bil di-*n*-butil ftalat (DBP) preskušen kot šifrirana preskusna snov s koncentracijami do  $10^{-3}$  M. V teh pogojih so nekateri laboratoriji opazili zmanjšanje vezave radioaktivno označenih ligandov pri najvišji koncentraciji ( $10^{-3}$  M) in/ali dvoumno prilaganje krivulje. Za te ponovitve je bil DBP razvrščen kot ‚dvoumen‘ ali ‚snov, ki se veže‘ v 3/5 laboratorijev, ki so uporabili preskus CERL, in 5/6 laboratorijev, ki so uporabili preskus FW (glej vir (2), oddelka IV.B.3a,b in VI.A).

<sup>a</sup> Razvrstitev se ni ujemala s pričakovano razvrstitvijo. Zaradi razvrstitve 4-*n*-heptilfenola kot ‚dvoumnega‘ ali ‚snovi, ki se ne veže,‘ v 3/5 laboratorijev je bila povprečna razvrstitev razvrstitev med dvoumne snovi. Natančnejši pregled je razkril, da je bilo to posledica omejitev topnosti kemikalije, zaradi katerih ni bilo mogoče dobiti popolne krivulje vezave.

<sup>b</sup> Med validacijsko študijo je bil benz(a)antracen razvrščen kot snov, ki se ne veže (tj. negativna), in sicer na podlagi objavljenih virov, ki dokazujejo, da je estrogeno delovanje te snovi *in vitro* (16) predvsem odvisno od njene presnovne aktivacije (17)(18). Encimska presnovna aktivacija snovi ne bi bila pričakovana v brezceličnih preskusih vezave s človeškim rekombinantnim estrogenskim receptorjem, kot so bili uporabljeni v tej medvalidacijski študiji. Tako je pravilna razvrstitev te snovi med ‚snovi, ki se ne vežejo‘, če se uporablja v preskusnih pogojih za preskusa FW in CERL.

## ELEMENTI PRESKUSA VEZAVE S ČLOVEŠKIM REKOMBINANTNIM ESTROGENSKIM RECEPTORJEM (hrER)

### Nujni elementi preskusa

14. Ta preskusna metoda se uporablja za preskuse, pri katerih se uporabljata receptor ER in primerno močan ligand na receptorju, ki se lahko uporabi kot označevalec/sledilo za preskus in se lahko premešča z naraščanjem koncentracij preskusne kemikalije. Preskusi vezave vsebujejo naslednja glavna elementa: (1) vezavo z nasičenjem in (2) kompetitivno vezavo. Preskus vezave z nasičenjem se uporablja za potrditev specifičnosti in aktivnosti receptorskih

pripravkov, medtem ko se poskus s kompetitivno vezavo uporablja za oceno zmožnosti preskusne kemikalije, da se veže na človeški rekombinantni estrogenski receptor.

### **Kontrole**

15. Opisati je treba podlago za predlagani sočasni referenčni estrogen in kontrole. Sočasne kontrole (topilo (vehikel), pozitivna (snov, ki se veže na ER; močna in šibka afiniteta), negativna (snov, ki se ne veže), kakor je ustrezno, se uporabljajo kot kazalnik, da preskus deluje v preskusnih pogojih, in zagotavljajo podlago za primerjave med poskusi; običajno spadajo med merila za sprejemljivost posameznega poskusa (1). Na eni plošči je treba med vsako ponovitvijo uporabiti celotne krivulje koncentracije za referenčni estrogen in kontrole (tj. snov, ki se veže šibko, in snov, ki se ne veže). Vse druge plošče morajo vsebovati: (1) visoko (približno polna premestitev radioaktivno označenega liganda) in srednjo (približno  $IC_{50}$ ) koncentracijo vsakega od E2 in snovi, ki se veže šibko, v treh ponovitvah; (2) kontrolo s topilom in nespecifično vezavo, vsako v treh ponovitvah.

### **Standardni postopki kontrole kakovosti**

16. Standardne postopke kontrole kakovosti je treba izvesti, kot je opisano za vsak preskus, za zagotovitev, da aktivni receptorji, pravilne koncentracije kemikalij, meje dovoljenega odstopanja ostanejo stabilni skozi več ponovitev in ohranijo sposobnost za zagotovitev pričakovanih odzivov vezave na ER v daljšem časovnem obdobju.

### **Dokazovanje usposobljenosti laboratorija**

17. Pred preskušanjem neznanih kemikalij s katerim od preskusov v okviru te preskusne metode mora vsak laboratorij dokazati usposobljenost za uporabo preskusa, tako da izvede preskuse z nasičenjem, da se potrdita specifičnost in aktivnost pripravka ER, in preskuse s kompetitivno vezavo z referenčnim estrogenom in kontrolami (snov, ki se veže šibko, in snov, ki se ne veže). Laboratorij mora vzpostaviti zbirko podatkov iz preteklih preskusov z rezultati za referenčni estrogen in kontrole, dobljenimi na podlagi 3–5 neodvisnih preskusov, izvedenih na različne dneve. Ti poskusi bodo za laboratorij podlaga za referenčni estrogen in kontrole iz preteklih preskusov ter bodo uporabljeni kot delna ocena sprejemljivosti preskusa za prihodnje ponovitve.
18. Odzivnost preskusnega sistema bo prav tako potrjena s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti, navedenih v preglednici 2. Seznam snovi za preverjanje usposobljenosti je podskupina referenčnih snovi, navedenih v standardih izvajanja za preskuse vezave na ER (3). Te snovi so na voljo na trgu, predstavljajo razrede kemikalij, ki se pogosto povezujejo z delovanjem vezave na ER, ter imajo primeren razpon jakosti, ki se pričakuje za vezavo na ER (tj. močne do šibke), in snovi, ki se ne vežejo (tj. negativne snovi). Za vsako snov za preverjanje usposobljenosti morajo preskušene koncentracije zajemati razpon, naveden v preglednici 2. Za vsako snov je treba izvesti vsaj tri poskuse, rezultati pa morajo biti skladni s pričakovanim kemijskim delovanjem. Vsak poskus je treba izvesti neodvisno (tj. s svežimi razredčinami receptorja, kemikalij in reagenta) in s tremi ponovljenimi vzorci za vsako

koncentracijo. Usposobljenost se dokaže s pravilno razvrstitvijo (pozitivna/negativna) vsake snovi za preverjanje usposobljenosti. Preverjanje usposobljenosti mora izvesti vsak tehnik, ko se uči preskusov.

**Preglednica 2:** Seznam kontrol in snovi za preverjanje usposobljenosti za preskuse kompetitivne vezave na človeški rekombinantni estrogenski receptor<sup>1</sup>

Št.	Ime snovi	Št. CAS <sup>2</sup>	Pričakovani odziv <sup>3,4</sup>	Območje preskusnih koncentracij (M)	Kemijski razred po MeSH <sup>5</sup>	Skupina proizvodov <sup>6</sup>
<b>Kontrole (referenčni estrogen, snov, ki se veže šibko, snov, ki se ne veže)</b>						
1	17-εστραδιολ	50-28-2	snov, ki se veže	od 1 x 10 <sup>-11</sup> do 1 x 10 <sup>-6</sup>	steroid	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
2	Noretinodrel (ali) noretindron	68-23-5 (ali) 68-22-4	snov, ki se veže	od 3 x 10 <sup>-9</sup> do 30 x 10 <sup>-6</sup>	steroid	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
3	Oktiltrietoksisilan	2943-75-1	snov, ki se ne veže	od 1 x 10 <sup>-10</sup> do 1 x 10 <sup>-3</sup>	silan	površinski modifikator
<b>Snovi za preverjanje usposobljenosti<sup>6</sup></b>						
4	Dietilstilbestrol	56-53-1	snov, ki se veže	od 1 x 10 <sup>-11</sup> do 1 x 10 <sup>-6</sup>	ogljikovodik (ciklični), fenol	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
5	17α-etinilestradiol	57-63-6	snov, ki se veže	od 1 x 10 <sup>-11</sup> do 1 x 10 <sup>-6</sup>	steroid	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
6	Mezo-heksestrol	84-16-2	snov, ki se veže	od 1 x 10 <sup>-11</sup> do 1 x 10 <sup>-6</sup>	ogljikovodik (ciklični), fenol	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
7	Tamoksifen	10540-29-1	snov, ki se veže	od 1 x 10 <sup>-11</sup> do 1 x 10 <sup>-6</sup>	ogljikovodik (ciklični)	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
8	Genistein	446-72-0	snov, ki se veže	od 1 x 10 <sup>-10</sup> do 1 x 10 <sup>-3</sup>	heterociklična spojina, flavonoid	naravni proizvod
9	Bisfenol A	80-05-7	snov, ki se veže	od 1 x 10 <sup>-10</sup> do 1 x 10 <sup>-3</sup>	fenol	kemijski vmesni proizvod

10	Zearalenon	17924-92-4	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-11}$ do $1 \times 10^{-3}$	heterociklična spojina, lakton	naravni proizvod
11	Butil paraben	94-26-8	snov, ki se veže	od $1 \times 10^{-11}$ do $1 \times 10^{-3}$	karboksilna kislina, fenol	konzervans
12	Atrazin	1912-24-9	snov, ki se ne veže	od $1 \times 10^{-11}$ do $1 \times 10^{-6}$	heterociklična spojina	herbicid
13	Di-n-butilftalat (DBP) <sup>7</sup>	84-74-2	snov, ki se ne veže <sup>8</sup>	od $1 \times 10^{-10}$ do $1 \times 10^{-4}$	ogljikovodik (ciklični), ester	mehčalo, kemijski vmesni proizvod
14	Kortikosteron	50-22-6	snov, ki se ne veže	od $1 \times 10^{-11}$ do $1 \times 10^{-4}$	steroid	naravni proizvod

<sup>1</sup> Če snov za preverjanje usposobljenosti ni več na voljo na trgu, se lahko uporabi snov z enako razvrstitvijo vezave na ER, primerljivo jakostjo in kemijskim razredom.

<sup>2</sup> Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS).

<sup>3</sup> Razvrstitev kot snov, ki se veže na ER, ali snov, ki se ne veže, med validacijsko študijo za preskusa vezave na človeški rekombinantni estrogenski receptor CER1 in FW (2).

<sup>4</sup> Aktivnost vezave na ER je temeljila na dokumentu ICCVAM o pregledu ozadja preskusov vezave na ER in TA (9) ter na empiričnih podatkih in drugih informacijah, pridobljenih iz referenčnih študij, ki so bile objavljene in pregledane (10) (11) (12) (13) (14) (15).

<sup>5</sup> Snovi so bile razvrščene v enega ali več kemijskih razredov z uporabo mednarodno priznanega standardiziranega sistema za razvrščanje, U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) (na voljo na <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

<sup>6</sup> Snovi so bile razvrščene v enega ali več razredov proizvodov z uporabo U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (na voljo na <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

<sup>7</sup> DPB se lahko uporabi kot nadomestna kontrolna snov, ki se ne veže, preskušena pri najvišji koncentraciji  $10^{-4}$  M.

<sup>8</sup> Meja topnosti za to snov je  $10^{-4}$  M. Uporaba in razvrstitev di-n-butil ftalata (DBP) kot snovi, ki se ne veže, sta temeljili na preskušanju do  $10^{-4}$  M, ker je bilo med predvalidacijskimi študijami v nekaterih laboratorijih ugotovljeno, da snov ni topna pri  $10^{-3}$  M (npr. motnost).

## **Preskušanje topnosti in določanje območja koncentracije za preskusne kemikalije**

19. Izvesti je treba predhodni preskus za določitev meje topnosti za vsako preskusno kemikalijo in za opredelitev ustreznega območja koncentracije, ki se uporabi pri izvajanju preskusa. Mejo topnosti vsake preskusne kemikalije je treba najprej določiti v topilu in nato dodatno potrditi v pogojih preskusa. Končna koncentracija, preskušena v preskusu, ne sme presežati 1 mM. Preskušanje za določanje območja sestavljajo kontrola s topilom in osem logaritemskih zaporednih razredčin, ki se začnejo pri najvišji dopustni koncentraciji (npr. 1 mM ali manj, odvisno od meje topnosti), ter evidentiranje morebitne motnosti ali oborine. Koncentracije pri drugem in tretjem poskusu je treba ustrezno prilagoditi, da se bolje izrazi krivulja odziva na koncentracijo.

## **Merila za sprejemljivost ponovitve preskusa**

20. Sprejetje ali zavrnitev ponovitve preskusa temelji na oceni rezultatov, dobljenih za referenčni estrogen in kontrolo, uporabljeno za posamezni poskus. Najprej, za prvo ploščo morajo celotne krivulje koncentracije za referenčne kontrole iz vsakega poskusa ustrezati meritvam učinkovitosti s parametri prileganja krivulje (npr.  $IC_{50}$  in Hillov naklon) na podlagi rezultatov, sporočenih za zadevne protokole pri preskusih CERI in FW (dodatka 2 in 3), in podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov laboratorija, ki izvaja preskus. Vse kontrole (referenčni estrogen, snov, ki se veže šibko, in snov, ki se ne veže) morajo biti za vsak poskus ustrezno razvrščene. Dalje, kontrole na vseh naslednjih ploščah je treba oceniti glede skladnosti s prvo ploščo. Uporabiti je treba dovolj veliko območje koncentracij preskusne kemikalije, da se jasno opredeli vrh krivulje kompetitivne vezave. Variabilnost med ponovljenimi vzorci pri vsaki koncentraciji preskusne kemikalije in med tremi neodvisnimi ponovitvami mora biti mogoče razumno in znanstveno utemeljiti. Sposobnost doslednega izvajanja preskusa je treba dokazati z vzpostavitvijo in vzdrževanjem zbirke podatkov iz preteklih preskusov za referenčni estrogen in kontrole. Standardni odkloni ali koeficienti variacije za srednje vrednosti parametrov prileganja krivulj vezave na referenčni estrogen in kontrol s snovmi, ki se šibko vežejo, iz več poskusov se lahko uporabijo kot merilo za obnovljivost znotraj laboratorija. Pri pregledu rezultatov kontrole plošč iz vsake ponovitve in za vsako preskusno kemikalijo je treba uporabiti strokovno presojo.

Poleg tega je treba upoštevati naslednja načela v zvezi z merili za sprejemljivost:

- Podatki morajo zadostovati za kvantitativno oceno vezave na ER.
- Preskušene koncentracije morajo ostati znotraj razpona topnosti preskusne kemikalije.

## **Analiza podatkov**

21. Opredeljeni postopek podatkovne analize za podatke o vezavi z nasičenjem in kompetitivni vezavi mora biti v skladu s ključnimi načeli za opredelitev interakcij receptor-ligand. Običajno se podatki o vezavi z nasičenjem analizirajo z uporabo modela nelinearne regresije, ki upošteva celotno in nespecifično vezavo. Pri določanju  $B_{max}$  in  $K_d$  je morda potreben

popravek zaradi izgube liganda (npr. Swillens, 1995 (19)). Podatki iz preskusov kompetitivne vezave se običajno pretvorijo (npr. delež specifične vezave in koncentracija preskusne kemikalije (log M)). Ocene logaritma ( $IC_{50}$ ) za vsako preskusno kemikalijo je treba določiti z uporabo ustrezne programske opreme za nelinearno prilaganje krivulj, da ustreza štiriparametrski Hillovi enačbi. Po začetni analizi je treba izpeljati parametre prilaganja krivulj in vizualni pregled, kako dobro se podatki o vezavi prilagajo dobljeni krivulji kompetitivne vezave. V nekaterih primerih je za najboljše prilaganje krivulje morda potrebna dodatna analiza (npr. z omejitvijo vrha in/ali dna krivulje, uporabo pravila 10 %, glej Dodatek 4 in sklic 2 (oddelek III.A.2)).

22. Izpolnjevanje meril za sprejemljivost (odstavek 20) kaže, da preskusni sistem deluje pravilno, vendar ne zagotavlja, da bodo pri posameznem preskusu dobljeni točni podatki. Najboljši znak, da so bili dobljeni točni podatki, je podvojitev pravilnih rezultatov prvega preskusa.

### **Splošna merila za razlago rezultatov**

23. Trenutno ni splošno sprejete metode za razlago podatkov o vezavi na ER. Kljub temu morata kvalitativna (npr. snov, ki se veže/snov, ki se ne veže) in/ali kvantitativna (npr. log  $IC_{50}$ , relativna vezavna afiniteta (RBA) itd.) ocena s človeškim rekombinantnim estrogenskim receptorjem povzročene dejavnosti temeljiti na empiričnih podatkih in razumni znanstveni presoji.

### **Poročilo o preskusu**

24. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

#### *Preskus:*

- uporabljeni preskus.

#### *Kontrolna/referenčna/preskusna kemikalija:*

- vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;
- stabilnost preskusne kemikalije, če je znana;
- topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu, če sta znani;
- meritve vrednosti pH, osmolarnosti in oborine v gojišču, ki mu je bila dodana preskusna kemikalija, če je ustrezno.

#### *Snov iz ene sestavine:*

- fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;
- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

- čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

*Topilo/vehikel:*

- opredelitev lastnosti (narava, dobavitelj in serija);
- utemeljitev izbire topila/vehikla;
- topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu/vehiklu, če je znana.

*Receptorji:*

- vir receptorjev (dobavitelj, kataloška št., serija, vrsta receptorja, koncentracija aktivnega receptorja, ki jo zagotavlja dobavitelj, potrdilo dobavitelja);
- opredelitev lastnosti receptorjev (vključno z rezultati vezave z nasičenjem):  $K_d$ ,  $B_{max}$ ;
- hramba receptorjev;
- radioaktivno označen ligand:
- dobavitelj, kataloška št., serija, specifično delovanje.

*Preskusni pogoji:*

- omejitve topnosti v pogojih preskusa;
- sestava vezavnega pufra;
- koncentracija receptorja;
- koncentracija sledila (tj. radioaktivno označenega liganda);
- koncentracije preskusne kemikalije;
- delež vehikla v končnem preskusu;
- inkubacijska temperatura in čas trajanja inkubacije;
- metoda vezanega/prostega ločevanja;
- pozitivne in negativne kontrole/referenčne snovi;
- merila za določitev, ali je preskus pozitiven, negativen ali dvoumen.

*Preverjanje sprejemljivosti:*

- dejanske vrednosti  $IC_{50}$  in Hillovega naklona za sočasne pozitivne kontrole/referenčne snovi.

*Rezultati:*

- neobdelani in vezani/prosti podatki;
- preverjanje za potrditev denaturacije, če je ustrezno;

- najnižja efektivna koncentracija, če obstaja;
- vrednosti relativne vezavne afinitete in/ali  $IC_{50}$ , kot je ustrezno;
- razmerje med koncentracijo in odzivom, kadar je mogoče;
- statistične analize, če obstajajo, skupaj z meritvijo napake in zaupanja (npr. SEM, SD, CV ali 95 % CI) ter opisom, kako so bile te vrednosti dobljene.

*Razprava o rezultatih:*

- uporaba pravila 10 %.

*Sklepna ugotovitev*

## VIRI

- (1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 34), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (2) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER $\alpha$ ), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 226), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (3) OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER $\alpha$ ), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 222), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (4) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 150), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (5) Cavailles, V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: str. 20–6.
- (6) Welboren, W. J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr. Relat. Cancer.*, 16(4): str. 1073–89.
- (7) Younes, M., in Honma, N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): str. 63–6.
- (8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, *Endo Rev* 30(4): 293–342.
- (9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (publikacija NIH št. 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.
- (10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- (11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

- (12) Akahori, Y., *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol. In Vitro*, 22(1): 225–231.
- (13) OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 67), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. str. 1–188.
- (15) Yamasaki, K., Noda, S., Imatanaka, N., Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, *Toxicol. Letters*, 146: 111–120.
- (16) Kummer, V., Maskova, J., Zraly, Z., Neca, J., Simeckova, P., Vondracek, J., Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol. Letters*, 180: 213–221.
- (17) Gozgit, J. M., Nestor, K. M., Fasco, M. J., Pentecost, B. T., Arcaro, K. F. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol.*, 196: 58–67.
- (18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. *Chemosphere*, 34: 835–848.
- (19) Swillens, S. (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, *Mol Pharmacol* 47(6): 1197–1203.

## Dodatek 1

### OPREDELITVE POJMOV IN OKRAJŠAVE

**Pravilo 10 %:** možnost, da se iz analiz izključijo podatkovne točke, pri katerih je srednja vrednost ponovljenih vzorcev za delež specifične vezave [<sup>3</sup>H]17β-estradiola najmanj 10 % nad opaženim deležem srednje vrednosti pri nižji koncentraciji (glej Dodatek 4).

**Merila za sprejemljivost:** minimalni standardi za učinkovitost poskusnih kontrol in referenčnih standardov. Da se poskus šteje za veljaven, morajo biti izpolnjena vsa merila za sprejemljivost.

**Točnost (skladnost):** stopnja ujemanja rezultatov preskusa s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusa in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz ‚skladnost‘ se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusa (1).

**KO:** konceptualni okvir OECD za preskušanje in ocenjevanje endokrinih motilcev.

**Kemikalija:** snov ali zmes.

**KV:** koeficient variacije.

**E2: 17β-estradiol**

**ED: endokrina motnja.**

**hERα:** človeški estrogenski receptor alfa.

**ER:** estrogenski receptor.

**Estrogenska aktivnost:** zmožnost kemikalije, da posnema 17β-estradiol, kar zadeva njegovo sposobnost vezave na estrogenske receptorje. Vezavo na hERα je mogoče zaznati s to preskusno metodo.

**IC<sub>50</sub>:** srednja efektivna koncentracija inhibitorne preskusne snovi.

**ICCVAM:** Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (medagencijski koordinacijski odbor ZDA za validacijo alternativnih metod).

**Obnovljivost med laboratoriji:** merilo, v kakšnem obsegu lahko različni usposobljeni laboratoriji z uporabo istega protokola in preskušanjem istih snovi dobijo kvalitativno in kvantitativno podobne rezultate. Obnovljivost med laboratoriji se ugotovi med postopki pred validacijo in med njo ter kaže, v kakšnem obsegu se lahko preskus uspešno uporablja v več laboratorijih; imenuje se tudi obnovljivost v različnih laboratorijih (1).

**Obnovljivost v laboratoriju:** določitev, v kakšnem obsegu lahko usposobljene osebe v istem laboratoriju uspešno ponovijo rezultate z uporabo določenega protokola ob različnih časih. Imenuje se tudi obnovljivost znotraj laboratorija (1).

**LEC:** najnižja efektivna koncentracija je najnižja koncentracija preskusne kemikalije, ki povzroči odziv (tj. najnižja koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri se razmerje indukcije statistično

razlikuje od sočasne kontrole z vehiklom).

**Podoben preskus:** pogovorni izraz za preskus, ki je strukturno in funkcionalno podoben validirani in sprejeti referenčni preskusni metodi. Uporablja se kot sopomenka za podobno preskusno metodo.

**PBTG:** smernica za preskušanje na podlagi učinkovitosti.

**Standardi izvajanja:** standardi, ki temeljijo na validirani preskusni metodi in so podlaga za oceno primerljivosti predlaganega preskusa, ki je funkcijsko in mehanistično podoben. Vključujejo: (1) nujne elemente preskusa; (2) najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij, izbranih iz skupine kemikalij, ki se uporabljajo za dokazovanje sprejemljive učinkovitosti validirane preskusne metode, ter (3) primerljive stopnje točnosti in zanesljivosti, ki temeljijo na rezultatih validirane preskusne metode, kar mora dokazati predlagani preskus pri ocenjevanju ob uporabi najkrajšega možnega seznama referenčnih kemikalij (1).

**Snovi za preverjanje usposobljenosti:** podskupina referenčnih snovi, vključenih v standarde izvajanja, ki jih lahko laboratoriji uporabijo za dokazovanje tehnične usposobljenosti za standardiziran preskus. Običajno so med merili za izbor teh snovi: da predstavljajo celoten razpon odzivov, da so na voljo na trgu in da so zanje na voljo visokokakovostni referenčni podatki.

**Usposobljenost:** dokazana sposobnost za pravilno izvedbo preskusa pred preskušanjem neznanih snovi.

**Referenčni estrogen:** 17 $\beta$ -estradiol (E2, št. CAS 50-28-2).

**Referenčne preskusne metode:** preskusi, na katerih temelji PBTG 493.

**RBA:** relativna vezavna afiniteta. Relativna vezavna afiniteta snovi se izračuna kot delež logaritma (IC<sub>50</sub>) za snov v razmerju do logaritma (IC<sub>50</sub>) za 17 $\beta$ -estradiol.

**Ustreznost:** opis razmerja med preskusom in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni, v kakšnem obsegu se s preskusom pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Pri ustreznosti se upošteva tudi točnost (skladnost) preskusa (1).

**Zanesljivost:** stopnja obnovljivosti preskusa v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih.

**SO:** standardni odklon.

**Preskusna kemikalija:** vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

**Validirana preskusna metoda:** preskus, za katerega sta bili na podlagi končanih validacijskih študij določeni ustreznost (vključno s točnostjo) in zanesljivost za določen namen. Opozoriti je treba, da točnost in zanesljivost validirane preskusne metode nista nujno zadostni, da bi bila sprejemljiva za predlagani namen (1).

**Validacija:** postopek, s katerim se določita zanesljivost in ustreznost posameznega pristopa,

metode, preskusa, postopka ali ocene za opredeljeni namen (1).

## Dodatek 2

### **FREYBERGER-WILSONOVA *IN VITRO* PRESKUSA VEZAVE Z NASIČENJEM IN KOMPETITIVNE VEZAVE NA ESTROGENSKI RECEPTOR (ER $\alpha$ ) Z UPORABO CELOTNEGA REKOMBINANTNEGA ER $\alpha$**

#### **ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)**

1. Pri tem *in vitro* preskusu vezave z nasičenjem in kompetitivne vezave na estrogenski receptor (ER $\alpha$ ) se uporablja celotni človeški receptor ER $\alpha$  (hrER $\alpha$ ), ki nastane v celicah žuželk, okuženih z bakulovirusom, nato pa se iz njih izolira. Protokol, ki sta ga razvila Freyberger in Wilson, je bil predmet mednarodne validacijske študije, izvedene v več laboratorijih (2), ki je dokazala njegovo ustreznost in zanesljivost za predvideni namen preskusa.
2. Ta preskus je presejalni postopek za opredelitev snovi, ki se lahko vežejo na celotno hrER $\alpha$ . Uporablja se za določitev zmožnosti preskusne kemikalije, da tekmuje s 17 $\beta$ -estradiolom za vezavo na hrER $\alpha$ . Rezultati kvantitativne analize lahko vključujejo IC<sub>50</sub> (merjenje koncentracije preskusne kemikalije, potrebne, da izpodrine polovico [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -estradiola z hrER $\alpha$ ) in relativne vezavne afinitete preskusnih kemikalij za hrER $\alpha$  v primerjavi s 17 $\beta$ -estradiolom. Za namene presejanja kemikalij lahko sprejemljivi rezultati kvalitativne analize vključujejo razvrstitve preskusnih kemikalij kot snovi, ki se vežejo na hrER $\alpha$ , snovi, ki se ne vežejo, ali dvoumne snovi na podlagi meril, opisanih za krivulje vezave.
3. Pri preskusu se uporabi radioaktivno označen ligand, zaradi katerega laboratorij potrebuje dovoljenje za radioaktivne materiale. Vsi postopki z radioizotopi in nevarnimi kemikalijami morajo potekati v skladu s predpisi in postopki, kot so opisani v nacionalni zakonodaji.
4. Pred uporabo tega preskusa za regulativne namene je treba prebrati oddelka ‚**SPLOŠNI UVOD**‘ in ‚**ELEMENTI PRESKUSA VEZAVE NA hrER**‘. Opredelitve in kratice, uporabljene v tej smernici za preskušanje, so opisane v Dodatku 1.

#### **NAČELA PRESKUSA (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)**

5. S preskusom vezave na hrER $\alpha$  se meri zmožnost radioaktivno označenega liganda ([<sup>3</sup>H]17 $\beta$ -estradiol), da se veže na ER ob prisotnosti naraščajočih koncentracij preskusne kemikalije (tj. kompetitorja). Preskusne kemikalije, ki imajo visoko afiniteto do ER, tekmujejo z radioaktivno označenim ligandom pri nižji koncentraciji kot kemikalije z nižjo afiniteto do receptorja.
6. Ta preskus je sestavljen iz dveh večjih delov: poskusa vezave z nasičenjem za opredelitev parametrov interakcije receptor-ligand in nato poskusa kompetitivne vezave ER, za

katerega je značilno tekmovanje med preskusno kemikalijo in radioaktivno označenim ligandom za vezavo na ER.

7. Namen poskusa vezave z nasičenjem je opredeliti določeno serijo receptorjev za vezavno afiniteto in število vezav kot pripravo na poskus kompetitivne vezave. S poskusom vezave z nasičenjem se v pogojih stacionarnega stanja merita afiniteta stalne koncentracije estrogenskega receptorja do njegovega naravnega liganda (ki jo predstavlja disociacijska konstanta,  $K_d$ ) in koncentracija aktivnih receptorskih mest ( $B_{max}$ ).
8. S poskusom kompetitivne vezave se meri afiniteta snovi, da tekmuje z  $[^3H]17\beta$ -estradiolom za vezavo na ER. Afiniteta je kvantificirana s koncentracijo preskusne kemikalije, ki v stacionarnem stanju zavira 50 % specifične vezave  $[^3H]17\beta$ -estradiola (tako imenovana inhibicijska koncentracija 50 % ali  $IC_{50}$ ). To se lahko oceni tudi na podlagi relativne vezavne afinitete (RBA glede na  $IC_{50}$  estradiola, merjeno ločeno v isti ponovitvi). S poskusom kompetitivne vezave se meri vezava  $[^3H]17\beta$ -estradiola pri stalni koncentraciji v prisotnosti širokega razpona (osem redov velikosti) koncentracij preskusne kemikalije. Če je mogoče, se nato podatki prilagodijo obliki Hillove enačbe (Hill, 1910), ki opisuje izpodrinjenje radioaktivno označenega liganda s kompetitivno snovjo, ki se veže na eno mesto. Glede na obseg izpodrinjenja radioaktivno označenega estradiola v stacionarnem stanju se preskusna kemikalija opredeli kot snov, ki se veže, snov, ki se ne veže, ali snov, ki povzroči dvoumen odziv.

## POSTOPEK

### Dokazovanje sprejemljive učinkovitosti proteina hrER $\alpha$

9. Pred rednim izvajanjem preskusov vezave z nasičenjem in kompetitivne vezave je treba za vsako novo serijo hrER $\alpha$  dokazati pravilno delovanje v laboratoriju, v katerem bo uporabljena. Za dokaz učinkovitosti je treba uporabiti postopek v dveh korakih. Ta koraka sta naslednja:
  - izvedite preskus vezave z nasičenjem  $[^3H]$ - $17\beta$ -estradiola, da dokažete specifičnost in nasičenost hrER $\alpha$ . Analiza teh podatkov z nelinearno regresijo (npr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) in dobljeni Scatchardov diagram morata dokumentirati vezavno afiniteto hrER $\alpha$   $[^3H]$ - $17\beta$ -estradiola ( $K_d$ ) in število receptorjev ( $B_{max}$ ) za vsako serijo hrER $\alpha$ ;
  - izvedite preskus kompetitivne vezave z uporabo kontrolnih snovi (referenčnega estrogena ( $17\beta$ -estradiola), snovi, ki se veže šibko (npr. noretinodrela ali noretindrona), in snovi, ki se ne veže (oktiltrietoksisilana, OTES). Vsak laboratorij mora vzpostaviti zbirko podatkov iz preteklih preskusov, da dokumentira skladnost  $IC_{50}$  in drugih ustreznih vrednosti za referenčni estrogen in snov, ki se veže šibko, med poskusi in različnimi serijami hrER $\alpha$ . Parametri krivulj kompetitivne vezave za kontrolne snovi morajo biti v mejah 95-

odstotnega intervala zaupanja (glej preglednico 1), ki so bile določene na podlagi podatkov laboratorijev, sodelujočih v validacijski študiji za ta preskus (2).

**Preglednica 1:** Merila za učinkovitost, razvita za referenčni estrogen in snov, ki se veže šibko, preskus vezave FW hrER

Snov	Parameter	Srednja vrednost <sup>a</sup>	Standardni odklon (n)	95-odstotni intervali zaupanja <sup>b</sup>	
				Spodnja meja	Zgornja meja
17 $\beta$ -estradiol	Vrh (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Dno (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Hillov naklon	-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
Noretinodrel	Vrh (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Dno (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hillov naklon	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	Log IC <sub>50</sub> (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Noretindron <sup>c</sup>	Vrh (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Dno (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hillov naklon	-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>Srednja vrednost (n)  $\pm$  standardni odklon (SD) sta bila izračunana na podlagi ocen parametrov prileganja krivulj (4-parametrna Hillova enačba) za kontrolne ponovitve, izvedene v štirih laboratorijih med validacijsko študijo (glej Prilogo N k viru 2).

<sup>b</sup>Pri merilih za sprejemljivost so kot vodilo navedeni 95-odstotni intervali zaupanja.

<sup>c</sup>Preskušanje noretindrona za podnalogo 4 med validacijsko študijo ni bilo obvezno (glej vir 2, podnaloga 4). Tako sta bila srednja vrednost  $\pm$  standardni odklon (SD) (n) izračunana na podlagi ocen prileganja krivulj (4-parametrna Hillova enačba) za kontrolne ponovitve, izvedene v dveh laboratorijih.

Razpon IC<sub>50</sub> je odvisen od Kd pripravka receptorja in koncentracije radioaktivno označenega liganda, uporabljenih v vsakem laboratoriju. Dopustna je ustrezna prilagoditev razpona IC<sub>50</sub> na podlagi pogojev, uporabljenih za izvedbo preskusa.

## Dokazovanje usposobljenosti laboratorija

10. Glej odstavka 17 in 18 ter preglednico 2 v oddelku **ELEMENTI PRESKUSA VEZAVE NA hrER<sup>c</sup>** te preskusne metode. Vsak preskus (vezava z nasičenjem in kompetitivna vezava) morajo sestavljati tri neodvisne ponovitve (tj. s svežimi razredčinami receptorja, kemikalij in reagentov) na različne dneve, vsaka ponovitev pa mora vsebovati tri ponovljene vzorce.

## Določitev koncentracije receptorja (hrER $\alpha$ )

11. Koncentracija aktivnega receptorja se nekoliko razlikuje glede na serijo in pogoje shranjevanja. Iz tega razloga je treba določiti koncentracijo aktivnega receptorja, kot se prejme od dobavitelja. Tako se dobi ustrezna koncentracija aktivnega receptorja ob ponovitvi.
12. V pogojih, ki ustrezajo kompetitivni vezavi (tj. 1 nM [<sup>3</sup>H]-estradiola), je treba nominalne koncentracije 0,25, 0,5, 0,75 in 1 nM receptorja inkubirati v odsotnosti (celotna vezava) in

prisotnosti (nespecifična vezava) 1  $\mu\text{M}$  neoznačenega estradiola. Specifična vezava, izračunana kot razlika med celotno in nespecifično vezavo, se grafično prikaže v odvisnosti od nominalne koncentracije receptorja. Koncentracija receptorja, pri kateri vrednosti specifične vezave ustrezajo 20 % dodanega izotopskega označevalca, se poveže z ustrezno nominalno koncentracijo receptorja, in to koncentracijo receptorja je treba uporabiti za poskuse vezave z nasičenjem in kompetitivne vezave. Pogosto temu pogoju ustreza končna koncentracija hrER 0,5 nM.

13. Če merila 20 % večkrat ni mogoče izpolniti, je treba preveriti morebitne napake v zasnovi poskusa. Neizpolnjevanje merila 20 % lahko nakazuje, da je v rekombinantni seriji zelo malo aktivnega receptorja, zato je treba razmisliti o uporabi druge serije receptorja.

### **Preskus z nasičenjem**

14. Osem naraščajočih koncentracij [ $^3\text{H}$ ]17 $\beta$ -estradiola je treba oceniti v treh ponovitvah v naslednjih treh pogojih (glej preglednico 2):

- v odsotnosti neoznačenega 17 $\beta$ -estradiola in prisotnosti ER. To je določitev celotne vezave z merjenjem radioaktivnosti v jamicah, v katerih je samo [ $^3\text{H}$ ]17 $\beta$ -estradiol;
- v prisotnosti 1 000-kratne presežne koncentracije neoznačenega 17 $\beta$ -estradiola v primerjavi z označenim 17 $\beta$ -estradiolom in prisotnosti ER. Namen tega pogoja je nasičiti aktivna vezavna mesta z neoznačenim 17 $\beta$ -estradiolom in z merjenjem radioaktivnosti v jamicah določiti nespecifično vezavo. Za ves preostali vroči estradiol, ki se lahko veže na receptor, se šteje, da se veže na nespecifično mesto, saj mora biti koncentracija hladnega estradiola tako visoka, da je vezan na vsa razpoložljiva specifična mesta na receptorju;
- v odsotnosti neoznačenega 17 $\beta$ -estradiola in odsotnosti ER (določitev skupne radioaktivnosti).

### *Priprava raztopin [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiola in neoznačenega 17 $\beta$ -estradiola*

15. Razredčine [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiola je treba pripraviti z dodajanjem analiznega pufra v osnovne raztopine [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiola s koncentracijo 12 nM, da se dobijo koncentracije, ki sprva segajo od 0,12 nM do 12 nM. Z dodajanjem 40  $\mu\text{l}$  teh raztopin v ustrezne preskusne jamice na 96-jamični mikrotitrski plošči (v končno količino 160  $\mu\text{l}$ ) se dobijo končne preskusne koncentracije, ki segajo od 0,03 do 3,0 nM. Priprava analiznega pufra, osnovne raztopine in razredčin [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiola ter določitev koncentracij sta podrobno opisani v protokolu FW (2).

16. Razredčine etanolnih raztopin 17 $\beta$ -estradiola je treba pripraviti z dodajanjem analiznega pufra, da se dobi osem naraščajočih koncentracij, ki prvotno segajo od 0,06  $\mu\text{M}$  do 6  $\mu\text{M}$ . Z dodajanjem 80  $\mu\text{l}$  teh raztopin v ustrezne preskusne jamice na 96-jamični mikrotitrski plošči (v končno količino 160  $\mu\text{l}$ ) se dobijo končne preskusne koncentracije, ki segajo od 0,03  $\mu\text{M}$  do 3,0  $\mu\text{M}$ . Končna koncentracija neoznačenega 17 $\beta$ -estradiola v posameznih preskusnih jamicah za nespecifično vezavo mora biti 1 000-kratnik koncentracije

označenega [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola. Priprava razredčin neoznačenega 17β-estradiola je podrobno opisana v protokolu FW (2).

17. Uporabiti je treba nominalno koncentracijo receptorja, ki daje 20 ± 5 % specifične vezave (glej odstavka 12 in 13). Raztopino hrERα je treba pripraviti neposredno pred uporabo.
18. 96-jamične mikrotitrne plošče se pripravijo, kot je prikazano v preglednici 2, s tremi ponovljenimi vzorci na koncentracijo. Primer razvrstitve [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola, neoznačenega 17β-estradiola, pufru in receptorja glede na koncentracijo in količino je naveden v Dodatku 2.2.

**Preglednica 2:** Razporeditev na mikrotitrski plošči za preskus vezave z nasičenjem

	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			Celotna vezava (topilo)
<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>			Nespecifič na vezava
<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>													
<b>H</b>													

[<sup>3</sup>H] E<sub>2</sub>: [<sup>3</sup>H]-17β-estradiol.

ER: estrogenski receptor.

E<sub>2</sub>: neoznačen 17β-estradiol.

19. Preskusne mikrotitrne plošče je treba 16–20 ur inkubirati pri 2–8 °C in jih med inkubacijo namestiti na rotator.

*Meritev [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola, vezanega na hrERα*

20. [<sup>3</sup>H]-17β-estradiol, vezan na hrERα, je treba ločiti od prostega [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola z dodajanjem 80 μl hladne raztopine DCC v vsako jamico, 10-minutnim stresanjem mikrotitrskih plošč in 10-minutnim centrifugiranjem pri približno 2500 vrt./min. Da se med tem postopkom čim bolj zmanjša disociacija vezanega [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola od hrERα, je izjemno pomembno, da se pufrji in preskusne jamice vzdržujejo pri 2–8 °C in da se vsaka faza izvede hitro. Za učinkovito in hitro obdelavo plošč je potreben stresalnik mikrotitrskih plošč.

21. S 50 µl supernatanta, ki vsebuje na hrERα vezan [<sup>3</sup>H]-17β-estradiol, je treba ravnati nadvse previdno, da se prepreči kontaminacija jamic z dotikanjem DCC, in ga je treba namestiti na drugo mikrotitrsko ploščo.

22. V vsako jamico je nato treba dodati 200 µl scintilacijske tekočine, ki je sposobna kinetično energijo nuklearnih emisij pretvoriti v svetlobno energijo (A1–B12 in od D1 do E12). Jamice G1–H12 (opredeljene kot skupno število razgradenj na minuto) predstavljajo zaporedne razredčine [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola (40 µl), ki jih je treba dodati neposredno v scintilacijsko tekočino v jamicah merilne plošče, kot je navedeno v preglednici 3, tako da te jamice vsebujejo samo 200 µl scintilacijske tekočine in ustrezno razredčino [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola. Te meritve pokažejo, koliko [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola v razgradnjah na minuto je bilo dodanega vsakemu nizu jamic za celotno vezavo in nespecifično vezavo.

**Preglednica 3:** Razporeditev na mikrotitrski plošči za preskus vezave z nasičenjem, merjenje radioaktivnosti

	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			Celotna vezava (topilo)
<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>			Nespecifična vezava
<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> (skupno število razgradenj na minuto)			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>			Skupno število razgradenj na minuto*
<b>H</b>	0,30 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub>			0,60 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub>			1,0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub>			3,0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub>			

[<sup>3</sup>H] E<sub>2</sub>: [<sup>3</sup>H]-17β-estradiol.

ER: estrogenski receptor.

E<sub>2</sub>: neoznačen 17β-estradiol.

dpms: razgradnje na minuto

\* Vroče serijske razredčine [<sup>3</sup>H]-označenega estradiola je treba v tem primeru neposredno dodati v 200 µl scintilacijske tekočine v jamicah G1–H12.

23. Meritev se mora začeti z najmanj dvournim zamikom, čas štetja pa mora biti 40 minut na jamico. Za določitev razgradnje na minuto/jamico s korekcijo pojenjanja je treba uporabiti scintilacijski števec za mikrotitrsko ploščo. Če ni na voljo, se lahko vzorci izmerijo v običajnem števcu. V teh pogojih se lahko razmisli o skrajšanju časa štetja.

## Preskus kompetitivne vezave

24. S preskusom kompetitivne vezave se meri vezava ene same koncentracije [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola ob prisotnosti naraščajočih koncentracij preskusne kemikalije. Za vsako koncentracijo je treba pri eni ponovitvi uporabiti tri sočasne ponovljene vzorce. Poleg tega je treba za vsako kemikalijo, ki se preskuša, izvesti tri nesočasne ponovitve. Preskus je treba zasnovati na eni ali več 96-jamičnih mikrotitrskih ploščah.

### *Kontrole*

25. Pri izvajanju preskusa je treba v vsak poskus sočasno vključiti topilo in kontrole (tj. referenčni estrogen, snov, ki se veže šibko, in snov, ki se ne veže). Na eni plošči je treba med vsako ponovitvijo uporabiti celotne krivulje koncentracije za referenčni estrogen in kontrole (tj. snov, ki se veže šibko, in snov, ki se ne veže). Vse druge plošče morajo vsebovati (i) visoko (največje izpodrinjenje) in srednjo (približno IC<sub>50</sub>) koncentracijo vsakega od E2 in snovi, ki se veže šibko, v treh ponovitvah; (ii) kontrolo s topilom in nespecifično vezavo, vsako v vsaj treh ponovitvah. Postopki za pripravo analiznega puфра, kontrol, [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola, hrERα in raztopin preskusne kemikalije so opisani v sklicu 2 (Priloga K, glej protokol preskusa FW).

### *Kontrola s topilom:*

26. Kontrola s topilom pokaže, da topilo ne reagira s preskusnim sistemom, in poleg tega meri celotno vezavo (TB). Priporočeno topilo je etanol. Če pa najvišja koncentracija preskusne kemikalije ni topna v etanolu, se lahko uporabi DMSO. Koncentracija etanola ali DMSO (če se uporabi) v končnih preskusnih jamicah je 1,5-odstotna in ne sme presežati 2 %.

### *Kontrola s pufrom:*

27. Kontrola s pufrom (BC) ne sme vsebovati niti topila niti preskusne kemikalije, pač pa mora vsebovati vse druge elemente preskusa. Rezultati kontrole s pufrom se primerjajo s kontrolo s topilom, da se potrdi, da uporabljeno topilo ne vpliva na preskusni sistem.

### *Snov, ki se veže močno (referenčni estrogen)*

28. 17β-estradiol (CAS 50-28-2) je endogeni ligand in se z visoko afiniteto veže na ER, podtip alfa. Za vsak preskus kompetitivne vezave na hrERα je treba z uporabo neoznačenega 17β-estradiola pripraviti standardno krivuljo, da se omogoči ocena variabilnosti, ko se preskus v daljšem časovnem obdobju izvaja v istem laboratoriju. Osem raztopin neoznačenega 17β-estradiola je treba pripraviti v etanolu, pri čemer koncentracije v preskusnih jamicah segajo od 100 nM do 10 pM (od -7[logM] do -11[logM]), razporejene pa so tako: (-7[logM], -8[logM], -8,5[logM], -9[logM], -9,5[logM], -10[logM], -11[logM]). Najvišja koncentracija neoznačenega 17β-estradiola (1 μM) se uporabi tudi kot indikator nespecifične vezave. Ta koncentracija je v preglednici 4 označena kot ‚NSB‘, čeprav je tudi del standardne krivulje.

### *Snov, ki se veže šibko*

29. Vključiti je treba snov, ki se veže šibko (noretinodrel (CAS68-23-5) ali noretindron (CAS 68-22-4)), da se dokaže občutljivost vsakega poskusa in omogoči ocena variabilnosti pri izvajanju preskusa v daljšem časovnem obdobju. Osem raztopin snovi, ki se veže šibko, je treba pripraviti v etanolu, pri čemer koncentracije v preskusnih jamicah segajo od 3 nM do 30  $\mu$ M (od  $-8,5[\log M]$  do  $-4,5[\log M]$ ), razporejene pa so tako:  $-4,5[\log M]$ ,  $-5[\log M]$ ,  $-5,5[\log M]$ ,  $-6[\log M]$ ,  $-6,5[\log M]$ ,  $-7[\log M]$ ,  $-7,5[\log M]$ ,  $-8,5[\log M]$ .

*Snov, ki se ne veže*

30. Kot negativno kontrolo (snov, ki se ne veže) je treba uporabiti oktiltrietoksisilan (OTES, CAS 2943-75-1). Ta zagotavlja, da se s preskusom, kot je izveden, zazna, kdaj se preskusne kemikalije ne vežejo na hrER $\alpha$ . Osem raztopin snovi, ki se ne veže, je treba pripraviti v etanolu, pri čemer koncentracije v preskusnih jamicah segajo od 0,1 nM do 1 000  $\mu$ M (od  $-10[\log M]$  do  $-3[\log M]$ ), tako da logaritemsko naraščajo. Kot nadomestna kontrolna snov, ki se ne veže, se lahko uporabi di-*n*-butil ftalat (DBP). Njegova največja topnost dokazano znaša  $-4[\log M]$ .

*Koncentracija hrER $\alpha$*

31. Uporabiti je treba količino receptorja, ki daje  $20 \pm 5$  % specifične vezave 1 nM radioaktivno označenega liganda (glej odstavka 12 in 13 Dodatka 2). Raztopino hrER $\alpha$  je treba pripraviti neposredno pred uporabo.

*[<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -estradiol*

32. Koncentracija [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -estradiola v preskusnih jamicah mora znašati 1,0 nM.

*Preskusne kemikalije*

33. Najprej je treba izvesti preskus topnosti, da se določi meja topnosti za vsako preskusno kemikalijo in opredeli ustrezno območje koncentracije, ki se uporabi pri izvajanju preskusnega protokola. Mejo topnosti vsake preskusne kemikalije je treba najprej določiti v topilu in nato dodatno potrditi v pogojih preskusa. Končna koncentracija, preskušena v preskusu, ne sme presegati 1 mM. Preskušanje z določanjem območja sestavljajo kontrola s topilom in osem logaritemskih zaporednih razredčin, ki se začnejo pri najvišji dopustni koncentraciji (npr. 1 mM ali manj, odvisno od meje topnosti), ter evidentiranje morebitne motnosti ali oborine (glej tudi odstavek 35). Preskusno kemikalijo je treba preskusiti z uporabo osmih logaritemskih krivulj, ki se med seboj razlikujejo glede na koncentracijo, kot je opredeljeno s predhodnim preskusom za določanje območja. Koncentracije pri drugem in tretjem poskusu je treba ustrezno prilagoditi, da se bolje izrazi krivulja odziva na koncentracijo.

34. Razredčine preskusne kemikalije je treba pripraviti v ustreznem topilu (glej odstavek 26 Dodatka 2). Če najvišja koncentracija preskusne kemikalije ni topna niti v etanolu niti v DMSO, z dodajanjem več topila pa bi koncentracija topila v končni epruveti presegala dopustno mejo, se lahko najvišja koncentracija zniža na naslednjo nižjo koncentracijo. V

tem primeru se lahko dodatna koncentracija doda na spodnjem koncu niza koncentracij. Preostale koncentracije v nizu morajo ostati nespremenjene.

35. Raztopine preskusne kemikalije je treba ob dodajanju v preskusno jamico pazljivo spremljati, saj lahko preskusna kemikalija ob dodajanju v preskusno jamico obori. Podatke za vse jamice, ki vsebujejo oborino, je treba izključiti iz prileganja krivulje in navesti razlog za izključitev.
36. Če obstajajo predhodne informacije iz drugih virov, ki zagotavljajo  $\log(\text{IC}_{50})$  preskusne kemikalije, je morda ustrezno, da se razredčine razporedijo geometrično (tj. 0,5 logaritemske enote okrog pričakovanega  $\log(\text{IC}_{50})$ ). V končnem rezultatu je treba upoštevati zadostno razpršenost koncentracij na obe strani  $\log(\text{IC}_{50})$ , vključno z zgornjo in spodnjo stranjo, tako da je mogoče krivuljo vezave ustrezno opredeliti.

#### *Razporeditev na preskusni plošči*

37. Pripraviti je treba označene mikrotitrne plošče, pri tem pa upoštevati šestkratne inkubacije z oznakami za kontrolo s topilom, najvišjo koncentracijo referenčnega estrogena, ki se uporablja tudi kot indikator nespecifične vezave (NSB), in kontrolo s pufrom, tako da se upoštevajo trikratne inkubacije z oznakami za vsako od osmih koncentracij kontrole s snovjo, ki se ne veže (oktiltrietoksisilan), sedem nižjih koncentracij referenčnega estrogena, osem koncentracij velikosti odmerka snovi, ki se veže šibko, in osem koncentracij vsake preskusne kemikalije (TC). Primer razporeditve diagrama plošče za celotne krivulje koncentracije za referenčni estrogen in kontrole je naveden v preglednici 4 v nadaljevanju. Za preskusne kemikalije se uporabijo dodatne mikrotitrne plošče, ki morajo vključevati kontrole plošč, tj. (1) visoko (največje izpodrinjenje) in srednjo (približno  $\text{IC}_{50}$ ) koncentracijo vsakega od E2 in snovi, ki se veže šibko, v treh ponovitvah; (2) kontrolo s topilom in nespecifično vezavo, vsako v treh ponovitvah (preglednica 5). Primer delovnega lista z razporeditvijo na mikrotitrski plošči za kompetitivni preskus z uporabo treh neznanih preskusnih kemikalij je naveden v Dodatku 2.3. Koncentracije, navedene v preglednicah 4 in 5, so končne koncentracije preskusa. Največja koncentracija za E2 mora biti  $1 \times 10^{-7}$  M, za snov, ki se veže šibko, pa je treba uporabiti najvišjo koncentracijo, uporabljeno za snov, ki se veže šibko, na plošči 1. Koncentracijo  $\text{IC}_{50}$  mora določiti laboratorij na podlagi svoje zbirke podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov. Pričakuje se, da bo ta vrednost podobna vrednosti iz validacijskih študij (glej preglednico 1).

**Preglednica 4:** Razporeditev na mikrotitrski plošči za preskus kompetitivne vezave, celotne krivulje koncentracije za referenčni estrogen in kontrole (plošča 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	TB (samo topilo)			TB (samo topilo)			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 ( $1 \times 10^{-11}$ )			Slepi vzorec*		
<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>	Slepi vzorec (za vroče)**	Slepi vzorec (za vroče)**	Kontrola s pufrom	Kontrola s pufrom

V tem primeru je snov, ki se veže šibko, noretinodrel (NE)

\* dejanski slepi vzorec, jamica se ne uporablja;

\*\* slepi vzorec se ne uporablja med inkubacijo, temveč se uporabi za potrditev skupne dodane radioaktivnosti.

**Preglednica 5:** Razporeditev na mikrotitrski plošči za preskus kompetitivne vezave, celotne krivulje koncentracije za preskusne kemikalije in kontrole plošč

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	TB (samo topilo)			TB (samo topilo)			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 ( $IC_{50}$ )			NE ( $1 \times 10^{-4,5}$ )			E2 ( $IC_{50}$ )			E2 ( $1 \times 10^{-7}$ )		

V tem primeru je snov, ki se veže šibko, noretinodrel (NE).

#### Dokončanje preskusa kompetitivne vezave

38. Kot je prikazano v preglednici 6, je treba v jamice dodati 80  $\mu$ l kontrole s topilom, kontrole s pufrom, referenčnega estrogena, snovi, ki se veže šibko, snovi, ki se ne veže, in preskusnih kemikalij, pripravljenih v analiznem pufu. Nato je treba v vsako jamico dodati 40  $\mu$ l raztopine [ $^3$ H]-17 $\beta$ -estradiola s koncentracijo 4 nM. Po 10–15-minutnem rahlem vrtenju pri 2–8  $^{\circ}$ C je treba dodati 40  $\mu$ l raztopine hrER $\alpha$ . Preskusne mikrotitrške plošče je treba 16–20 ur inkubirati pri 2–8  $^{\circ}$ C in med inkubacijo namestiti na rotator.

**Preglednica 6:** Količina preskusnih elementov za preskus kompetitivne vezave hrER, mikrotitrške plošče

Količina ( $\mu$ l)	Sestavina
80	neoznačen 17 $\beta$ -estradiol, noretinodrel, OTEs, preskusne kemikalije, topilo ali pufer
40	raztopina [ $^3$ H]-17 $\beta$ -estradiola s koncentracijo 4 nM
40	raztopina hrER $\alpha$ , koncentracija, kot je določena

39. Nato je treba izvesti kvantifikacijo [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola, vezanega na hrERα, po ločitvi [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola, vezanega na hrERα, od prostega [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola, tako da se v vsako jamico doda 80 μl hladne raztopine DCC, kot je v odstavkih 20–23 opisano za preskus vezave z nasičenjem.
40. Jamice H1–6 (v preglednici 4 opredeljene kot slepi vzorec (za vroče)) predstavljajo razgradnje na minuto [<sup>3</sup>H]-označenega-estradiola v 40 μl. 40 μl alikvota je treba dodati neposredno scintilacijski tekočini v jamicah H1–H6.

### Merila za sprejemljivost

#### *Preskus vezave z nasičenjem*

41. Krivulja specifične vezave mora doseči stacionarno stanje, ko se uporabijo naraščajoče koncentracije [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola, kar kaže na nasičenje hrERα z ligandom.
42. Specifična vezava pri [3H]-17β-estradiolu s koncentracijo 1 nM mora biti znotraj sprejemljivega razpona 15–25 % povprečne izmerjene skupne radioaktivnosti, dodane med ponovitvami. Občasni rahli odmiki od tega razpona so dopustni, če pa so ponovitve stalno zunaj tega razpona ali je posamezna ponovitev precej zunaj tega razpona, je treba koncentracijo proteina prilagoditi in preskus z nasičenjem ponoviti.
43. Podatki morajo dati linearen Scatchardov diagram.
44. Nespecifična vezava ne sme biti prevelika. Vrednost za nespecifično vezavo mora običajno znašati < 35 % celotne vezave. Če se meri zelo nizka razgradnja na minuto za najnižjo koncentracijo radioaktivno označenega preskušene 17β-estradiola, pa lahko količnik to mejno vrednost občasno preseže.

#### *Preskus kompetitivne vezave*

45. Naraščajoče koncentracije neoznačenega 17β-estradiola morajo izpodriniti [<sup>3</sup>H]-17β-estradiol z receptorja na način, ki je skladen s kompetitivno vezavo na eno mesto.
46. Vrednost IC<sub>50</sub> za referenčni estrogen (tj. 17β-estradiol) mora biti približno enaka molski koncentraciji [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola in K<sub>d</sub>, ki se določi na podlagi preskusa vezave z nasičenjem.
47. Celotna specifična vezava mora biti dosledno znotraj sprejemljivega razpona 20 ± 5 %, če je povprečna izmerjena koncentracija skupne radioaktivnosti, dodane vsaki jamici, v različnih ponovitvah znašala 1 nM. Občasni rahli odmiki od tega razpona so dopustni, če pa so ponovitve stalno zunaj tega razpona ali je posamezna ponovitev precej zunaj tega razpona, je treba koncentracijo proteina prilagoditi.

48. Topilo ne sme spremeniti občutljivosti ali obnovljivosti preskusa. Rezultati kontrole s topilom (jamice TB) se primerjajo s kontrolo s pufrom, da se potrdi, da uporabljeno topilo ne vpliva na preskusni sistem. Če ni učinkov topila na preskus, morajo biti rezultati TB in kontrole s pufrom primerljivi.
49. Snov, ki se ne veže, ne sme izpodriniti več kot 25 % [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola s hrERα, ko se preskusi do 10<sup>-3</sup> M (OTES) ali 10<sup>-4</sup> M (DBP).
50. Merila za učinkovitost so bila razvita za referenčni estrogen in dve snovi, ki se vežeta šibko (npr. noretinodrel, noretindron), pri čemer so bili uporabljeni podatki iz validacijske študije preskusa vezave hrER FW (Priloga N k viru 2). Za vse kontrolne ponovitve v laboratorijih, ki sodelujejo v validacijski študiji, so za srednjo vrednost (n) +/- standardni odklon določeni 95-odstotni intervali zaupanja. 95-odstotni intervali zaupanja so bili izračunani za parametre prileganja krivulje (tj. vrh, dno, Hillov naklon, logIC<sub>50</sub>) za referenčni estrogen in snovi, ki se vežejo šibko, ter za log<sub>10</sub>RBA snovi, ki se vežejo šibko, glede na referenčni estrogen, določeni pa so kot merila za učinkovitost za pozitivne kontrole. V preglednici 1 so določeni pričakovani razponi za parametre prileganja krivulje, ki se lahko uporabijo kot merila za učinkovitost. V praksi se lahko razpon IC<sub>50</sub> nekoliko razlikuje, odvisno od Kd pripravka receptorja in koncentracije liganda.
51. Zaradi najrazličnejših obstoječih potencialnih preskusnih kemikalij ter razlik v potencialnih afinitetah in rezultatih (npr. celotna krivulja, delna krivulja, brez prileganja krivulje) pa niso bila razvita merila za učinkovitost za parametre prileganja krivulje za preskusne kemikalije. Vendar je treba pri pregledu rezultatov iz vsake ponovitve za preskusno kemikalijo uporabiti strokovno presojo. Uporabiti je treba dovolj veliko območje koncentracij preskusne kemikalije, da se jasno opredeli vrh (npr. 90–100 % vezave) kompetitivne krivulje. Variabilnost med ponovljenimi vzorci pri vsaki koncentraciji preskusne kemikalije in med tremi nesočasnimi ponovitvami mora biti mogoče razumno in znanstveno utemeljiti. Kontrole iz vsake ponovitve za preskusno kemikalijo se morajo približati meritvam učinkovitosti, sporočenim za ta preskus FW, in se ujemati s podatki zadevnega laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov.

## **ANALIZA PODATKOV**

### **Preskus vezave z nasičenjem**

52. Izmerita se celotna vezava in nespecifična vezava. Iz teh vrednosti se izračuna specifična vezava naraščajočih koncentracij [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola v pogojih stacionarnega stanja, tako da se nespecifična vezava odšteje od celotne vezave. Graf specifične vezave v odvisnosti od koncentracije [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola mora doseči stacionarno stanje za največjo specifično vezavo, značilno za nasičenje hrERα z [<sup>3</sup>H]-17β-estradiolom. Poleg tega je treba v analizi podatkov dokumentirati vezavo [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola na eno samo vezavno mesto z visoko afiniteto. Na krivulji vezave z nasičenjem morajo biti prikazane nespecifična, celotna in specifična vezava. Pri nadaljnji analizi teh podatkov je treba uporabiti analizo nelinearne

regresije (npr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) s končnim prikazom podatkov v obliki Scatchardovega diagrama.

53. S podatkovno analizo je treba določiti Bmax in Kd zgolj na podlagi podatkov o celotni vezavi, pri čemer se domneva, da je nespecifična vezava linearna, razen če se utemelji uporaba druge metode. Poleg tega je treba pri določanju najboljšega prileganja uporabiti robustno regresijo, razen če se poda utemeljitev. Navesti je treba izbrano metodo za robustno regresijo. Pri določanju Bmax in Kd na podlagi podatkov o vezavi z nasičenjem je treba vedno uporabiti popravek zaradi izgube liganda (npr. z uporabo metode po Swillensu, 1995).

### **Preskus kompetitivne vezave**

54. Krivulja kompetitivne vezave se izriše kot specifična vezava [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola v odvisnosti od koncentracije (enote log<sub>10</sub>) kompetitorja. Koncentracija preskusne kemikalije, ki inhibira 50 % največje specifične vezave [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola, je vrednost IC<sub>50</sub>.
55. Ocene vrednosti log(IC<sub>50</sub>) za pozitivne kontrole (npr. referenčni estrogen in snov, ki se veže šibko) je treba določiti z uporabo ustrezne programske opreme za nelinearno prileganje krivulje, da ustreza štiriparametrski Hillovi enačbi (npr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Vrh, dno, naklon in log(IC<sub>50</sub>) je treba pri prileganju teh krivulj na splošno pustiti neomejene. Pri določanju najboljšega prileganja je treba uporabiti robustno regresijo, razen če se poda utemeljitev. Popravek zaradi izgube liganda se ne sme uporabiti. Po začetni analizi je treba pregledati vsako krivuljo vezave, da se zagotovi ustrezno prileganje modelu. Relativno vezavno afiniteto (RBA) za snov, ki se veže šibko, je treba izračunati kot delež log (IC<sub>50</sub>) za snov, ki se veže šibko, v odvisnosti od log (IC<sub>50</sub>) za 17β-estradiol. Rezultate iz pozitivnih kontrol in kontrole s snovjo, ki se ne veže, je treba oceniti z uporabo meril za učinkovitost preskusa iz odstavkov 45–50 tega dodatka 2.
56. Podatke za vse preskusne kemikalije je treba analizirati z uporabo stopenjskega pristopa, s čimer se zagotovi, da so podatki ustrezno analizirani in da je vsaka krivulja kompetitivne vezave ustrezno razvrščena. Priporočljivo je, da se pri vsaki ponovitvi za preskusno kemikalijo najprej izvede standardizirana podatkovna analiza, enaka tisti, ki se uporablja za kontrole z referenčnim estrogenom in snovjo, ki se veže šibko (glej odstavek 55 zgoraj). Ko je ta analiza končana, sta potrebna tehnični pregled parametrov prileganja krivulje in vizualni pregled tega, kako dobro se podatki prilegajo dobljeni krivulji kompetitivne vezave za vsako ponovitev. Med tem tehničnim pregledom so opažanja od koncentracije odvisnega zmanjšanja v deležu specifično vezanega [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola, nizka variabilnost med tehničnimi ponovljenimi vzorci pri vsaki koncentraciji kemikalije in skladnost v parametrih prileganja med tremi ponovitvami dober znak, da so bili preskus in podatkovne analize izvedeni pravilno.

### **Razlaga podatkov**

57. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za snov, ki se veže na hrER $\alpha$ , če je krivuljo vezave mogoče prilagoditi in je najnižja točka na krivulji odziva znotraj razpona podatkov pod 50 % (slika 1).

58. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za snov, ki se ne veže na hrER $\alpha$ , če:

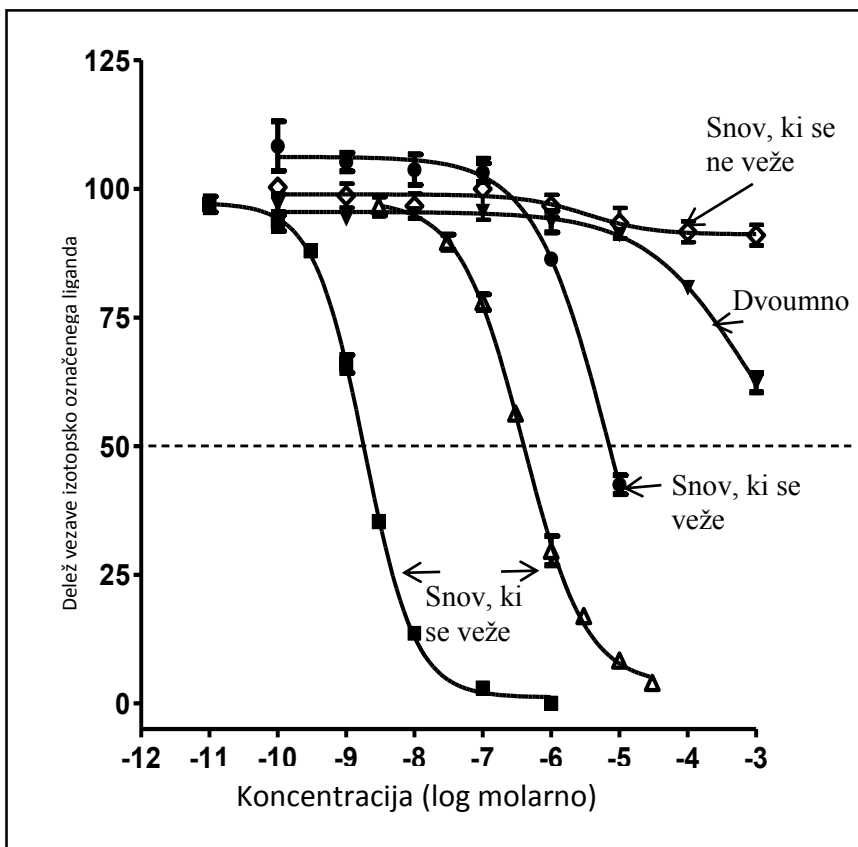
- je krivuljo vezave mogoče prilagoditi in je najnižja točka na prilagojeni krivulji odziva znotraj razpona podatkov nad 75 % ali
- krivulje vezave ni mogoče prilagoditi in je najmanjši nezglajeni povprečni delež vezave med skupinami koncentracij v podatkih nad 75 %.

59. Preskusne kemikalije se štejejo za dvoumne, če ni izpolnjen nobeden od zgoraj navedenih pogojev (npr. najnižja točka na prilagojeni krivulji odziva je med 76 % in 51 %).

**Preglednica 7:** Merila za določitev razvrstitve na podlagi krivulje kompetitivne vezave za preskusno kemikalijo

Razvrstitev	Merila
Snov, ki se veže <sup>a</sup>	Krivuljo vezave je mogoče prilagoditi. <b>Najnižja točka na krivulji odziva znotraj razpona podatkov je pod 50 %.</b>
Snov, ki se ne veže <sup>b</sup>	Če je krivuljo vezave mogoče prilagoditi, <b>je najnižja točka na prilagojeni krivulji odziva znotraj razpona podatkov nad 75 %.</b> Če krivulje vezave ni mogoče prilagoditi, <b>je najmanjši nezglajeni povprečni delež vezave med skupinami koncentracij v podatkih nad 75 %.</b>
Dvoumno <sup>c</sup>	Vsaka preskušena ponovitev, ki ni niti snov, ki se veže, niti snov, ki se ne veže (npr. najnižja točka na prilagojeni krivulji odziva je med 76 % in 51 %).

**Slika 1:** Primeri razvrstitve preskusne kemikalije z uporabo krivulje kompetitivne vezave



60. V laboratoriju izvedene večkratne ponovitve za preskusno kemikalijo se združijo, tako da se vsaki ponovitvi dodelijo številčne vrednosti in se izračuna povprečje med ponovitvami, kot je prikazano v preglednici 8. Rezultati za združene ponovitve v posameznem laboratoriju se primerjajo s pričakovano razvrstitvijo za vsako preskusno kemikalijo.

**Preglednica 8:** Metoda za razvrstitev preskusne kemikalije z uporabo večkratnih ponovitev v laboratoriju

<b>Za dodelitev vrednosti vsaki ponovitvi:</b>	
<b>Razvrstitev</b>	<b>Številčna vrednost</b>
Snov, ki se veže	2
Dvoumno	1
Snov, ki se ne veže	0
<b>Za razvrstitev povprečja številčne vrednosti med ponovitvami:</b>	
<b>Razvrstitev</b>	<b>Številčna vrednost</b>
Snov, ki se veže	povprečje $\geq 1,5$
Dvoumno	$0,5 \leq$ povprečje $< 1,5$
Snov, ki se ne veže	povprečje $< 0,5$

## **POROČILO O PRESKUSU**

61. Glej odstavek 24 v oddelku **,ELEMENTI PRESKUSA VEZAVE NA hrER‘** te preskusne metode.

## Dodatek 2.1

### SEZNAM IZRAZOV

**[<sup>3</sup>H]E2:** 17β-estradiol, radioaktivno označen s tritijem

**DCC:** oglje, prevlečeno z dekstranom

**E2:** neoznačen 17β-estradiol (inertni)

**Analizni pufer:** 10 mM Trisa, 10 mg govejega serumskega albumina/ml, 2 mM DTT, 10-odstotni glicerol, 0,2 mM leupeptina, pH 7,5

**hrERα:** človeški rekombinantni estrogenski receptor alfa (domena za vezavo liganda)

**Ponovljeni vzorec:** ena od več jamic, ki imajo enako vsebino pri enakih koncentracijah in se preskusijo sočasno v eni sami ponovitvi. V tem protokolu se vsaka koncentracija preskusne kemikalije preskusi v treh ponovitvah; to pomeni, da se pri vsaki koncentraciji preskusne kemikalije sočasno preskusijo trije ponovljeni vzorci.

**Ponovitev:** celoten nabor jamic pri sočasno izvedenem preskusu z mikrotitrsko ploščo, ki zagotavlja vse potrebne informacije za opredelitev vezave preskusne kemikalije na hrERα (tj. skupni [<sup>3</sup>H]-17β-estradiol, dodan v preskusno jamico, največja vezava [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola na hrERα, nespecifična vezava in celotna vezava pri različnih koncentracijah preskusne kemikalije). Ponovitev bi lahko sestavljala tudi ena sama preskusna jamica (tj. ponovljeni vzorec) na koncentracijo, ker pa ta protokol zahteva preskušanje v treh ponovitvah, eno ponovitev sestavljajo tri preskusne jamice na koncentracijo. Poleg tega ta protokol zahteva tri neodvisne (tj. nesočasne) ponovitve na kemikalijo.

Dodatek 2.2

**ZNAČILNI PRESKUS NASIČENJA S [<sup>3</sup>H]-17β-ESTRADIOLOM S TREMI JAMICAMI S PONOVLJENIMI VZORCI**

Značilni preskus nasičenja s [ <sup>3</sup> H]-17β-estradiolom s tremi jamicami s ponovljenimi vzorci												
Položaj	Ponovljeni vzorec	Oznaka vrste jamice	Začetna koncentracija vročega E2 (nM)	Količina vročega E2 (μl)	Končna koncentracija vročega E2 (nM)	Začetna koncentracija hladnega E2 (uM)	Količina hladnega E2 (μl)	Končna koncentracija hladnega E2 (uM)	Količina puфра (μl)	Količina receptorja (μl)	Skupna količina v jamicah	
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	

Značilni preskus nasičenja s [3H]-17 $\beta$ -estradiolom s tremi jamicami s ponovljenimi vzorci

Položaj	Ponovljeni vzorec	Oznaka vrste jamice	Začetna koncentracija vročega E2 (nM)	Količina vročega E2 ( $\mu$ l)	Končna koncentracija vročega E2 (nM)	Začetna koncentracija hladnega E2 ( $\mu$ M)	Količina hladnega E2 ( $\mu$ l)	Končna koncentracija hladnega E2 ( $\mu$ M)	Količina pufra ( $\mu$ l)	Količina receptorja ( $\mu$ l)	Skupna količina v jamicah
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	vroč	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	vroč	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	vroč	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	vroč	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	vroč	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	vroč	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	vroč	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	vroč	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	vroč	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	vroč	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	vroč	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	vroč	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
H1	1	vroč	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	vroč	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	vroč	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	vroč	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H5	2	vroč	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	vroč	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	vroč	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	vroč	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	vroč	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	vroč	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	vroč	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	vroč	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Opozoriti je treba, da so ‚vroče‘ jamice med inkubacijo prazne. 40  $\mu$ l se doda samo za scintilacijsko štetje.

### Dodatek 2.3: Razporeditev jamic za preskus kompetitivne vezave

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufra (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μL)	Količina s plošče z razredčinami (μL)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
S	A1	1	celotna vezava	TB	TB1	-	40		40	80	160	-
S	A2	2	celotna vezava	TB	TB2	-	40		40	80	160	-
S	A3	3	celotna vezava	TB	TB3	-	40		40	80	160	-
S	A4	1	celotna vezava	TB	TB4	-	40		40	80	160	-
S	A5	2	celotna vezava	TB	TB5	-	40		40	80	160	-
S	A6	3	celotna vezava	TB	TB6	-	40		40	80	160	-
S	A7	1	hladen E2 (visok)	NSB	S0	2,00E <sup>-6</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-6</sup>
S	A8	2	hladen E2 (visok)	NSB	S0	2,00E <sup>-6</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-6</sup>
S	A9	3	hladen E2 (visok)	NSB	S0	2,00E <sup>-6</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-6</sup>
S	A10	1	hladen E2 (visok)	NSB	S0	2,00E <sup>-6</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-6</sup>
S	A11	2	hladen E2 (visok)	NSB	S0	2,00E <sup>-6</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-6</sup>
S	A12	3	hladen E2 (visok)	NSB	S0	2,00E <sup>-6</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-6</sup>
S	B1	1	hladen E2	S	S1	2,00E <sup>-7</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-7</sup>
S	B2	2	hladen E2	S	S1	2,00E <sup>-7</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-7</sup>
S	B3	3	hladen E2	S	S1	2,00E <sup>-7</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-7</sup>
S	B4	1	hladen E2	S	S2	2,00E <sup>-8</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-8</sup>
S	B5	2	hladen E2	S	S2	2,00E <sup>-8</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-8</sup>
S	B6	3	hladen E2	S	S2	2,00E <sup>-8</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-8</sup>
S	B7	1	hladen E2	S	S3	6,00E <sup>-9</sup>	40	-	40	80	160	3,0E <sup>-9</sup>
S	B8	2	hladen E2	S	S3	6,00E <sup>-9</sup>	40	-	40	80	160	3,0E <sup>-9</sup>
S	B9	3	hladen E2	S	S3	6,00E <sup>-9</sup>	40	-	40	80	160	3,0E <sup>-9</sup>
S	B10	1	hladen E2	S	S4	2,00E <sup>-9</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-9</sup>
S	B11	2	hladen E2	S	S4	2,00E <sup>-9</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-9</sup>
S	B12	3	hladen E2	S	S4	2,00E <sup>-9</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-9</sup>
S	C1	1	hladen E2	S	S5	6,00E <sup>-10</sup>	40	-	40	80	160	3,0E <sup>-10</sup>
S	C2	2	hladen E2	S	S5	6,00E <sup>-10</sup>	40	-	40	80	160	3,0E <sup>-10</sup>
S	C3	3	hladen E2	S	S5	6,00E <sup>-10</sup>	40	-	40	80	160	3,0E <sup>-10</sup>
S	C4	1	hladen E2	S	S6	2,00E <sup>-10</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-10</sup>
S	C5	2	hladen E2	S	S6	2,00E <sup>-10</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-10</sup>
S	C6	3	hladen E2	S	S6	2,00E <sup>-10</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-10</sup>
S	C7	1	hladen E2	S	S7	2,00E <sup>-11</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-11</sup>
S	C8	2	hladen E2	S	S7	2,00E <sup>-11</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-11</sup>
S	C9	3	hladen E2	S	S7	2,00E <sup>-11</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-11</sup>
S	C10	1	slepi vzorec	slepi	B1	-	-	160	-	-	160	-
S	C11	2	slepi vzorec	slepi	B2	-	-	160	-	-	160	-
S	C12	3	slepi vzorec	slepi	B3	-	-	160	-	-	160	-
S	D1	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00E <sup>-5</sup>	40	-	40	80	160	3,0E <sup>-5</sup>
S	D2	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00E <sup>-5</sup>	40	-	40	80	160	3,0E <sup>-5</sup>
S	D3	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00E <sup>-5</sup>	40	-	40	80	160	3,0E <sup>-5</sup>
S	D4	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00E <sup>-5</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-5</sup>
S	D5	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00E <sup>-5</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-5</sup>
S	D6	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00E <sup>-5</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-5</sup>
S	D7	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00E <sup>-6</sup>	40	-	40	80	160	3,0E <sup>-6</sup>
S	D8	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00E <sup>-6</sup>	40	-	40	80	160	3,0E <sup>-6</sup>
S	D9	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00E <sup>-6</sup>	40	-	40	80	160	3,0E <sup>-6</sup>
S	D10	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00E <sup>-6</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-6</sup>
S	D11	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00E <sup>-6</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-6</sup>
S	D12	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00E <sup>-6</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-6</sup>

Razporeditev jamic za preskus kompetitivne vezave

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufra (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μL)	Količina s plošče z razredčinami (μL)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
S	E1	1	noretinodrel	NE	WP	6,00E <sup>-7</sup>	40		40	80	160	3,0E <sup>-7</sup>
S	E2	2	noretinodrel	NE	WP	6,00E <sup>-7</sup>	40		40	80	160	3,0E <sup>-7</sup>
S	E3	3	noretinodrel	NE	WP	6,00E <sup>-7</sup>	40		40	80	160	3,0E <sup>-7</sup>
S	E4	1	noretinodrel	NE	WP	2,00E <sup>-7</sup>	40		40	80	160	1,0E <sup>-7</sup>
S	E5	2	noretinodrel	NE	WP	2,00E <sup>-7</sup>	40		40	80	160	1,0E <sup>-7</sup>
S	E6	3	noretinodrel	NE	WP	2,00E <sup>-7</sup>	40		40	80	160	1,0E <sup>-7</sup>
S	E7	1	noretinodrel	NE	WP	6,00E <sup>-8</sup>	40	-	40	80	160	3,0E <sup>-8</sup>
S	E8	2	noretinodrel	NE	WP	6,00E <sup>-8</sup>	40	-	40	80	160	3,0E <sup>-8</sup>
S	E9	3	noretinodrel	NE	WP	6,00E <sup>-8</sup>	40	-	40	80	160	3,0E <sup>-8</sup>
S	E10	1	noretinodrel	NE	WP	6,00E <sup>-9</sup>	40	-	40	80	160	3,0E <sup>-9</sup>
S	E11	2	noretinodrel	NE	WP	6,00E <sup>-9</sup>	40	-	40	80	160	3,0E <sup>-9</sup>
S	E12	3	noretinodrel	NE	WP	6,00E <sup>-9</sup>	40	-	40	80	160	3,0E <sup>-9</sup>
S	F1	1	OTES	NE	OTES	2,00E <sup>-3</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-3</sup>
S	F2	2	OTES	NE	OTES	2,00E <sup>-3</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-3</sup>
S	F3	3	OTES	NE	OTES	2,00E <sup>-3</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-3</sup>
S	F4	1	OTES	NE	OTES	2,00E <sup>-4</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-4</sup>
S	F5	2	OTES	NE	OTES	2,00E <sup>-4</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-4</sup>
S	F6	3	OTES	NE	OTES	2,00E <sup>-4</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-4</sup>
S	F7	1	OTES	NE	OTES	2,00E <sup>-5</sup>	40	-	40	80	160	3,0E <sup>-5</sup>
S	F8	2	OTES	NE	OTES	2,00E <sup>-5</sup>	40	-	40	80	160	3,0E <sup>-5</sup>
S	F9	3	OTES	NE	OTES	2,00E <sup>-5</sup>	40	-	40	80	160	3,0E <sup>-5</sup>
S	F10	1	OTES	NE	OTES	2,00E <sup>-6</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-6</sup>
S	F11	2	OTES	NE	OTES	2,00E <sup>-6</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-6</sup>
S	F12	3	OTES	NE	OTES	2,00E <sup>-6</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-6</sup>
S	G1	1	OTES	NE	OTES	2,00E <sup>-7</sup>	40	-	40	80	160	3,0E <sup>-7</sup>
S	G2	2	OTES	NE	OTES	2,00E <sup>-7</sup>	40	-	40	80	160	3,0E <sup>-7</sup>
S	G3	3	OTES	NE	OTES	2,00E <sup>-7</sup>	40	-	40	80	160	3,0E <sup>-7</sup>
S	G4	1	OTES	NE	OTES	2,00E <sup>-8</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-8</sup>
S	G5	2	OTES	NE	OTES	2,00E <sup>-8</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-8</sup>
S	G6	3	OTES	NE	OTES	2,00E <sup>-8</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-8</sup>
S	G7	1	OTES	NE	OTES	2,00E <sup>-9</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-9</sup>
S	G8	2	OTES	NE	OTES	2,00E <sup>-9</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-9</sup>
S	G9	3	OTES	NE	OTES	2,00E <sup>-9</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-9</sup>
S	G10	1	OTES	NE	OTES	2,00E <sup>-10</sup>	40	-	40	-	160	1,0E <sup>-10</sup>
S	G11	2	OTES	NE	OTES	2,00E <sup>-10</sup>	40	-	40	-	160	1,0E <sup>-10</sup>
S	G12	3	OTES	NE	OTES	2,00E <sup>-10</sup>	40	-	40	-	160	1,0E <sup>-10</sup>
S	H1	1	vroč	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H2	1	vroč	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H3	1	vroč	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H4	1	vroč	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H5	1	vroč	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H6	1	vroč	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H7	1	kontrola s pufrom	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H8	1	kontrola s pufrom	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H9	1	kontrola s pufrom	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H10	1	kontrola s pufrom	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H11	1	kontrola s pufrom	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H12	1	kontrola s pufrom	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-

Opozoriti je treba, da so ,vroč' jamice med inkubacijo prazne. 40 μl se doda samo za scintilacijsko štetje.

**Razporeditev jamic za preskus kompetitivne vezave**

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufra (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μL)	Količina na plošči z razredčinami (μl)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
P1	A1	1	celotna vezava	TB	TBB1B1	-	40	-	40	80	160	-
P1	A2	2	celotna vezava	TB	TB2	-	40	-	40	80	160	-
P1	A3	3	celotna vezava	TB	TB3	-	40	-	40	80	160	-
P1	A4	1	celotna vezava	TB	TB4	-	40	-	40	80	160	-
P1	A5	2	celotna vezava	TB	TB5	-	40	-	40	80	160	-
P1	A6	3	celotna vezava	TB	TB6	-	40	-	40	80	160	-
P1	A7	1	hladen E2 (visok)	NSB	S0	2,00E <sup>-6</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-6</sup>
P1	A8	2	hladen E2 (visok)	NSB	S0	2,00E <sup>-6</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-6</sup>
P1	A9	3	hladen E2 (visok)	NSB	S0	2,00E <sup>-6</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-6</sup>
P1	A10	1	hladen E2 (visok)	NSB	S0	2,00E <sup>-6</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-6</sup>
P1	A11	2	hladen E2 (visok)	NSB	S0	2,00E <sup>-6</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-6</sup>
P1	A12	3	hladen E2 (visok)	NSB	S0	2,00E <sup>-6</sup>	40	-	40	80	160	1,0E <sup>-6</sup>
P1	B1	1	preskusna kemikalija 1	TC1	1	2,00E <sup>-3</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-3</sup>
P1	B2	2	preskusna kemikalija 1	TC1	1	2,00E <sup>-3</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-3</sup>
P1	B3	3	preskusna kemikalija 1	TC1	1	2,00E <sup>-3</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-3</sup>
P1	B4	1	preskusna kemikalija 1	TC1	2	2,00E <sup>-4</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-4</sup>
P1	B5	2	preskusna kemikalija 1	TC1	2	2,00E <sup>-4</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-4</sup>
P1	B6	3	preskusna kemikalija 1	TC1	2	2,00E <sup>-4</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-4</sup>
P1	B7	1	preskusna kemikalija 1	TC1	3	2,00E <sup>-5</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-5</sup>
P1	B8	2	preskusna kemikalija 1	TC1	3	2,00E <sup>-5</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-5</sup>
P1	B9	3	preskusna kemikalija 1	TC1	3	2,00E <sup>-5</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-5</sup>
P1	B10	1	preskusna kemikalija 1	TC1	4	2,00E <sup>-6</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-6</sup>
P1	B11	2	preskusna kemikalija 1	TC1	4	2,00E <sup>-6</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-6</sup>
P1	B12	3	preskusna kemikalija 1	TC1	4	2,00E <sup>-6</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-6</sup>
P1	C1	1	preskusna kemikalija 1	TC1	5	2,00E <sup>-7</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-7</sup>
P1	C2	2	preskusna kemikalija 1	TC1	5	2,00E <sup>-7</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-7</sup>
P1	C3	3	preskusna kemikalija 1	TC1	5	2,00E <sup>-7</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-7</sup>
P1	C4	1	preskusna kemikalija 1	TC1	6	2,00E <sup>-8</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-8</sup>
P1	C5	2	preskusna kemikalija 1	TC1	6	2,00E <sup>-8</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-8</sup>
P1	C6	3	preskusna kemikalija 1	TC1	6	2,00E <sup>-8</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-8</sup>
P1	C7	1	preskusna kemikalija 1	TC1	7	2,00E <sup>-9</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-9</sup>
P1	C8	2	preskusna kemikalija 1	TC1	7	2,00E <sup>-9</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-9</sup>
P1	C9	3	preskusna kemikalija 1	TC1	7	2,00E <sup>-9</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-9</sup>
P1	C10	1	preskusna kemikalija 1	TC1	8	2,00E <sup>-10</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-10</sup>
P1	C11	2	preskusna kemikalija 1	TC1	8	2,00E <sup>-10</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-10</sup>
P1	C12	3	preskusna kemikalija 1	TC1	8	2,00E <sup>-10</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-10</sup>
P1	D1	1	preskusna kemikalija 2	TC2	1	2,00E <sup>-3</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-3</sup>
P1	D2	2	preskusna kemikalija 2	TC2	1	2,00E <sup>-3</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-3</sup>
P1	D3	3	preskusna kemikalija 2	TC2	1	2,00E <sup>-3</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-3</sup>
P1	D4	1	preskusna kemikalija 2	TC2	2	2,00E <sup>-4</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-4</sup>
P1	D5	2	preskusna kemikalija 2	TC2	2	2,00E <sup>-4</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-4</sup>
P1	D6	3	preskusna kemikalija 2	TC2	2	2,00E <sup>-4</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-4</sup>
P1	D7	1	preskusna kemikalija 2	TC2	3	2,00E <sup>-5</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-5</sup>
P1	D8	2	preskusna kemikalija 2	TC2	3	2,00E <sup>-5</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-5</sup>
P1	D9	3	preskusna kemikalija 2	TC2	3	2,00E <sup>-5</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-5</sup>
P1	D10	1	preskusna kemikalija 2	TC2	4	2,00E <sup>-6</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-6</sup>
P1	D11	2	preskusna kemikalija 2	TC2	4	2,00E <sup>-6</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-6</sup>
P1	D12	3	preskusna kemikalija 2	TC2	4	2,00E <sup>-6</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-6</sup>
P1	E1	1	preskusna kemikalija 2	TC2	5	2,00E <sup>-7</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-7</sup>
P1	E2	2	preskusna kemikalija 2	TC2	5	2,00E <sup>-7</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-7</sup>
P1	E3	3	preskusna kemikalija 2	TC2	5	2,00E <sup>-7</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-7</sup>

**Razporeditev jamic za preskus kompetitivne vezave**

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hr-ER ( $\mu$ l)	Količina pufra ( $\mu$ l)	Količina sledila (vroč E2) ( $\mu$ L)	Količina na plošči z razredčinami ( $\mu$ l)	Končna količina ( $\mu$ l)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
P1	E4	1	preskusna kemikalija 2	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-8</sup>
P1	E5	2	preskusna kemikalija 2	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-8</sup>
P1	E6	3	preskusna kemikalija 2	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-8</sup>
P1	E7	1	preskusna kemikalija 2	TC2	7	2,00E <sup>-6</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-9</sup>
P1	E8	2	preskusna kemikalija 2	TC2	7	2,00E <sup>-6</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-9</sup>
P1	E9	3	preskusna kemikalija 2	TC2	7	2,00E <sup>-6</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-9</sup>
P1	E10	1	preskusna kemikalija 2	TC2	8	2,00E <sup>-6</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-10</sup>
P1	E11	2	preskusna kemikalija 2	TC2	8	2,00E <sup>-6</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-10</sup>
P1	E12	3	preskusna kemikalija 2	TC2	8	2,00E <sup>-6</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-10</sup>
P1	F1	1	preskusna kemikalija 3	TC3	1	2,00E <sup>-3</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-3</sup>
P1	F2	2	preskusna kemikalija 3	TC3	1	2,00E <sup>-3</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-3</sup>
P1	F3	3	preskusna kemikalija 3	TC3	1	2,00E <sup>-3</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-3</sup>
P1	F4	1	preskusna kemikalija 3	TC3	2	2,00E <sup>-4</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-4</sup>
P1	F5	2	preskusna kemikalija 3	TC3	2	2,00E <sup>-4</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-4</sup>
P1	F6	3	preskusna kemikalija 3	TC3	2	2,00E <sup>-4</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-4</sup>
P1	F7	1	preskusna kemikalija 3	TC3	3	2,00E <sup>-5</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-5</sup>
P1	F8	2	preskusna kemikalija 3	TC3	3	2,00E <sup>-5</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-5</sup>
P1	F9	3	preskusna kemikalija 3	TC3	3	2,00E <sup>-5</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-5</sup>
P1	F10	1	preskusna kemikalija 3	TC3	4	2,00E <sup>-6</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-6</sup>
P1	F11	2	preskusna kemikalija 3	TC3	4	2,00E <sup>-6</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-6</sup>
P1	F12	3	preskusna kemikalija 3	TC3	4	2,00E <sup>-6</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-6</sup>
P1	G1	1	preskusna kemikalija 3	TC3	5	2,00E <sup>-7</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-7</sup>
P1	G2	2	preskusna kemikalija 3	TC3	5	2,00E <sup>-7</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-7</sup>
P1	G3	3	preskusna kemikalija 3	TC3	5	2,00E <sup>-7</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-7</sup>
P1	G4	1	preskusna kemikalija 3	TC3	6	2,00E <sup>-8</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-8</sup>
P1	G5	2	preskusna kemikalija 3	TC3	6	2,00E <sup>-8</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-8</sup>
P1	G6	3	preskusna kemikalija 3	TC3	6	2,00E <sup>-8</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-8</sup>
P1	G7	1	preskusna kemikalija 3	TC3	7	2,00E <sup>-9</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-9</sup>
P1	G8	2	preskusna kemikalija 3	TC3	7	2,00E <sup>-9</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-9</sup>
P1	G9	3	preskusna kemikalija 3	TC3	7	2,00E <sup>-9</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-9</sup>
P1	G10	1	preskusna kemikalija 3	TC3	8	2,00E <sup>-10</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-10</sup>
P1	G11	2	preskusna kemikalija 3	TC3	8	2,00E <sup>-10</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-10</sup>
P1	G12	3	preskusna kemikalija 3	TC3	8	2,00E <sup>-10</sup>	40	0	40	80	160	1,0E <sup>-10</sup>
P1	H1	1	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	noretinodrel	NE		1,00E <sup>-4,5</sup>	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	noretinodrel	NE		1,00E <sup>-4,5</sup>	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	noretinodrel	NE		1,00E <sup>-4,5</sup>	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	hladen E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	hladen E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	hladen E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	hladen E2 S			1,00E <sup>-7</sup>	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	hladen E2 S			1,00E <sup>-7</sup>	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	hladen E2 S			1,00E <sup>-7</sup>	40	0	40	80	160	

### Dodatek 3

## **IN VITRO PRESKUS VEZAVE NA ESTROGENSKE RECEPTORJE Z UPORABO ČLOVEŠKEGA REKOMBINANTNEGA PROTEINA ERA Z DOMENO ZA VEZAVO LIGANDOV INSTITUTA CERi (CHEMICAL EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTE)**

### **ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)**

1. Pri tem *in vitro* preskusu vezave z nasičenjem in kompetitivne vezave na estrogenske receptorje (ER $\alpha$ ) se uporablja domena za vezavo liganda (LBD) človeškega ER $\alpha$  (hrER $\alpha$ ). Ta proteinski konstrukt je proizvedel japonski inštitut Chemicals Evaluation Research Institute (CERi), obstaja pa kot fuzijski protein glutation-S-transferaza (GST) in je izražen v *E. coli*. Protokol CERi je bil predmet mednarodne validacijske študije, izvedene v več laboratorijih (2), ki je dokazala njegovo ustreznost in zanesljivost za predvideni namen preskusa.
2. Ta preskus je presejalni postopek za opredelitev snovi, ki se lahko vežejo na hrER $\alpha$ . Uporablja se za določitev zmožnosti preskusne kemikalije, da tekmuje s 17 $\beta$ -estradiolom za vezavo na hrER $\alpha$ -LBD. Rezultati kvantitativne analize lahko vključujejo IC<sub>50</sub> (merilo koncentracije preskusne kemikalije, potrebne, da izpodrine polovico [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -estradiola s hrER $\alpha$ ) in relativne vezavne afinitete preskusnih kemikalij za hrER $\alpha$  v primerjavi s 17 $\beta$ -estradiolom. Za namene presejanja kemikalij lahko sprejemljivi rezultati kvalitativne analize vključujejo razvrstitve preskusnih kemikalij kot snovi, ki se vežejo na hrER $\alpha$ , snovi, ki se ne vežejo, ali dvoumne snovi na podlagi meril, opisanih za krivulje vezave.
3. Pri preskusu se uporabi radioaktivno označen ligand, zaradi katerega laboratorij potrebuje dovoljenje za radioaktivne materiale. Vsi postopki z radioizotopi in nevarnimi kemikalijami morajo potekati v skladu s predpisi in postopki, kot so opisani v nacionalni zakonodaji.
4. Pred uporabo tega preskusa za regulativne namene je treba prebrati oddelka ‚**SPLOŠNI UVOD**‘ in ‚**ELEMENTI PRESKUSA VEZAVE NA hrER**‘. Opredelitve in kratice, uporabljene v tej smernici za preskušanje, so opisane v Dodatku 1.

### **NAČELA PRESKUSA (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)**

5. S preskusom vezave na hrER $\alpha$  se meri zmožnost radioaktivno označenega liganda ([<sup>3</sup>H]17 $\beta$ -estradiol), da se veže na ER ob prisotnosti naraščajočih koncentracij preskusne kemikalije (tj. kompetitorja). Preskusne kemikalije, ki imajo visoko afiniteto do ER, tekmujejo z radioaktivno označenim ligandom pri nižji koncentraciji kot kemikalije z nižjo afiniteto do receptorja.
6. Ta preskus je sestavljen iz dveh večjih delov: poskusa vezave z nasičenjem za opredelitev parametrov interakcije receptor-ligand in nato poskusa kompetitivne vezave ER, za

katerega je značilno tekmovanje med preskusno kemikalijo in radioaktivno označenim ligandom za vezavo na ER.

7. Namen poskusa vezave z nasičenjem je opredeliti določeno serijo receptorjev za vezavno afiniteto in število vezav kot pripravo na poskus kompetitivne vezave. S poskusom vezave z nasičenjem se v pogojih stacionarnega stanja merita afiniteta stalne koncentracije estrogenskega receptorja do njegovega naravnega liganda (ki jo predstavlja disociacijska konstanta,  $K_d$ ) in koncentracija aktivnih receptorskih mest ( $B_{max}$ ).
8. S poskusom kompetitivne vezave se meri afiniteta snovi, da tekmuje s [ $^3H$ ]17 $\beta$ -estradiolom za vezavo na ER. Afiniteta je kvantificirana s koncentracijo preskusne kemikalije, ki v stacionarnem stanju inhibira 50 % specifične vezave [ $^3H$ ]17 $\beta$ -estradiola (tako imenovana inhibicijska koncentracija 50 % ali  $IC_{50}$ ). To se lahko oceni tudi na podlagi relativne vezavne afinitete (RBA glede na  $IC_{50}$  estradiola, merjeno ločeno v isti ponovitvi). S poskusom kompetitivne vezave se meri vezava [ $^3H$ ]17 $\beta$ -estradiola pri stalni koncentraciji v prisotnosti širokega razpona (osem redov velikosti) koncentracij preskusne kemikalije. Če je mogoče, se nato podatki prilagodijo obliki Hillove enačbe (Hill, 1910), ki opisuje izpodrinjenje radioaktivno označenega liganda s kompetitivno snovjo, ki se veže na eno mesto. Glede na obseg izpodrinjenja radioaktivno označenega estradiola v stacionarnem stanju se preskusna kemikalija opredeli kot snov, ki se veže, snov, ki se ne veže, ali snov, ki povzroči dvoumen odziv.

## POSTOPEK

### Dokazovanje sprejemljive učinkovitosti proteina hrER $\alpha$

9. Pred rednim izvajanjem preskusov vezave z nasičenjem in kompetitivne vezave je treba za vsako novo serijo hrER $\alpha$  dokazati pravilno delovanje v laboratoriju, v katerem bo uporabljena. Za dokaz učinkovitosti je treba uporabiti postopek v dveh korakih. Ta koraka sta naslednja:
  - izvedite preskus vezave z nasičenjem [ $^3H$ ]-17 $\beta$ -estradiola, da dokažete specifičnost in nasičenje hrER $\alpha$ . Analiza teh podatkov z nelinearno regresijo (npr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) in dobljeni Scatchardov diagram morata dokumentirati vezavno afiniteto hrER $\alpha$  [ $^3H$ ]-17 $\beta$ -estradiola ( $K_d$ ) in število receptorjev ( $B_{max}$ ) za določeno serijo hrER $\alpha$ ;
  - izvedite preskus kompetitivne vezave z uporabo kontrolnih snovi (referenčnega estrogena (17 $\beta$ -estradiola), snovi, ki se veže šibko (npr. noretinodrela ali noretindrona), in snovi, ki se ne veže (oktiltrietoksisilana, OTES). Vsak laboratorij mora vzpostaviti zbirko podatkov iz preteklih preskusov, da dokumentira skladnost  $IC_{50}$  in ustreznih vrednosti za referenčni estrogen in snov, ki se veže šibko, med poskusi in različnimi serijami hrER $\alpha$ . Poleg tega morajo biti parametri krivulj kompetitivne vezave za kontrolne snovi v mejah 95-odstotnega intervala zaupanja (glej preglednico 1), ki so bile določene na podlagi podatkov laboratorijev, sodelujočih v validacijski študiji za ta preskus (2).



**Preglednica 1:** Merila za učinkovitost, razvita za referenčni estrogen in snov, ki se veže šibko, preskus vezave na hrER organizacije CERI

Snov	Parameter	Srednja vrednost <sup>a</sup>	Standardni odklon (n)	95-odstotni intervali zaupanja <sup>b</sup>	
				Spodnja meja	Zgornja meja
17β-estradiol	Vrh	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Dno	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Hillov naklon	-1,22	0,20 (70)	-1,27	-1,17
	LogIC <sub>50</sub>	-8,93	0,23 (70)	-8,98	-8,87
Noretinodrel	Vrh	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Dno	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hillov naklon	-1,04	0,21 (68)	-1,09	-0,99
	LogIC <sub>50</sub>	-6,19	0,40 (68)	-6,29	-6,10
Noretindron <sup>c</sup>	Vrh	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Dno	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hillov naklon	-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> Srednja vrednost ± standardni odklon (SD) z velikostjo vzorca (n) sta bila izračunana na podlagi ocen prileganja krivulj (4-parametrski Hillovi enačbi) za kontrolne ponovitve, izvedene v štirih laboratorijih med validacijsko študijo (glej Prilogo N k viru 2).

<sup>b</sup> Pri merilih za sprejemljivost so kot vodilo navedeni 95-odstotni intervali zaupanja.

<sup>c</sup> Preskušanje noretindrona za podnalogo 4 med validacijsko študijo ni bilo obvezno (glej vir 2, podnaloga 4). Tako sta bila srednja vrednost ± standardni odklon (SD) (n) izračunana na podlagi ocen prileganja krivulj (4-parametrski Hillovi enačbi) za kontrolne ponovitve, izvedene v dveh laboratorijih.

Razpon IC<sub>50</sub> je odvisen od Kd pripravka receptorja in koncentracije radioaktivno označenega liganda, uporabljenih v vsakem laboratoriju. Dopustna je ustreznost prilagoditev razpona IC<sub>50</sub> na podlagi pogojev, uporabljenih za izvedbo preskusa.

## Dokazovanje usposobljenosti laboratorija

10. Glej odstavka 17 in 18 ter preglednico 2 v oddelku ‚ELEMENTI PRESKUSA VEZAVE NA hrER‘ te preskusne metode. Vsak preskus (vezava z nasičenjem in kompetitivna vezava) morajo sestavljati tri neodvisne ponovitve (tj. s svežimi razredčinami receptorja, kemikalij in reagentov) na različne dneve, vsaka ponovitev pa mora vsebovati tri ponovljene vzorce.

## Določitev koncentracije receptorja (hrERα)

11. Koncentracija aktivnega receptorja se nekoliko razlikuje glede na serijo in pogoje shranjevanja. Iz tega razloga je treba določiti koncentracijo aktivnega receptorja, kot se prejme od dobavitelja. Tako se dobi ustrezna koncentracija aktivnega receptorja ob ponovitvi.

12. V pogojih, ki ustrezajo kompetitivni vezavi (tj. 0,5 nM [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola), je treba nominalne koncentracije 0,1, 0,2, 0,4 in 0,6 nM receptorja inkubirati v odsotnosti (celotna vezava) in prisotnosti (nespecifična vezava) 1 μM neoznačenega estradiola. Specifična

vezava, izračunana kot razlika med celotno in nespecifično vezavo, se grafično prikaže v odvisnosti od nominalne koncentracije receptorja. Koncentracija receptorja, pri kateri vrednosti specifične vezave ustrezajo 40 % dodanega izotopskega označevalca, se poveže z ustrežno koncentracijo receptorja, in to koncentracijo receptorja je treba uporabiti za poskuse vezave z nasičenjem in kompetitivne vezave. Pogosto temu pogoju ustreza končna koncentracija hrER, ki znaša 0,2 nM.

13. Če merila 40 % večkrat ni mogoče izpolniti, je treba preveriti morebitne napake v zasnovi poskusa. Neizpolnitev merila 40 % lahko nakazuje, da je v rekombinantni seriji zelo malo aktivnega receptorja, zato je treba razmisliti o uporabi druge serije receptorja.

### **Preskus z nasičenjem**

14. Osem naraščajočih koncentracij [<sup>3</sup>H]17β-estradiola je treba oceniti v treh ponovitvah v naslednjih treh pogojih (glej preglednico 2):
  - a. v odsotnosti neoznačenega 17β-estradiola in prisotnosti ER. To je določitev celotne vezave z merjenjem radioaktivnosti v jamicah, v katerih je samo [<sup>3</sup>H]17β-estradiol;
  - b. v prisotnosti 2 000-kratne presežne koncentracije neoznačenega 17β-estradiola v primerjavi z označenim 17β-estradiolom in prisotnosti ER. Namen tega pogoja je nasičiti aktivna vezavna mesta z neoznačenim 17β-estradiolom in z merjenjem radioaktivnosti v jamicah določiti nespecifično vezavo. Za ves preostali vroči estradiol, ki se lahko veže na receptor, se šteje, da se veže na nespecifično mesto, saj mora biti koncentracija hladnega estradiola tako visoka, da je vezan na vsa razpoložljiva specifična mesta na receptorju;
  - c. v odsotnosti neoznačenega 17β-estradiola in odsotnosti ER (določitev skupne radioaktivnosti).

### *Priprava raztopin [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola in neoznačenega 17β-estradiola ter hrERa*

15. 40 nM raztopine [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola je treba pripraviti iz 1 μM osnovne raztopine [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola v DMSO, tako da se pri sobni temperaturi dodata DMSO (za pripravo koncentracije, ki znaša 200 nM) in analizni pufer (za pripravo koncentracije, ki znaša 40 nM). Z uporabo te raztopine s koncentracijo 40 nM se pripravijo serije razredčine [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola, ki segajo od 0,313 nM do 40 nM, z analiznim pufrom pri sobni temperaturi (kot je prikazano v vrstici 12 preglednice 2). Končne preskusne koncentracije, ki segajo od 0,0313 do 4,0 nM, se dobijo z dodajanjem 10 μl teh raztopin v zadevne preskusne jamice na 96-jamični mikrotitrski plošči (glej preglednici 2 in 3). Priprava analiznega pufra, izračun prvotne osnovne raztopine [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola na podlagi njegovega specifičnega delovanja, priprava razredčin in določitev koncentracij so podrobno opisani v protokolu CER1 (2).
16. Razredčine raztopin neoznačenega 17β-estradiola je treba pripraviti iz 1 nM osnovne raztopine 17β-estradiola z dodajanjem analiznega pufra, da se dobi osem naraščajočih

koncentracij, ki prvotno segajo od 0,625  $\mu\text{M}$  do 80  $\mu\text{M}$ . Končne preskusne koncentracije, ki segajo od 0,0625  $\mu\text{M}$  do 8  $\mu\text{M}$ , se dobijo z dodajanjem 10  $\mu\text{l}$  teh raztopin v zadevne preskusne jamice na 96-jamični mikrotitrski plošči, namenjeni meritvi nespecifične vezave (glej preglednici 2 in 3). Priprava razredčin neoznačenega 17 $\beta$ -estradiola je podrobno opisana v protokolu CER1 (2).

17. Uporabiti je treba koncentracijo receptorja, ki daje  $40 \pm 10\%$  specifične vezave (glej odstavka 12 in 13). Raztopino hrER $\alpha$  je treba pripraviti z ledeno mrzlim analiznim pufrom neposredno pred uporabo, tj. ko so pripravljene vse jamice za celotno vezavo, nespecifično vezavo in samo vroči ligand.

18. 96-jamične mikrotitrške plošče se pripravijo, kot je prikazano v preglednici 2, s tremi ponovljenimi vzorci na koncentracijo [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiola. Dodelitev količine [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiola, neoznačenega 17 $\beta$ -estradiola, pufra in receptorja je navedena v preglednici 3.

**Preglednica 2:** Razporeditev na mikrotitrski plošči za preskus vezave z nasičenjem

	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*	10	11**	12**
	Za meritev TB			Za meritev NSB			Za določitev samo vročega liganda				Razredčine neoznačenega E2 za stolpec plošče 4–6	Razredčine [ $^3\text{H}$ ]E2 za stolpec plošče 1–9
<b>A</b>	0,0313 nM [ $^3\text{H}$ ] E2 + ER			0,0313 nM [3H] E2 + 0,0625 $\mu\text{M}$ E2 + ER			0,0313 nM				0,625 $\mu\text{M}$	0,313 nM
<b>B</b>	0,0625 nM [ $^3\text{H}$ ] E2 + ER			0,0625 nM [3H] E2 + 0,125 $\mu\text{M}$ E2 + ER			0,0625 nM				1,25 $\mu\text{M}$	0,625 nM
<b>C</b>	30,125 nM [ $^3\text{H}$ ] E2 + ER			0,125 nM [3H] E2 + 0,25 $\mu\text{M}$ E2 + ER			0,125 nM				2,5 $\mu\text{M}$	1,25 nM
<b>D</b>	0,250 nM [ $^3\text{H}$ ] E2 + ER			0,250 nM [3H] E2 + 0,5 $\mu\text{M}$ E2 + ER			0,250 nM				5 $\mu\text{M}$	2,5 nM
<b>E</b>	0,50 nM [H] E2 + ER			0,50 nM [3H] E2 + 1 $\mu\text{M}$ E2 + ER			0,50 nM				10 $\mu\text{M}$	5 nM
<b>F</b>	1,00 nM [ $^3\text{H}$ ] E2 + ER			1,00 nM [3H] E2 + 2 $\mu\text{M}$ E2 + ER			1,00 nM				20 $\mu\text{M}$	10 nM
<b>G</b>	2,00 nM [ $^3\text{H}$ ] E2 + ER			2,00 nM [3H] E2 + 4 $\mu\text{M}$ E2 + ER			2,00 nM				40 $\mu\text{M}$	20 nM
<b>H</b>	4,00 nM [ $^3\text{H}$ ] E2 + ER			4,00 nM [3H] E2 + 8 $\mu\text{M}$ E2 + ER			4,00 nM				80 $\mu\text{M}$	40 nM

TB: celotna vezava.

NSB: nespecifična vezava.

[<sup>3</sup>H] E<sub>2</sub>: [<sup>3</sup>H]-17β-estradiol.

E<sub>2</sub>: neoznačen 17β-estradiol.

\* Navedene koncentracije so v tem primeru končne koncentracije v vsaki jamici.

\*\* Razredčine neoznačenega E<sub>2</sub> in [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub> se lahko pripravijo na drugi plošči.

**Preglednica 3:** Količine reagenta na mikrotitrski plošči za nasičenje

<i>Številka vrstice</i>	<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>
<b>Koraki priprave</b>		<b>Jamice za TB</b>			<b>Jamice za NSB</b>			<b>Samo vroč ligand</b>	
Količina elementov za zgornje reakcijske jamice in vrstni red dodajanja	Pufer	60 µl			50 µl			90 µl	
	neoznačen E <sub>2</sub> iz vrstice 11 v preglednici 2	–			10 µl			–	
	[ <sup>3</sup> H]E <sub>2</sub> iz vrstice 12 v preglednici 2	10 µl			10 µl			10 µl	
	hrERα	30 µl			30 µl			–	
Skupna reakcijska količina		100 µl			100 µl			100 µl	
Inkubacija		<b>REAKCIJA PO 2-URNI INKUBACIJI</b>						Kvantifikacija radioaktivnosti takoj po pripravi. Brez inkubacije	
Tretiranje z 0,4-odstotnim DCC		<b>da</b>			<b>da</b>			<b>ne</b>	
Količina 0,4-odstotnega DCC		100 µl			100 µl			–	
Filtracija		da			da			ne	
<b>MERJENJE RAZGRADENJ NA MINUTO (DPMS)</b>									
Količina za kvantifikacijo, dodana scintilacijski zmesi		100 µl**			100 µl**			50 µl	

\* Če se za merjenje dpms uporablja tekočinsko scintilacijsko štetje za mikrotitrne plošče, priprava samo vročega liganda na isti preskusni plošči z jamicami s TB in NSB ni ustrezna. Samo vroči ligand je treba pripraviti na drugi plošči.

\*\* Če se za ločevanje DCC uporabi centrifugiranje, je treba 50 µl supernatanta meriti s tekočinskim scintilacijskim štetjem, da se prepreči kontaminacija DCC.

19. Preskusne mikrotitrne plošče za določitev celotne vezave in nespecifične vezave je treba dve uri inkubirati pri sobni temperaturi (22–28 °C).

#### *Meritev [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola, vezanega na hrERα*

20. Po dvourni inkubaciji je treba [<sup>3</sup>H]-17β-estradiol, vezan na hrERα, ločiti od prostega [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola, tako da se v jamice doda 100 µl ledeno mrzle raztopine 0,4-odstotnega DCC. Plošče je treba nato za 10 minut postaviti na led, reakcijsko zmes in raztopino DCC pa filtrirati, tako da se ju prenese na filter za mikrotitrne plošče, da se odstrani DCC. Nato je treba v scintilacijsko tekočino v vialah za tekočinsko scintilacijsko štetje dodati 100 µl

filtrata, da se s tekočinskim scintilacijskim štetjem določi razgradnja na minuto (dpms) na vialo.

21. Če filter za mikrotitrsko ploščo ni na voljo, se lahko DCC odstrani tudi s centrifugiranjem. S 50 µl supernatanta, ki vsebuje na hrERα vezan [<sup>3</sup>H]-17β-estradiol, je treba ravnati nadvse previdno, da se prepreči kontaminacija jamic z dotikanjem DCC, in ga je treba uporabiti za scintilacijsko štetje.
22. Pogoj s samo vročim ligandom se uporabi za določitev razgradnje na minuto (dpm) za [<sup>3</sup>H]-17β-estradiol, dodan v preskusne jamice. Radioaktivnost je treba kvantitativno določiti takoj po pripravi. Jamice se ne smejo inkubirati in ne smejo biti tretirane z raztopino DCC, temveč je treba njihovo vsebino dodati neposredno scintilacijski tekočini. Te meritve pokažejo, koliko [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola v razgradnjah na minuto je bilo dodanega vsakemu nizu jamic za celotno vezavo in nespecifično vezavo.

### **Preskus kompetitivne vezave**

23. S preskusom kompetitivne vezave se meri vezava ene same koncentracije [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola ob prisotnosti naraščajočih koncentracij preskusne kemikalije. Za vsako koncentracijo je treba pri eni ponovitvi uporabiti tri sočasne ponovljene vzorce. Poleg tega je treba za vsako kemikalijo, ki se preskuša, izvesti tri nesočasne ponovitve. Preskus je treba zasnovati na eni ali več 96-jamičnih mikrotitrskih ploščah.

### *Kontrole*

24. Pri izvajanju preskusa je treba v vsak poskus sočasno vključiti topilo in kontrole (tj. referenčni estrogen, snov, ki se veže šibko, in snov, ki se ne veže). Na eni plošči je treba med vsako ponovitvijo uporabiti celotne krivulje koncentracije za referenčni estrogen in kontrole (tj. snov, ki se veže šibko, in snov, ki se ne veže). Vse druge plošče morajo vsebovati (i) visoko (največje izpodrinjenje, tj. približno popolno izpodrinjenje radioaktivno označenega liganda) in srednjo (približno IC<sub>50</sub>) koncentracijo E2 in snovi, ki se veže šibko, v treh ponovitvah; (ii) kontrolo s topilom in nespecifično vezavo, vsako v treh ponovitvah. Postopki za pripravo analiznega pufra, [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola, hrERα in raztopin preskusne kemikalije so podrobno opisani v protokolu CERI (2).

### *Kontrola s topilom*

25. Kontrola s topilom pokaže, da topilo ne reagira s preskusnim sistemom, in poleg tega meri celotno vezavo (TB). Priporočeno topilo je DMSO. Če pa najvišja koncentracija preskusne kemikalije ni topna v DMSO, se lahko uporabi etanol. Koncentracija DMSO v končnih preskusnih jamicah mora biti 2,05 % in se lahko v primeru premajhne topnosti preskusne kemikalije poviša na največ 2,5 %. Koncentracije DMSO nad 2,5 % se ne smejo uporabiti zaradi interference višjih koncentracij topila s preskusom. Za preskusne kemikalije, ki niso topne v DMSO, topne pa so v etanolu, se lahko brez interference v preskusu uporabi največ 2-odstotni etanol.

### *Kontrola s pufrom*

26. Kontrola s pufrom (BC) ne sme vsebovati niti topila niti preskusne kemikalije, pač pa mora vsebovati vse druge elemente preskusa. Rezultati kontrole s pufrom se primerjajo s kontrolo s topilom, da se potrdi, da uporabljeno topilo ne vpliva na preskusni sistem.

*Snov, ki se veže močno (referenčni estrogen)*

27.  $17\beta$ -estradiol (CAS 50-28-2) je endogeni ligand in se z visoko afiniteto veže na ER, podtip alfa. Za vsak preskus kompetitivne vezave na hrER $\alpha$  je treba z uporabo neoznačenega  $17\beta$ -estradiola pripraviti standardno krivuljo, da se omogoči ocena variabilnosti, ko se preskus v daljšem časovnem obdobju izvaja v istem laboratoriju. Osem raztopin neoznačenega  $17\beta$ -estradiola je treba pripraviti v DMSO in analiznem pufu, pri čemer so končne koncentracije v preskusnih jamicah, ki jih je treba uporabiti za standardno krivuljo, razporejene so tako:  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-8,5}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-9,5}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$  M. Najvišja koncentracija neoznačenega  $17\beta$ -estradiola (1  $\mu$ M) se mora uporabiti kot indikator nespecifične vezave. Ta koncentracija je v preglednici 4 označena kot ‚NSB‘, čeprav je tudi del standardne krivulje.

*Snov, ki se veže šibko*

28. Vključiti je treba snov, ki se veže šibko (noretinodrel (CAS68-23-5) ali namesto njega noretindron (CAS 68-22-4)), da se dokaže občutljivost vsakega poskusa in omogoči ocena variabilnosti pri izvajanju preskusa v daljšem časovnem obdobju. Osem raztopin snovi, ki se veže šibko, je treba pripraviti v DMSO in analiznem pufu, pri čemer končne koncentracije v preskusnih jamicah znašajo:  $10^{-4,5}$ ,  $10^{-5,5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-6,5}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-7,5}$ ,  $10^{-8}$  in  $10^{-9}$  M.

*Snov, ki se ne veže*

29. Kot negativno kontrolo (snov, ki se ne veže) je treba uporabiti oktiltrietoksisilan (OTES, CAS 2943-75-1). Ta zagotavlja, da se s preskusom, kot je izveden, zaznajo preskusne kemikalije, ki se ne vežejo na hrER $\alpha$ . Osem raztopin snovi, ki se ne veže, je treba pripraviti v DMSO in analiznem pufu, pri čemer končne koncentracije v preskusnih jamicah znašajo:  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  M. Kot nadomestna snov, ki se ne veže, se lahko uporabi di-n-butyl ftalat (DBP, CAS 84-72-2), vendar se lahko preskusi samo do koncentracije  $10^{-4}$  M. Dokazano je bilo, da največja topnost DBP v preskusu znaša  $10^{-4}$  M.

*Koncentracija hrER $\alpha$*

30. Uporabiti je treba količino receptorja, ki daje  $40 \pm 10$  % specifične vezave (glej odstavka 12 in 13 Dodatka 3). Raztopino hrER $\alpha$  je treba pripraviti z redčenjem funkcionalne hrER $\alpha$  v ledeno mrzlem analiznem pufu neposredno pred uporabo.

*[ $^3$ H]- $17\beta$ -estradiol*

31. Končna koncentracija [ $^3$ H]- $17\beta$ -estradiola v preskusnih jamicah mora znašati 0,5 nM.

*Preskusne kemikalije*

32. Najprej je treba izvesti preskus topnosti, da se določi meja topnosti za vsako preskusno kemikalijo in opredeli ustrezno območje koncentracije, ki se uporabi pri izvajanju

preskusnega protokola. Mejo topnosti vsake preskusne kemikalije je treba najprej določiti v topilu in nato dodatno potrditi v pogojih preskusa. Končna koncentracija, preskušena v preskusu, ne sme presegati 1 mM. Preskušanje z določanjem območja vključuje kontrolo s topilom in vsaj osem logaritemskih zaporednih razredčin, ki se začnejo pri najvišji dopustni koncentraciji (npr. 1 mM ali manj, odvisno od meje topnosti), ter evidentiranje morebitne motnosti ali oborine (glej tudi odstavek 35 Dodatka 3). Ko je določeno območje koncentracije za preskušanje, je treba preskusno kemikalijo preskusiti z uporabo osmih logaritemskih koncentracij v ustreznih intervalih, kot je opredeljeno s predhodnim preskusom za določanje območja. Koncentracije, preskušene pri drugem in tretjem poskusu, je treba dodatno ustrezno prilagoditi, da se bolje izrazi krivulja odziva na koncentracijo, če je potrebno.

33. Razredčine preskusne kemikalije je treba pripraviti v ustreznem topilu (glej odstavek 25 Dodatka 3). Če najvišja koncentracija preskusne kemikalije ni topna v DMSO ali etanolu, z dodajanjem več topila pa bi koncentracija topila v končni epruveti presegla dopustno mejo, se lahko najvišja koncentracija zniža na naslednjo nižjo koncentracijo. V tem primeru se lahko dodatna koncentracija doda na spodnjem koncu niza koncentracij. Preostale koncentracije v nizu morajo ostati nespremenjene.
34. Rastopine preskusne kemikalije je treba ob dodajanju v preskusno jamico pazljivo spremljati, saj lahko preskusna kemikalija ob dodajanju v preskusno jamico obori. Podatke za vse jamice, ki vsebujejo oborino, je treba izključiti iz prileganja krivulje in navesti razlog za izključitev.
35. Če obstajajo predhodne informacije iz drugih virov, ki zagotavljajo  $\log(\text{IC}_{50})$  preskusne kemikalije, je morda ustrezno, da se razredčine geometrično razporedijo bližje okrog pričakovanega  $\log(\text{IC}_{50})$  (tj. 0,5 logaritemske enote). Iz končnih rezultatov mora biti razvidna zadostna razpršenost koncentracij na obeh straneh  $\log(\text{IC}_{50})$ , vključno z zgornjo in spodnjo stranjo, tako da je mogoče ustrezno opredeliti krivuljo vezave.

#### *Razporeditev na preskusni plošči*

36. Pripraviti je treba označene mikrotitrne plošče, tako da se uporabijo šestkratne inkubacije za kontrolo s topilom, najvišja koncentracija referenčnega estrogena (E2), ki se uporablja tudi kot indikator nespecifične vezave (NSB), kontrola s pufrom, osem koncentracij kontrole s snovjo, ki se ne veže (oktiltrietoksisilan), sedem nižjih koncentracij referenčnega estrogena (E2), osem koncentracij snovi, ki se veže šibko (noretinodrel ali noretindron), in osem koncentracij vsake preskusne kemikalije (TC). Primer diagrama razporeditve na plošči za celotne krivulje koncentracije za referenčni estrogen in kontrole je naveden v preglednici 4 v nadaljevanju. Dodatne mikrotitrne plošče se uporabijo za preskusno kemikalijo in morajo vsebovati kontrole plošč, tj. (i) visoko (največje izpodrinjenje) ter srednjo (približno  $\text{IC}_{50}$ ) koncentracijo E2 in snovi, ki se veže šibko, v treh ponovitvah; (ii) kontrolo s topilom (kot celotno vezavo) in nespecifično vezavo, vsako v šestih ponovitvah (preglednica 5). Primer delovnega lista z razporeditvijo na mikrotitrski plošči za kompetitivni preskus z uporabo treh neznanih preskusnih kemikalij je naveden v Dodatku

3.3. Koncentracije, navedene na delovnem listu ter v preglednicah 4 in 5, se nanašajo na končne koncentracije, uporabljene v vsaki preskusni jamici. Največja koncentracija za E2 mora biti  $1 \times 10^{-7}$  M, za snov, ki se veže šibko, pa je treba uporabiti najvišjo koncentracijo, uporabljeno za snov, ki se veže šibko, na plošči 1. Koncentracijo IC<sub>50</sub> mora določiti laboratorij na podlagi svoje zbirke podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov. Pričakuje se, da bo ta vrednost podobna tisti iz validacijskih študij (glej preglednico 1).

**Preglednica 4:** Razporeditev na mikrotitrski plošči za preskus kompetitivne vezave<sup>1,2</sup>, celotne krivulje koncentracije za referenčni estrogen in kontrole (plošča 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Kontrola s pufrom in pozitivna kontrola (E2)			Šibka pozitivna (noretinodrel)			Negativna kontrola (OTES)			TB in NSB		
<b>A</b>	Slepi vzorec*			$1 \times 10^{-9}$ M			$1 \times 10^{-10}$ M			TB (kontrola s topilom) (2,05-odstotni DMSO)		
<b>B</b>	E2 ( $1 \times 10^{-11}$ M)			$1 \times 10^{-8}$ M			$1 \times 10^{-9}$ M					
<b>C</b>	E2 ( $1 \times 10^{-10}$ M)			$1 \times 10^{-7,5}$ M			$1 \times 10^{-8}$ M			NSB ( $10^{-6}$ M E2)		
<b>D</b>	E2 ( $1 \times 10^{-9,5}$ M)			$1 \times 10^{-7}$ M			$1 \times 10^{-7}$ M					
<b>E</b>	E2 ( $1 \times 10^{-9}$ M)			$1 \times 10^{-6,5}$ M			$1 \times 10^{-6}$ M			Kontrola s pufrom		
<b>F</b>	E2 ( $1 \times 10^{-8,5}$ M)			$1 \times 10^{-6}$ M			$1 \times 10^{-5}$ M					
<b>G</b>	E2 ( $1 \times 10^{-8}$ M)			$1 \times 10^{-5,5}$ M			$1 \times 10^{-4}$ M			Slepi vzorec (za vroče)**		
<b>H</b>	E2 ( $1 \times 10^{-7}$ M)			$1 \times 10^{-4,5}$ M			$1 \times 10^{-3}$ M					

<sup>1</sup> Priprava vzorca za mikrotitrsko ploščo s standardi, ki jo je treba uporabiti pri vsakem poskusu.

<sup>2</sup> Opozoriti je treba, da to mikrotitrsko ploščo sestavljajo razredčine, pripravljene na plošči za razredčine, opisani za standarde v prejšnjih oddelkih.

V tem primeru je snov, ki se veže šibko, noretinodrel (NE).

\* Dejanski slepi vzorec, jamica se ne uporablja.

\*\* Slepi vzorec se ne uporablja med inkubacijo, temveč se uporabi za potrditev skupne dodane radioaktivnosti.

**Preglednica 5:** Razporeditev na mikrotitrski plošči za preskus kompetitivne vezave, dodatne plošče za preskusne kemikalije (TC) in kontrole plošč

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Preskusna kemikalija-1 (TC-1)			Preskusna kemikalija-2 (TC-2)			Preskusna kemikalija-3 (TC-3)			Kontrole		
<b>A</b>	TC-1 ( $1 \times 10^{-10}$ M)			TC-2 ( $1 \times 10^{-10}$ M)			TC-3 ( $1 \times 10^{-10}$ M)			E2 ( $1 \times 10^{-7}$ M)		
<b>B</b>	TC-1 ( $1 \times 10^{-9}$ M)			TC-2 ( $1 \times 10^{-9}$ M)			TC-3 ( $1 \times 10^{-9}$ M)			E <sub>2</sub> (IC <sub>50</sub> )		

<b>C</b>	TC-1 ( $1 \times 10^{-8}$ M)	TC-2 ( $1 \times 10^{-8}$ M)	TC-3 ( $1 \times 10^{-8}$ M)	NE ( $1 \times 10^{-4,5}$ M)
<b>D</b>	TC-1 ( $1 \times 10^{-7}$ M)	TC-2 ( $1 \times 10^{-7}$ M)	TC-3 ( $1 \times 10^{-7}$ M)	NE (IC <sub>50</sub> )
<b>E</b>	TC-1 ( $1 \times 10^{-6}$ M)	TC-2 ( $1 \times 10^{-6}$ M)	TC-3 ( $1 \times 10^{-6}$ M)	NSB ( $10^{-6}$ M E <sub>2</sub> )
<b>F</b>	TC-1 ( $1 \times 10^{-5}$ M)	TC-2 ( $1 \times 10^{-5}$ M)	TC-3 ( $1 \times 10^{-5}$ M)	
<b>G</b>	TC-1 ( $1 \times 10^{-4}$ M)	TC-2 ( $1 \times 10^{-4}$ M)	TC-3 ( $1 \times 10^{-4}$ M)	TB (kontrola s topilom)
<b>H</b>	TC-1 ( $1 \times 10^{-3}$ M)	TC-2 ( $1 \times 10^{-3}$ M)	TC-3 ( $1 \times 10^{-3}$ M)	

V tem primeru je snov, ki se veže šibko, noretinodrel (NE).

#### Dokončanje preskusa kompetitivne vezave

37. Razen v jamice za celotno vezavo in slepe vzorce (za vroče), kot je prikazano v preglednici 6, je treba v vsako jamico dodati 50  $\mu$ l analiznega pufera in ga zmešati z 10  $\mu$ l kontrole s topilom, referenčnega estrogena (E<sub>2</sub>), snovi, ki se veže šibko, snovi, ki se ne veže, oziroma preskusnih kemikalij, 10  $\mu$ l raztopine [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -estradiola s koncentracijo 5 nM. Nato se na vsako ploščo doda 30  $\mu$ l ledeno mrzle receptorske raztopine in narahlo premeša. Raztopina hrER $\alpha$  mora biti zadnji dodani reagent. Preskusne mikrotitrne plošče je treba dve uri inkubirati pri sobni temperaturi (22–28 °C).

**Preglednica 6:** Količina preskusnih elementov za preskus kompetitivne vezave hrER, mikrotitrne plošče

<b>Koraki priprave po številki vrstice</b>		Jamice, razen tistih s TB	Jamice s TB	Slepi vzorec (za vroče)
Količina elementov za zgornje reakcijske jamice in vrstni red dodajanja	analizni pufer pri sobni temperaturi	50 $\mu$ l	60 $\mu$ l	90 $\mu$ l
	neoznačen E <sub>2</sub> , snov, ki se veže šibko, snov, ki se ne veže, topilo in preskusne kemikalije*	10 $\mu$ l	–	–
	[ <sup>3</sup> H]-17 $\beta$ -estradiol, da se dobi končna koncentracija 0,5 nM (tj. 5 nM)	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
	koncentracija rER $\alpha$ , kot je določena (glej odstavka 12 in 13)	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l	–
Skupna količina v vsaki preskusni jamici		100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l

\* Ustrezno pripravljeno, da se dobi končna koncentracija znotraj dopustne koncentracije topila.

38. Nato je treba izvesti kvantifikacijo [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -estradiola, vezanega na hrER $\alpha$ , po ločevanju [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -estradiola, vezanega na hrER $\alpha$ , od prostega [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -estradiola, tako da se v vsako jamico doda 100  $\mu$ l ledeno mrzle raztopine DCC, kot je opisano v odstavkih 21–23 Dodatka 3 za preskus vezave z nasičenjem.

39. Jamice G10–12 in H10–12 (v preglednici 4 opredeljene kot slepi vzorec (za vroče)) predstavljajo razgradnje na minuto [<sup>3</sup>H]-označenega-estradiola v 10  $\mu$ l. 10  $\mu$ l alikvota je treba dodati neposredno scintilacijski tekočini.

#### Merila za sprejemljivost

#### *Preskus vezave z nasičenjem*

40. Krivulja specifične vezave mora doseči stacionarno stanje, ko se uporabijo naraščajoče koncentracije [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola, kar kaže na nasičenje hrERα z ligandom.
41. Specifična vezava pri 0,5 nM [3H]-17β-estradiola mora biti znotraj sprejemljivega razpona 30–50 % povprečne izmerjene skupne radioaktivnosti, dodane med ponovitvami. Občasni rahli odmiki od tega razpona so dopustni, če pa so ponovitve stalno zunaj tega razpona ali je posamezna ponovitev precej zunaj tega razpona, je treba koncentracijo proteina prilagoditi in preskus z nasičenjem ponoviti.
42. Podatki morajo dati linearen Scatchardov diagram.
43. Nespecifična vezava ne sme biti prevelika. Vrednost za nespecifično vezavo mora običajno znašati < 35 % celotne vezave. Če se meri zelo nizka razgradnja na minuto za najnižjo koncentracijo radioaktivno označenega preskušenelega 17β-estradiola, pa lahko količnik to mejno vrednost občasno preseže.

#### *Preskus kompetitivne vezave*

44. Naraščajoče koncentracije neoznačenega 17β-estradiola morajo izpodriniti [<sup>3</sup>H]-17β-estradiol z receptorja na način, ki je skladen s kompetitivno vezavo na eno mesto.
45. Vrednost IC<sub>50</sub> za referenčni estrogen (tj. 17β-estradiol) mora biti približno enaka molski koncentraciji [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola in K<sub>d</sub>, ki se določi na podlagi preskusa vezave z nasičenjem.
46. Celotna specifična vezava mora biti dosledno znotraj sprejemljivega razpona 40 ± 10 %, če je povprečna izmerjena koncentracija skupne radioaktivnosti, dodane vsaki jamici, med ponovitvami znašala 0,5 nM. Občasni rahli odmiki od tega razpona so dopustni, če pa so ponovitve stalno zunaj tega razpona ali je posamezna ponovitev precej zunaj tega razpona, je treba koncentracijo proteina prilagoditi.
47. Topilo ne sme spremeniti občutljivosti ali obnovljivosti preskusa. Rezultati kontrole s topilom (jamice TB) se primerjajo s kontrolo s pufrom, da se potrdi, da uporabljeno topilo ne vpliva na preskusni sistem. Če ni učinkov topila na preskus, morajo biti rezultati TB in kontrole s pufrom primerljivi.
48. Snov, ki se ne veže, ne sme izpodriniti več kot 25 % [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola s hrERα, ko se preskusi do 10<sup>-3</sup> M (OTES) ali 10<sup>-4</sup> M (DBP).
49. Merila za učinkovitost so bila razvita za referenčni estrogen in dve snovi, ki se vežeta šibko (npr. noretinodrel, noretindron), pri čemer so bili uporabljeni podatki iz validacijske študije za preskus vezave na hrER organizacije CERI (Priloga N k viru 2). 95-odstotni intervali zaupanja so določeni za srednjo vrednost ± standardni odklon (SD) (n) vseh kontrolnih ponovitev v štirih laboratorijih, ki so sodelovali v validacijski študiji. Izračunani so bili za parametre prileganja krivulje (tj. vrh, dno, Hillov naklon, Log IC<sub>50</sub>) za referenčni estrogen in snovi, ki se vežejo šibko, ter log<sub>10</sub>RBA snovi, ki se vežejo šibko, glede na referenčni

estrogen. V preglednici 1 so določeni pričakovani razponi za parametre prileganja krivulje, ki se lahko uporabijo kot merila za učinkovitost. V praksi se lahko razpon  $IC_{50}$  nekoliko razlikuje, odvisno od eksperimentalno izpeljanega  $K_d$  pripravka receptorja in koncentracije liganda, ki se uporabi za preskus.

50. Zaradi najrazličnejših obstoječih potencialnih preskusnih kemikalij in razlik v potencialnih afinitetah in rezultatih (npr. celotna krivulja, delna krivulja, brez prileganja krivulje) merila učinkovitosti za parametre prileganja krivulje za preskusne kemikalije niso bila razvita. Vendar je treba pri pregledu rezultatov iz vsake ponovitve za preskusno kemikalijo uporabiti strokovno presojo. Uporabiti je treba dovolj veliko območje koncentracij preskusne kemikalije, da se jasno opredeli vrh (npr. 90–100 % vezave) kompetitivne krivulje. Variabilnost med ponovljenimi vzorci pri vsaki koncentraciji preskusne kemikalije in med tremi nesočasnimi ponovitvami mora biti mogoče razumno in znanstveno utemeljiti. Kontrole iz vsake ponovitve za preskusno kemikalijo se morajo približati meritvam učinkovitosti, sporočenim za ta preskus CERI, in biti v skladu s podatki posameznega laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov.

## **ANALIZA PODATKOV**

### **Preskus vezave z nasičenjem**

51. Izmerita se celotna vezava in nespecifična vezava. Iz teh vrednosti se izračuna specifična vezava naraščajočih koncentracij  $[^3H]$ -17 $\beta$ -estradiola v pogojih stacionarnega stanja, tako da se nespecifična vezava odšteje od celotne vezave. Graf specifične vezave v odvisnosti od koncentracije  $[^3H]$ -17 $\beta$ -estradiola mora doseči stacionarno stanje za največjo specifično vezavo, značilno za nasičenje hrER $\alpha$  z  $[^3H]$ -17 $\beta$ -estradiolom. Poleg tega je treba z analizo podatkov dokumentirati vezavo  $[^3H]$ -17 $\beta$ -estradiola na eno samo vezavno mesto z visoko afiniteto. Na krivulji vezave z nasičenjem morajo biti prikazane nespecifična, celotna in specifična vezava. Pri nadaljnji analizi teh podatkov je treba uporabiti analizo nelinearne regresije (npr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) s končnim prikazom podatkov v obliki Scatchardovega diagrama.
52. S podatkovno analizo je treba določiti  $B_{max}$  in  $K_d$  zgolj na podlagi podatkov o celotni vezavi, pri čemer se domneva, da je nespecifična vezava linearna, razen če se utemelji uporaba druge metode. Poleg tega je treba pri določanju najboljšega prileganja uporabiti robustno regresijo, razen če se poda utemeljitev. Navesti je treba izbrano metodo za robustno regresijo. Pri določanju  $B_{max}$  in  $K_d$  na podlagi podatkov o vezavi z nasičenjem je treba vedno uporabiti popravek zaradi izgube liganda (npr. z uporabo metode po Swillensu, 1995).

### **Preskus kompetitivne vezave**

53. Krivulja kompetitivne vezave se izriše kot specifična vezava  $[^3H]$ -17 $\beta$ -estradiola v odvisnosti od koncentracije (enote  $\log_{10}$ ) kompetitorja. Koncentracija preskusne

kemikalije, ki inhibira 50 % največje specifične vezave [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola, je vrednost IC<sub>50</sub>.

54. Ocene vrednosti log(IC<sub>50</sub>) za pozitivne kontrole (npr. referenčni estrogen in snov, ki se veže šibko) je treba določiti z uporabo ustrezne programske opreme za nelinearno prileganje krivulje, da ustreza štiriparametrski Hillovi enačbi (npr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Vrh, dno, naklon in log(IC<sub>50</sub>) je treba pri prileganju teh krivulj na splošno pustiti neomejene. Pri določanju najboljšega prileganja je treba uporabiti robustno regresijo, razen če se poda utemeljitev. Popravek zaradi izgube liganda se ne sme uporabiti. Po začetni analizi je treba pregledati vsako krivuljo vezave, da se zagotovi ustrezno prileganje modelu. Relativno vezavno afiniteto (RBA) za snov, ki se veže šibko, je treba izračunati kot delež log (IC<sub>50</sub>) za snov, ki se veže šibko, v odvisnosti od log (IC<sub>50</sub>) za 17β-estradiol. Rezultate iz pozitivnih kontrol in kontrole s snovjo, ki se ne veže, je treba oceniti z uporabo meril za učinkovitost preskusa iz odstavkov 44–49 tega dodatka 3.
55. Podatke za vse preskusne kemikalije je treba analizirati z uporabo stopenjskega pristopa, s čimer se zagotovi, da so podatki ustrezno analizirani in da je vsaka krivulja kompetitivne vezave ustrezno razvrščena. Priporočljivo je, da se v zvezi z vsako ponovitvijo za preskusno kemikalijo sprva izvede standardizirana podatkovna analiza, enaka tisti, ki se uporablja za kontrole z referenčnim estrogenom in snovjo, ki se veže šibko (glej odstavek 54 tega dodatka 3). Ko je ta analiza končana, sta potrebna tehnični pregled parametrov prileganja krivulje in vizualni pregled tega, kako dobro se podatki prilegajo dobljeni krivulji kompetitivne vezave za vsako ponovitev. Med tem tehničnim pregledom so opažanja od koncentracije odvisnega zmanjšanja deleža specifično vezanega [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola, nizka variabilnost med tehničnimi ponovljenimi vzorci pri vsaki koncentraciji preskusne kemikalije in skladnost parametrov prileganja med tremi ponovitvami dober znak, da so bili preskus in podatkovne analize izvedeni pravilno.

### Razlaga podatkov

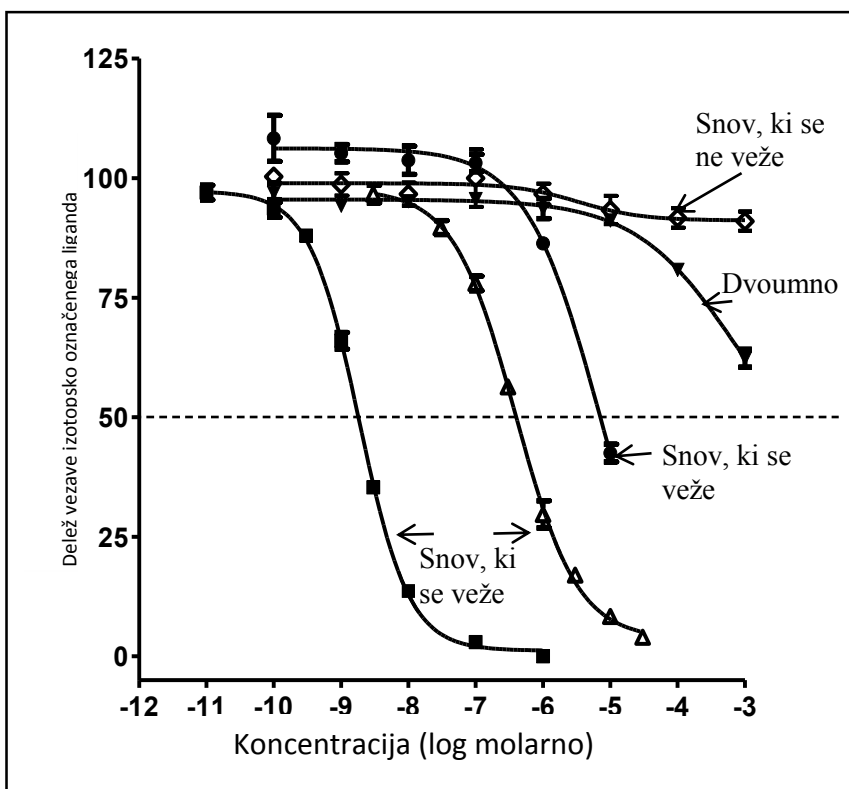
56. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za snov, ki se veže na hrERα, če je krivuljo vezave mogoče prilagoditi in je najnižja točka na krivulji odziva znotraj razpona podatkov pod 50 % (slika 1).
57. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za snov, ki se ne veže na hrERα, če:
- je krivuljo vezave mogoče prilagoditi in je najnižja točka na prilagojeni krivulji odziva znotraj razpona podatkov nad 75 % ali
  - krivulje vezave ni mogoče prilagoditi in je najmanjši nezglajeni povprečni delež vezave med skupinami koncentracij v podatkih nad 75 %.
58. Preskusne kemikalije se štejejo za dvoumne, če ni izpolnjen nobeden od zgoraj navedenih pogojev (npr. najnižja točka na prilagojeni krivulji odziva je med 76 % in 51 %).

**Preglednica 7:** Merila za določitev razvrstitve na podlagi krivulje kompetitivne vezave za preskusno

kemikalijo

Razvrstitev	Merila
Snov, ki se veže <sup>a</sup>	Krivuljo vezave je mogoče prilagoditi. <ul style="list-style-type: none"> <li>Najnižja točka na krivulji odziva znotraj razpona podatkov je pod 50 %.</li> </ul>
Snov, ki se ne veže <sup>b</sup>	Če je krivuljo vezave mogoče prilagoditi, <ul style="list-style-type: none"> <li>je najnižja točka na prilagojeni krivulji odziva znotraj razpona podatkov nad 75 %.</li> </ul> Če krivulje vezave ni mogoče prilagoditi, <ul style="list-style-type: none"> <li>je najmanjši nezglajeni povprečni delež vezave med skupinami koncentracij v podatkih nad 75 %.</li> </ul>
Dvoumno <sup>c</sup>	Vsaka preskušena ponovitev, ki ni niti snov, ki se veže, niti snov, ki se ne veže (npr. najnižja točka na prilagojeni krivulji odziva je med 76 % in 51 %).

Slika 1: Primeri razvrstitve preskusne kemikalije z uporabo krivulje kompetitivne vezave



59. V laboratoriju izvedene večkratne ponovitve za preskusno kemikalijo se združijo, tako da se vsaki ponovitvi dodelijo številčne vrednosti in se izračuna povprečje med ponovitvami, kot je prikazano v preglednici 8. Rezultati za združene ponovitve v posameznem laboratoriju se primerjajo s pričakovano razvrstitvijo za vsako preskusno kemikalijo.

**Preglednica 8:** Metoda za razvrstitev preskusne kemikalije z uporabo večkratnih ponovitev v

laboratoriju

<b>Za dodelitev vrednosti vsaki ponovitvi:</b>	
<b>Razvrstitev</b>	<b>Številčna vrednost</b>
Snov, ki se veže	2
Dvoumno	1
Snov, ki se ne veže	0

<b>Za razvrstitev povprečja številčne vrednosti med ponovitvami:</b>	
<b>Razvrstitev</b>	<b>Številčna vrednost</b>
Snov, ki se veže	povprečje $\geq 1,5$
Dvoumno	$0,5 \leq$ povprečje $< 1,5$
Snov, ki se ne veže	povprečje $< 0,5$

## **POROČILO O PRESKUSU**

60. Glej odstavek 24 v oddelku ‚ELEMENTI PRESKUSA VEZAVE NA hrER‘ te preskusne metode.

### Dodatek 3.1

#### SEZNAM IZRAZOV

**[<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>**: 17β-estradiol, radioaktivno označen s tritijem

**DCC**: oglje, prevlečeno z dekstranom.

**E<sub>2</sub>**: neoznačen 17β-estradiol (inertni).

**Analizni pufer**: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, ki vsebuje 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM NaVO<sub>3</sub>, 10-odstotni glicerol, 0,2 mM leupeptina, 1 mM ditionitrola in 10 mg/ml govejega serumskega albumina.

**hrERα**: človeški rekombinantni estrogenski receptor alfa (domena za vezavo liganda).

**Ponovljeni vzorec**: ena od več jamic, ki imajo enako vsebino pri enakih koncentracijah in se preskusijo sočasno v eni sami ponovitvi. V tem protokolu se vsaka koncentracija preskusne kemikalije preskusi v treh ponovitvah; to pomeni, da se pri vsaki koncentraciji preskusne kemikalije sočasno preskusijo trije ponovljeni vzorci.

**Ponovitev**: celoten sklop jamic pri sočasno izvedenem preskusu z mikrotitrsko ploščo, ki zagotavlja vse potrebne informacije za opredelitev vezave preskusne kemikalije na hrERα (tj. skupni [<sup>3</sup>H]-17β-estradiol, dodan v preskusno jamico, največja vezava [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola na hrERα, nespecifična vezava in celotna vezava pri različnih koncentracijah preskusne kemikalije). Ponovitev bi lahko sestavljala tudi ena sama preskusna jamica (tj. ponovljeni vzorec) na koncentracijo, ker pa ta protokol zahteva preskušanje v treh ponovitvah, eno ponovitev sestavljajo tri preskusne jamice na koncentracijo. Poleg tega ta protokol zahteva tri neodvisne (tj. nesočasne) ponovitve na kemikalijo.

### Dodatek 3.2

#### RAZPOREDITEV JAMIC ZA PRESKUS KOMPETITIVNE VEZAVE

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufra (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μL)	Količina s plošče z razredčinami (μL)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
S	A1	1	slepi vzorec	BK	BK1	-	-	-	-	-	-	-
S	A2	2	slepi vzorec	BK	BK2	-	-	-	-	-	-	-
S	A3	3	slepi vzorec	BK	BK3	-	-	-	-	-	-	-
S	B1	1	hladen E2	S	S1	1,00E <sup>-10</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-11</sup>
S	B2	2	hladen E2	S	S1	1,00E <sup>-10</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-11</sup>
S	B3	3	hladen E2	S	S1	1,00E <sup>-10</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-11</sup>
S	C1	1	hladen E2	S	S2	1,00E <sup>-9</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-10</sup>
S	C2	2	hladen E2	S	S2	1,00E <sup>-9</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-10</sup>
S	C3	3	hladen E2	S	S2	1,00E <sup>-9</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-10</sup>
S	D1	1	hladen E2	S	S3	3,16E <sup>-9</sup>	30	50	10	10	100	3,2E <sup>-10</sup>
S	D2	2	hladen E2	S	S3	3,16E <sup>-9</sup>	30	50	10	10	100	3,2E <sup>-10</sup>
S	D3	3	hladen E2	S	S3	3,16E <sup>-9</sup>	30	50	10	10	100	3,2E <sup>-10</sup>
S	E1	1	hladen E2	S	S4	1,00E <sup>-8</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-9</sup>
S	E2	2	hladen E2	S	S4	1,00E <sup>-8</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-9</sup>
S	E3	3	hladen E2	S	S4	1,00E <sup>-8</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-9</sup>
S	F1	1	hladen E2	S	S5	3,16E <sup>-8</sup>	30	50	10	10	100	3,2E <sup>-9</sup>
S	F2	2	hladen E2	S	S5	3,16E <sup>-8</sup>	30	50	10	10	100	3,2E <sup>-9</sup>
S	F3	3	hladen E2	S	S5	3,16E <sup>-8</sup>	30	50	10	10	100	3,2E <sup>-9</sup>
S	G1	1	hladen E2	S	S6	1,00E <sup>-7</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-8</sup>
S	G2	2	hladen E2	S	S6	1,00E <sup>-7</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-8</sup>
S	G3	3	hladen E2	S	S6	1,00E <sup>-7</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-8</sup>
S	H1	1	hladen E2	S	S7	1,00E <sup>-6</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-7</sup>
S	H2	2	hladen E2	S	S7	1,00E <sup>-6</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-7</sup>
S	H3	3	hladen E2	S	S7	1,00E <sup>-6</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-7</sup>
S	A4	1	noretinodrel	NE	WP1	1,00E <sup>-8</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-9</sup>
S	A5	2	noretinodrel	NE	WP1	1,00E <sup>-8</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-9</sup>
S	A6	3	noretinodrel	NE	WP1	1,00E <sup>-8</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-9</sup>
S	B4	1	noretinodrel	NE	WP2	1,00E <sup>-7</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-8</sup>
S	B5	2	noretinodrel	NE	WP2	1,00E <sup>-7</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-8</sup>
S	B6	3	noretinodrel	NE	WP2	1,00E <sup>-7</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-8</sup>
S	C4	1	noretinodrel	NE	WP3	3,16E <sup>-7</sup>	30	50	10	10	100	3,2E <sup>-8</sup>
S	C5	2	noretinodrel	NE	WP3	3,16E <sup>-7</sup>	30	50	10	10	100	3,2E <sup>-8</sup>
S	C6	3	noretinodrel	NE	WP3	3,16E <sup>-7</sup>	30	50	10	10	100	3,2E <sup>-8</sup>
S	D4	1	noretinodrel	NE	WP4	1,00E <sup>-6</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-7</sup>
S	D5	2	noretinodrel	NE	WP4	1,00E <sup>-6</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-7</sup>
S	D6	3	noretinodrel	NE	WP4	1,00E <sup>-6</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-7</sup>
S	E4	1	noretinodrel	NE	WP5	3,16E <sup>-6</sup>	30	50	10	10	100	3,2E <sup>-7</sup>
S	E5	2	noretinodrel	NE	WP5	3,16E <sup>-6</sup>	30	50	10	10	100	3,2E <sup>-7</sup>
S	E6	3	noretinodrel	NE	WP5	3,16E <sup>-6</sup>	30	50	10	10	100	3,2E <sup>-7</sup>
S	F4	1	noretinodrel	NE	WP6	1,00E <sup>-5</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-6</sup>
S	F5	2	noretinodrel	NE	WP6	1,00E <sup>-5</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-6</sup>
S	F6	3	noretinodrel	NE	WP6	1,00E <sup>-5</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-6</sup>
S	G4	1	noretinodrel	NE	WP7	3,16E <sup>-5</sup>	30	50	10	10	100	3,2E <sup>-6</sup>
S	G5	2	noretinodrel	NE	WP7	3,16E <sup>-5</sup>	30	50	10	10	100	3,2E <sup>-6</sup>
S	G6	3	noretinodrel	NE	WP7	3,16E <sup>-5</sup>	30	50	10	10	100	3,2E <sup>-6</sup>

### Razporeditev jamic za preskus kompetitivne vezave

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER ( $\mu$ l)	Količina pufra ( $\mu$ l)	Količina sledila (vroč E2) ( $\mu$ L)	Količina s plošče z razredčinami ( $\mu$ L)	Končna količina ( $\mu$ l)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
S	H4	1	noretinodrel	NE	WP8	3,16E <sup>-4</sup>	30	50	10	10	100	3,2E <sup>-5</sup>
S	H5	2	noretinodrel	NE	WP8	3,16E <sup>-4</sup>	30	50	10	10	100	3,2E <sup>-5</sup>
S	H6	3	noretinodrel	NE	WP8	3,16E <sup>-4</sup>	30	50	10	10	100	3,2E <sup>-5</sup>
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1,00E <sup>-9</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-10</sup>
S	A8	2	OTES	N	OTES1	1,00E <sup>-9</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-10</sup>
S	A9	3	OTES	N	OTES1	1,00E <sup>-9</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-10</sup>
S	B7	1	OTES	N	OTES2	1,00E <sup>-8</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-9</sup>
S	B8	2	OTES	N	OTES2	1,00E <sup>-8</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-9</sup>
S	B9	3	OTES	N	OTES2	1,00E <sup>-8</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-9</sup>
S	C7	1	OTES	N	OTES3	1,00E <sup>-7</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-8</sup>
S	C8	2	OTES	N	OTES3	1,00E <sup>-7</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-8</sup>
S	C9	3	OTES	N	OTES3	1,00E <sup>-7</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-8</sup>
S	D7	1	OTES	N	OTES4	1,00E <sup>-6</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-7</sup>
S	D8	2	OTES	N	OTES4	1,00E <sup>-6</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-7</sup>
S	D9	3	OTES	N	OTES4	1,00E <sup>-6</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-7</sup>
S	E7	1	OTES	N	OTES5	1,00E <sup>-5</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-6</sup>
S	E8	2	OTES	N	OTES5	1,00E <sup>-5</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-6</sup>
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1,00E <sup>-5</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-6</sup>
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1,00E <sup>-4</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-5</sup>
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1,00E <sup>-4</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-5</sup>
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1,00E <sup>-4</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-5</sup>
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1,00E <sup>-3</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-4</sup>
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1,00E <sup>-3</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-4</sup>
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1,00E <sup>-3</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-4</sup>
S	H7	1	OTES	N	OTES8DBP7	1,00E <sup>-2</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-3</sup>
S	H8	2	OTES	N	OTES88	1,00E <sup>-2</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-3</sup>
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1,00E <sup>-2</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-3</sup>
S	A10	1	celotna vezava	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
S	A11	2	celotna vezava	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
S	A12	3	celotna vezava	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-
S	B10	4	celotna vezava	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-
S	B11	5	celotna vezava	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
S	B12	6	celotna vezava	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-
S	C10	1	hladen E2 (visok)	NSB	S1	1,00E <sup>-5</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-6</sup>
S	C11	2	hladen E2 (visok)	NSB	S2	1,00E <sup>-5</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-6</sup>
S	C12	3	hladen E2 (visok)	NSB	S3	1,00E <sup>-5</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-6</sup>
S	D10	4	hladen E2 (visok)	NSB	S4	1,00E <sup>-5</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-6</sup>
S	D11	5	hladen E2 (visok)	NSB	S5	1,00E <sup>-5</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-6</sup>
S	D12	6	hladen E2 (visok)	NSB	S6	1,00E <sup>-5</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-6</sup>
S	E10	1	kontrola s pufrom	BC	BC1	-	-	100	-	-	100	-
S	E11	2	kontrola s pufrom	BC	BC2	-	-	100	-	-	100	-
S	E12	3	kontrola s pufrom	BC	BC3	-	-	100	-	-	100	-
S	F10	4	kontrola s pufrom	BC	BC4	-	-	100	-	-	100	-
S	F11	5	kontrola s pufrom	BC	BC5	-	-	100	-	-	100	-
S	F12	6	kontrola s pufrom	BC	BC6	-	-	100	-	-	100	-
S	G10*	1	slepi vzorec (za vroč	vroč	H1	-	90	-	10	-	100	-
S	G11*	2	slepi vzorec (za vroč	vroč	H2	-	90	-	10	-	100	-
S	G12*	3	slepi vzorec (za vroč	vroč	H3	-	90	-	10	-	100	-
S	H10*	4	slepi vzorec (za vroč	vroč	H4	-	90	-	10	-	100	-
S	H11*	5	slepi vzorec (za vroč	vroč	H5	-	90	-	10	-	100	-
S	H12	6	slepi vzorec (za vroč	vroč	H6	-	90	-	10	-	100	-

\*: Opozoriti je treba, da so ‚vroče‘ jamice med inkubacijo prazne. 10  $\mu$ l se doda samo za scintilacijsko štetje.

### Razporeditev jamic za preskus kompetitivne vezave

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufra (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μL)	Količina s plošče z razredčinami (μL)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
P1	A1	1	neznano 1	U1	1	1,00E-9	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A2	2	neznano 1	U1	1	1,00E-9	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A3	3	neznano 1	U1	1	1,00E-9	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B1	1	neznano 1	U1	2	1,00E-8	30	50	10	10	100	1,0E-9
P1	B2	2	neznano 1	U1	2	1,00E-8	30	50	10	10	100	1,0E-9
P1	B3	3	neznano 1	U1	2	1,00E-8	30	50	10	10	100	1,0E-9
P1	C1	1	neznano 1	U1	3	1,00E-7	30	50	10	10	100	1,0E-8
P1	C2	2	neznano 1	U1	3	1,00E-7	30	50	10	10	100	1,0E-8
P1	C3	3	neznano 1	U1	3	1,00E-7	30	50	10	10	100	1,0E-8
P1	D1	1	neznano 1	U1	4	1,00E-6	30	50	10	10	100	1,0E-7
P1	D2	2	neznano 1	U1	4	1,00E-6	30	50	10	10	100	1,0E-7
P1	D3	3	neznano 1	U1	4	1,00E-6	30	50	10	10	100	1,0E-7
P1	E1	1	neznano 1	U1	5	1,00E-5	30	50	10	10	100	1,0E-6
P1	E2	2	neznano 1	U1	5	1,00E-5	30	50	10	10	100	1,0E-6
P1	E3	3	neznano 1	U1	5	1,00E-5	30	50	10	10	100	1,0E-6
P1	F1	1	neznano 1	U1	6	1,00E-4	30	50	10	10	100	1,0E-5
P1	F2	2	neznano 1	U1	6	1,00E-4	30	50	10	10	100	1,0E-5
P1	F3	3	neznano 1	U1	6	1,00E-4	30	50	10	10	100	1,0E-5
P1	G1	1	neznano 1	U1	7	1,00E-3	30	50	10	10	100	1,0E-4
P1	G2	2	neznano 1	U1	7	1,00E-3	30	50	10	10	100	1,0E-4
P1	G3	3	neznano 1	U1	7	1,00E-3	30	50	10	10	100	1,0E-4
P1	H1	1	neznano 1	U1	8	1,00E-2	30	50	10	10	100	1,0E-3
P1	H2	2	neznano 1	U1	8	1,00E-2	30	50	10	10	100	1,0E-3
P1	H3	3	neznano 1	U1	8	1,00E-2	30	50	10	10	100	1,0E-3
P1	A4	1	neznano 2	U2	1	1,00E-9	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A5	2	neznano 2	U2	1	1,00E-9	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A6	3	neznano 2	U2	1	1,00E-9	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B4	1	neznano 2	U2	2	1,00E-8	30	50	10	10	100	1,0E-9
P1	B5	2	neznano 2	U2	2	1,00E-8	30	50	10	10	100	1,0E-9
P1	B6	3	neznano 2	U2	2	1,00E-8	30	50	10	10	100	1,0E-9
P1	C4	1	neznano 2	U2	3	1,00E-7	30	50	10	10	100	1,0E-8
P1	C5	2	neznano 2	U2	3	1,00E-7	30	50	10	10	100	1,0E-8
P1	C6	3	neznano 2	U2	3	1,00E-7	30	50	10	10	100	1,0E-8
P1	D4	1	neznano 2	U2	4	1,00E-6	30	50	10	10	100	1,0E-7
P1	D5	2	neznano 2	U2	4	1,00E-6	30	50	10	10	100	1,0E-7
P1	D6	3	neznano 2	U2	4	1,00E-6	30	50	10	10	100	1,0E-7
P1	E4	1	neznano 2	U2	5	1,00E-5	30	50	10	10	100	1,0E-6
P1	E5	2	neznano 2	U2	5	1,00E-5	30	50	10	10	100	1,0E-6
P1	E6	3	neznano 2	U2	5	1,00E-5	30	50	10	10	100	1,0E-6
P1	F4	1	neznano 2	U2	6	1,00E-4	30	50	10	10	100	1,0E-5
P1	F5	2	neznano 2	U2	6	1,00E-4	30	50	10	10	100	1,0E-5
P1	F6	3	neznano 2	U2	6	1,00E-4	30	50	10	10	100	1,0E-5
P1	G4	1	neznano 2	U2	7	1,00E-3	30	50	10	10	100	1,0E-4
P1	G5	2	neznano 2	U2	7	1,00E-3	30	50	10	10	100	1,0E-4
P1	G6	3	neznano 2	U2	7	1,00E-3	30	50	10	10	100	1,0E-4
P1	H4	1	neznano 2	U2	8	1,00E-2	30	50	10	10	100	1,0E-3
P1	H5	2	neznano 2	U2	8	1,00E-2	30	50	10	10	100	1,0E-3
P1	H6	3	neznano 2	U2	8	1,00E-2	30	50	10	10	100	1,0E-3

### Razporeditev jamic za preskus kompetitivne vezave

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufru (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μL)	Količina s plošče z razredinami (μL)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
P1	A7	1	neznano	3	U3	1	1,00E <sup>-9</sup>	30	50	10	100	1,0E <sup>-10</sup>
P1	A8	2	neznano	3	U3	1	1,00E <sup>-9</sup>	30	50	10	100	1,0E <sup>-10</sup>
P1	A9	3	neznano	3	U3	1	1,00E <sup>-9</sup>	30	50	10	100	1,0E <sup>-10</sup>
P1	B7	1	neznano	3	U3	2	1,00E <sup>-8</sup>	30	50	10	100	1,0E <sup>-9</sup>
P1	B8	2	neznano	3	U3	2	1,00E <sup>-8</sup>	30	50	10	100	1,0E <sup>-9</sup>
P1	B9	3	neznano	3	U3	2	1,00E <sup>-8</sup>	30	50	10	100	1,0E <sup>-9</sup>
P1	C7	1	neznano	3	U3	3	1,00E <sup>-7</sup>	30	50	10	100	1,0E <sup>-8</sup>
P1	C8	2	neznano	3	U3	3	1,00E <sup>-7</sup>	30	50	10	100	1,0E <sup>-8</sup>
P1	C9	3	neznano	3	U3	3	1,00E <sup>-7</sup>	30	50	10	100	1,0E <sup>-8</sup>
P1	D7	1	neznano	3	U3	4	1,00E <sup>-6</sup>	30	50	10	100	1,0E <sup>-7</sup>
P1	D8	2	neznano	3	U3	4	1,00E <sup>-6</sup>	30	50	10	100	1,0E <sup>-7</sup>
P1	D9	3	neznano	3	U3	4	1,00E <sup>-6</sup>	30	50	10	100	1,0E <sup>-7</sup>
P1	E7	1	neznano	3	U3	5	1,00E <sup>-5</sup>	30	50	10	100	1,0E <sup>-6</sup>
P1	E8	2	neznano	3	U3	5	1,00E <sup>-5</sup>	30	50	10	100	1,0E <sup>-6</sup>
P1	E9	3	neznano	3	U3	5	1,00E <sup>-5</sup>	30	50	10	100	1,0E <sup>-6</sup>
P1	F7	1	neznano	3	U3	6	1,00E <sup>-4</sup>	30	50	10	100	1,0E <sup>-5</sup>
P1	F8	2	neznano	3	U3	6	1,00E <sup>-4</sup>	30	50	10	100	1,0E <sup>-5</sup>
P1	F9	3	neznano	3	U3	6	1,00E <sup>-4</sup>	30	50	10	100	1,0E <sup>-5</sup>
P1	G7	1	neznano	3	U3	7	1,00E <sup>-3</sup>	30	50	10	100	1,0E <sup>-4</sup>
P1	G8	2	neznano	3	U3	7	1,00E <sup>-3</sup>	30	50	10	100	1,0E <sup>-4</sup>
P1	G9	3	neznano	3	U3	7	1,00E <sup>-3</sup>	30	50	10	100	1,0E <sup>-4</sup>
P1	H7	1	neznano	3	U3	8	1,00E <sup>-2</sup>	30	50	10	100	1,0E <sup>-3</sup>
P1	H8	2	neznano	3	U3	8	1,00E <sup>-2</sup>	30	50	10	100	1,0E <sup>-3</sup>
P1	H9	3	neznano	3	U3	8	1,00E <sup>-2</sup>	30	50	10	100	1,0E <sup>-3</sup>
P1	A10	1	kontrola E2 (max)	S	E2max1	1,00E <sup>-6</sup>	30	50	10	10	100	1,00E <sup>-7</sup>
P1	A11	2	kontrola E2 (max)	S	E2max2	1,00E <sup>-6</sup>	30	50	10	10	100	1,00E <sup>-7</sup>
P1	A12	3	kontrola E2 (max)	S	E2max3	1,00E <sup>-6</sup>	30	50	10	10	100	1,00E <sup>-7</sup>
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 <sup>-3,5</sup>	30	50	10	10	100	1,00E <sup>-4,5</sup>
P1	C11	2	kontrola NE	S	nemax2	1,00E <sup>-3,5</sup>	30	50	10	10	100	1,00E <sup>-4,5</sup>
P1	C12	3	kontrola NE	S	nemax3	1,00E <sup>-3,5</sup>	30	50	10	10	100	1,00E <sup>-4,5</sup>
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	hladen E2 (visok)	NSB	S1	1,00E <sup>-5</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-6</sup>
P1	E11	2	hladen E2 (visok)	NSB	S2	1,00E <sup>-5</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-6</sup>
P1	E12	3	hladen E2 (visok)	NSB	S3	1,00E <sup>-5</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-6</sup>
P1	F10	4	hladen E2 (visok)	NSB	S4	1,00E <sup>-5</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-6</sup>
P1	F11	5	hladen E2 (visok)	NSB	S5	1,00E <sup>-5</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-6</sup>
P1	F12	6	hladen E2 (visok)	NSB	S6	1,00E <sup>-5</sup>	30	50	10	10	100	1,0E <sup>-6</sup>
P1	G10	1	celotna vezava	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
P1	G11	2	celotna vezava	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
P1	G12	3	celotna vezava	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-
P1	H10	4	celotna vezava	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-
P1	H11	5	celotna vezava	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
P1	H12	6	celotna vezava	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-

#### **Dodatek 4**

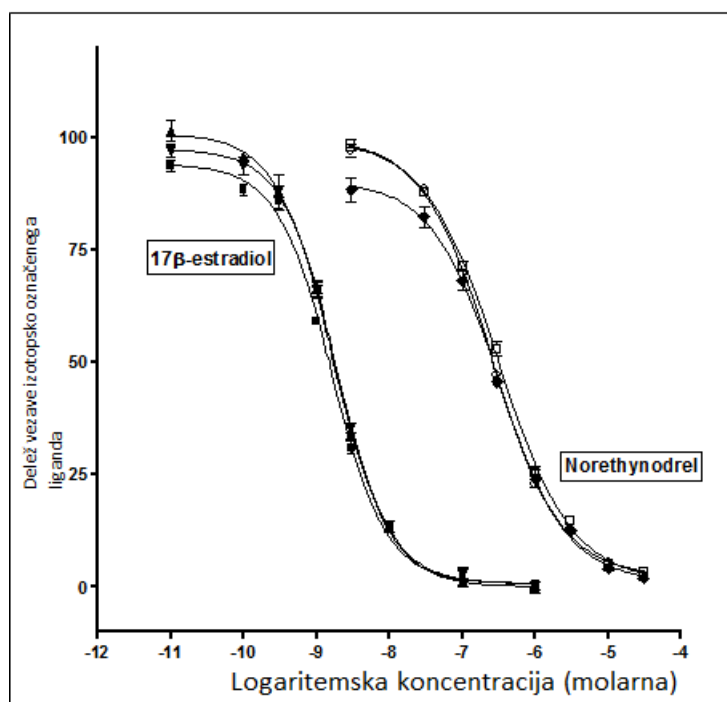
### **PREUDARKI ZA ANALIZO PODATKOV IZ PRESKUSA KOMPETITIVNE VEZAVE NA ČLOVEŠKI REKOMBINANTNI ESTROGENSKI RECEPTOR (hrER)**

1. S preskusom kompetitivne vezave na hrER $\alpha$  se meri vezava ene same koncentracije [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiola ob prisotnosti naraščajočih koncentracij preskusne kemikalije. Krivulja kompetitivne vezave se izriše kot specifična vezava [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiola v odvisnosti od koncentracije (enote log $_{10}$ ) kompetitorja. Koncentracija preskusne kemikalije, ki inhibira 50 % največje specifične vezave [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiola, je IC $_{50}$ .

#### **Podatkovna analiza za referenčni estrogen in snov, ki se veže šibko (1)**

2. Podatki iz kontrolnih ponovitev se pretvorijo (tj. delež specifične vezave [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -estradiola in logaritemska koncentracija kontrolne koncentracije) za nadaljnjo analizo. Ocene vrednosti log(IC $_{50}$ ) za pozitivne kontrole (npr. referenčni estrogen in snov, ki se veže šibko) je treba določiti z uporabo ustrezne programske opreme za nelinearno prilaganje krivulje, da ustreza štiriparametrski Hillovi enačbi (npr. BioSoft; GraphPad Prism) (2). Vrh, dno, naklon in log( IC $_{50}$ ) lahko pri prilaganju teh krivulj običajno ostanejo neomejeni. Pri določanju najboljšega prilaganja je treba uporabiti robustno regresijo, razen če se poda utemeljitev. Navesti je treba izbrano metodo za robustno regresijo. Popravek zaradi izgube liganda za preskusa hrER FW ali CERI ni bil potreben, vendar se lahko po potrebi preuči. Po začetni analizi je treba pregledati vsako krivuljo vezave, da se zagotovi ustrezna prilagoditev modelu. Relativna vezavna afiniteta (RBA) za snov, ki se veže šibko, se lahko izračuna kot delež log (IC $_{50}$ ) za snov, ki se veže šibko, v odvisnosti od log (IC $_{50}$ ) za 17 $\beta$ -estradiol. Rezultate za pozitivne kontrole in kontrole s snovjo, ki se ne veže, je treba oceniti z uporabo meril za učinkovitost preskusa in meril za sprejemljivost, kot so opisana v tej preskusni metodi (odstavek 20), Dodatku 2 (preskus FW, odstavki 41–51) in Dodatku 3 (preskus CERI, odstavki 41–51). Primeri treh ponovitev za referenčni estrogen in snov, ki se veže šibko, so prikazani na sliki 1.

**Slika 1.** Primeri krivulj kompetitivne vezave za referenčni estrogen in kontrolno snov, ki se veže šibko

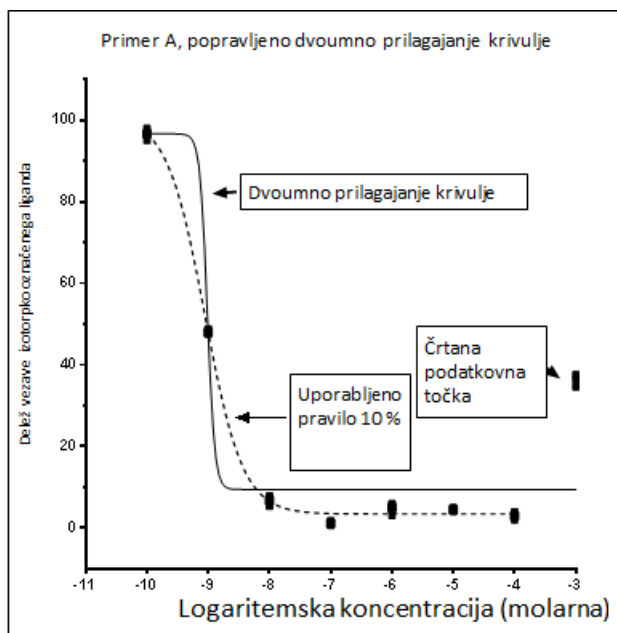


### Podatkovna analiza za preskusne kemikalije

3. Podatke za vse preskusne kemikalije je treba analizirati z uporabo stopenjskega pristopa, s čimer se zagotovi, da so podatki ustrezno analizirani in da je vsaka krivulja kompetitivne vezave ustrezno razvrščena. Pri vsaki ponovitvi za preskusno kemikalijo je treba sprva izvesti standardizirano podatkovno analizo, enako tisti, ki se uporablja za kontrole z referenčnim estrogenom in snovjo, ki se veže šibko. Ko je ta analiza končana, sta potrebna tehnični pregled parametrov prileganja krivulje in vizualni pregled tega, kako dobro se podatki prilegajo dobljeni krivulji kompetitivne vezave za vsako ponovitev. Med tem tehničnim pregledom so opažanja od koncentracije odvisnega zmanjšanja deleža specifično vezanega [<sup>3</sup>H]-17β-estradiola, nizka variabilnost med tehničnimi ponovljenimi vzorci pri vsaki koncentraciji kemikalije in skladnost parametrov prileganja med tremi ponovitvami dober znak, da so bili preskus in podatkovne analize izvedeni pravilno. Pri pregledu rezultatov iz vsake ponovitve za preskusno kemikalijo je treba uporabiti strokovno presojo, podatke, ki se uporabijo za razvrstitev vsake preskusne kemikalije med snovi, ki se vežejo, ali snovi, ki se ne vežejo, pa mora biti mogoče znanstveno utemeljiti.
4. Občasno se lahko pojavijo primeri podatkov, ki zahtevajo dodatno pozornost, da se podatki o vezavi na hrER ustrezno analizirajo in razlagajo. Prejšnje študije so pokazale na primere, ko se lahko analiza in razlaga podatkov o kompetitivni vezavi na receptor zapleteta zaradi zvišanja deleža specifične vezave, ko se kemikalije preskušajo pri najvišjih koncentracijah (slika 2). To je dobro znana težava, ki se

pojavlja ob uporabi protokolov za številne preskuse kompetitivne vezave na receptor (3. V teh primerih je od koncentracije odvisen odziv opažen pri nižjih koncentracijah, ko pa se koncentracija preskusne kemikalije približa meji topnosti, se izpodrinjenje [ $^3\text{H}$ ]17 $\beta$ -estradiola ne zmanjšuje več. V teh primerih podatki za višje koncentracije kažejo, da je bila dosežena biološka meja preskusa. Ta pojav je na primer pogosto povezan z netopnostjo in obarjanjem kemikalij pri visokih koncentracijah, lahko pa tudi odraža preseženo zmožnost oglja, prevlečenega z dekstranom, da prestreže nevezan radioaktivno označen ligand med postopkom ločevanja pri najvišjih koncentracijah kemikalije. Če se take podatkovne točke ne izključijo iz prilagajanja podatkov o kompetitivni vezavi sigmoidni krivulji, lahko včasih pride do napačne razvrstitve potenciala preskusne kemikalije za vezavo na ER (slika 2). Da bi se to preprečilo, protokol za preskuse vezave na hrER FW in CER1 vključuje možnost, da se iz analiz izključijo podatkovne točke, pri katerih je srednja vrednost ponovljenih vzorcev za delež specifične vezave [ $^3\text{H}$ ]17 $\beta$ -estradiola najmanj 10 % nad zaznanim deležem srednje vrednosti pri nižji koncentraciji (tj. tako imenovano pravilo 10 %). To pravilo se lahko za dano krivuljo uporabi le enkrat; da se lahko krivulja ustrezno razvrsti, morajo ostati podatki za vsaj šest koncentracij.

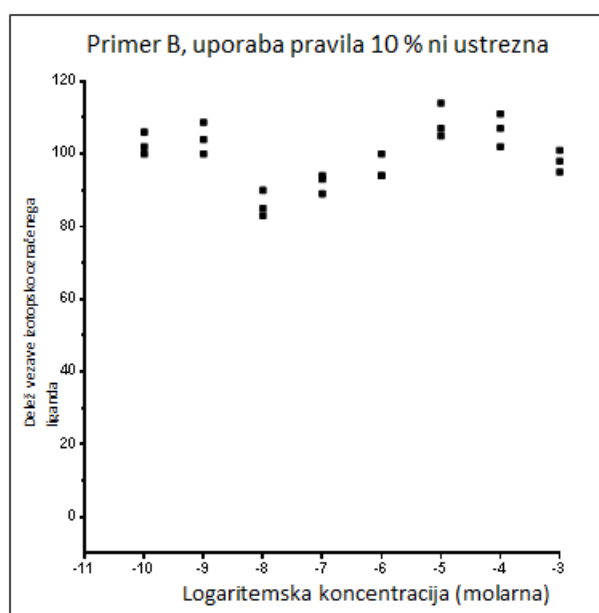
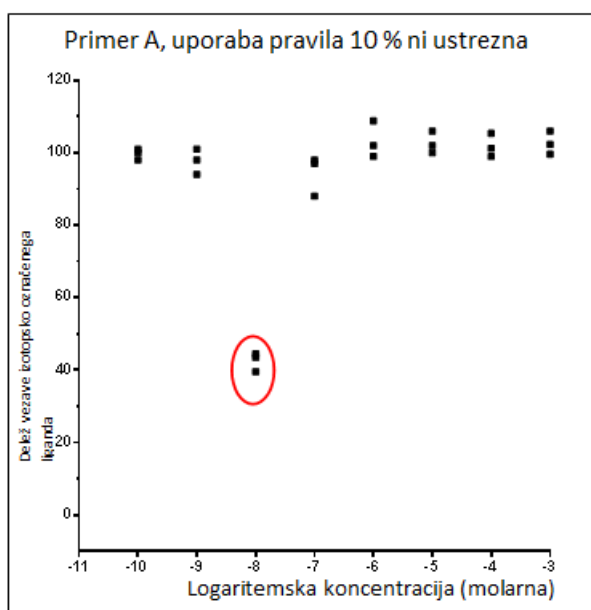
**Slika 2:** Primeri krivulj kompetitivne vezave z uporabo pravila 10 % in brez nje



5. Ustrezno uporabo pravila 10 % za popravek teh krivulj je treba skrbno pretehtati in pridržati za tiste primere, v katerih se z veliko verjetnostjo nakazuje, da gre za snov, ki se veže na hrER. Med izvajanjem poskusov za validacijsko študijo preskusa vezave na hrER FW je bilo opaženo, da ima pravilo 10 % včasih neželene in nepredvidene posledice. Kemikalije, ki niso reagirale z receptorjem (tj. snovi, ki se dejansko ne

vežejo), so pogosto pokazale variabilnost pri 100-odstotni vezavi radioaktivno označenega liganda, ki je bila med različnimi preskušeni koncentracijami več kot 10-odstotna. Če bi bila najnižja vrednost slučajno pri nizki koncentraciji, bi se podatki za vse višje koncentracije potencialno lahko črtali iz analize, tako da bi se uporabilo pravilo 10 %, čeprav bi bile zadevne koncentracije lahko koristne pri ugotavljanju, da je kemikalija snov, ki se ne veže. Na sliki 3 so prikazani primeri, v katerih uporaba pravila 10 % ni ustrezna.

**Slika 3:** Primeri podatkov o kompetitivni vezavi, pri katerih uporaba pravila 10 % ni ustrezna



## Viri

- (1) OECD (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER $\alpha$ )*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 226), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (2) Motulsky, H., in Christopoulos, A. (2003). *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, Kalifornija, str. 187–191. [Www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf](http://www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf)
- (3) Laws, S. C., Yavanxay, S., Cooper, R. L., in Eldridge, J. C. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. *Toxicological Sci.* 94(1): 46–56.