



Съвет на
Европейския съюз

Брюксел, 25 февруари 2019 г.
(OR. en)

6800/19
ADD 2

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

ПРИДРУЖИТЕЛНО ПИСМО

От:	Европейската комисия
Дата на получаване:	22 февруари 2019 г.
До:	Генералния секретариат на Съвета
Относно:	Приложение към РЕГЛАМЕНТ (ЕС) .../... НА КОМИСИЯТА от XXX година за изменение, с цел адаптиране към техническия прогрес, на приложението към Регламент (ЕО) № 440/2008 за определяне на методи за изпитване в съответствие с Регламент (ЕО) № 1907/2006 на Европейския парламент и на Съвета относно регистрацията, оценката, разрешаването и ограничаването на химикали (REACH)

Приложено се изпраща на делегациите документ Annex to D060575/02.

Приложение: Annex to D060575/02

Б.71 ИЗСЛЕДВАНИЯ *IN VITRO* ЗА КОЖНА СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ, НАСОЧЕНИ КЪМ ОСНОВНОТО СЪБИТИЕ АКТИВИРАНЕ НА ДЕНДРИТНИ КЛЕТКИ ПО ПЪТЯ, ВОДЕЩ ДО НЕБЛАГОПРИЯТЕН ЕФЕКТ (АОР) ЗА КОЖНАТА СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ

ОБЩО ВЪВЕДЕНИЕ

Метод на изпитване, основан на основното събитие активиране на дендритни клетки

1. Кожният сенсibilизатор представлява вещество, което води до алергичен отговор след контакт с кожата, както е определено от Глобалната хармонизирана система на ООН за класифициране и етикетиране на химикали (GHS) (1) на Съвета за сигурност на ООН и от Регламент (ЕО) № 1272/2008 относно класифицирането, етикетирането и опаковането на вещества и смеси (CLP)¹. Налице е общо съгласие по отношение на основните биологични събития, които са в основата на кожната сенсibilизация. Настоящите познания за химичните и биологичните механизми, свързани с кожната сенсibilизация, са обобщени като път, водещ до неблагоприятен ефект в рамките на програмата на ОИСП за АОР (2), като се започне с молекулното инициращо събитие, през междинните събития до неблагоприятния ефект, а именно алергичен контактен дерматит. В този случай молекулното инициращо събитие (т.е. първото основно събитие) е ковалентното свързване на електрофилни вещества към нуклеофилни центрове в кожни белтъци. Второто основно събитие в този АОР се извършва в кератиноцитите и включва възпалителни реакции, както и промени в генната експресия, свързана със специфични сигнални пътища в клетките, като например пътищата, зависими от елемент за антиоксидантен отговор/отговор на електрофилно въздействие (ARE). Третото основно събитие е активирането на дендритни клетки (ДК), обичайно оценявано по експресията на специални повърхностни клетъчни маркери, хемокини и цитокини. Четвъртото основно събитие е активиране и пролиферация на Т-клетки, което се оценява непряко в изследването върху локални лимфни възли (LLNA) на мишки (3).

¹ Регламент (ЕО) № 1272/2008 на Европейския парламент и на Съвета от 16 декември 2008 г. относно класифицирането, етикетирането и опаковането на вещества и смеси, за изменение и за отмяна на директиви 67/548/ЕИО и 1999/45/ЕО и за изменение на Регламент (ЕО) № 1907/2006 (ОВ L 353, 31.12.2008 г., стр. 1).

2. Настоящият метод за изпитване (МИ) е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 442E (2017). В него се описват изследванията *in vitro*, които са насочени към механизмите, описани в рамките на основното събитие, свързано с активирането на дендритни клетки на АОР за кожна сенсibilизация (2). МИ включва изпитвания, които трябва да се използват за подпомагане на разграничаването между кожни сенсibilизатори и непредизвикващи сенсibilизация вещества в съответствие с GHS на ООН и Регламента CLP.

Описаните в настоящия МИ изпитвания са:

- Изпитване с активиране на човешка клетъчна линия (h-CLAT)
 - Изпитване с активиране на клетъчна линия U937 (U-SENSTM)
 - Изследване за репортерен ген за интерлевкин-8 (изследване за IL-8 Luc)
3. Изпитванията, включени в настоящия метод за изпитване, и съответните TG на ОИСП могат да се различават по отношение на процедурата, използвана за генериране на данните, и измерванията, но могат да се използват без разграничение в отговор на изискванията на държавите за резултати от изпитването на основното събитие, свързано с активирането на дендритните клетки на АОР за кожна сенсibilизация, като същевременно се извличат ползи от взаимното приемане на данни от ОИСП.

Контекст и принципи на изпитванията, включени в метода за изпитване, основан на основно събитие

4. Оценката на кожната сенсibilизация обикновено е включвала използването на лабораторни животни. Класическите методи с използване на морски свинчета — изпитването на Magnusson—Kligman върху морски свинчета с максимизиране и изпитването на Buehler (метод за изпитване Б.6 (4)) — оценяват както индукционната фаза, така и фазата на проявяване на кожната сенсibilизация. Изпитванията с мишки, LLNA (МИ Б.42) (3) и двете му нерадиоактивни изменения, LLNA: DA (МИ Б.50 (5)) и LLNA: BrdU-ELISA (метод за изпитване Б.51 (6)), всички от които оценяват изключително индуктивния отговор, и също са възприети, тъй като спрямо изпитванията върху морски свинчета предоставят предимство по отношение на хуманното отношение към животните, заедно с обективно измерване на индукционната фаза на кожната сенсibilизация.
5. Неотдавнашни механистично-базирани МИ *in chemico* и *in vitro*, насочени към първото основно събитие (МИ Б.59; Изследване за директна реакционна способност спрямо пептиди (7)) и второто основно събитие (МИ Б.60; Метод за изпитване ARE-Nrf2 луцифераза (8)) от АОР за кожна сенсibilизация, бяха приети, за да

допринесат за оценката на потенциала на химикалите за опасност от кожна сенсibiliзация.

6. Изпитванията, описани в настоящия метод за изпитване, или определят количествено промяната в експресията на повърхностни клетъчни маркери, свързана с процеса на активиране на моноцитите и ДК след експозиция на сенсibiliзатори (напр. CD54, CD86) или с промените в експресията на IL-8, цитокин, свързани с активирането на ДК. Докладвани са кожни сенсibiliзатори, предизвикващи експресия на клетъчноембрани маркери, като CD40, CD54, CD80, CD83, и CD86, в допълнение към индуцирането на провъзпалителни цитокини, като например IL-1 β и TNF- α , и няколко хемокини включително IL-8 (CXCL8) и CCL3 (9) (10) (11) (12), свързани с активиране на ДК (2).
7. Въпреки това, тъй като активирането на ДК представлява само едно основно събитие от АОР за кожна сенсibiliзация (2) (13), информацията, получена само от изпитванията за измерване на маркерите за активиране на ДК може да не е достатъчна, за да се направи заключение за наличието или липсата на потенциал за кожна сенсibiliзация на химикалите. Поради това се предлага данните, получени с описаните в настоящия метод за изпитване изпитвания, да подкрепят разграничаването между кожни сенсibiliзатори (т.е. категория 1 по GHS на ООН/Регламент CLP) и непредизвикващи сенсibiliзация вещества, когато се използват в рамките на интегрирани подходи към изпитването и оценката (IATA), заедно с друга относима допълнителна информация, например изведена от изследвания *in vitro*, насочени към други основни събития от АОР за кожна сенсibiliзация, както и от методи, различни от изпитвания, включително read-across от химически аналози (13). Примери за използването на данни, получени с тези изпитвания в рамките на определени подходи, т.е. подходи, които са стандартизирани както по отношение на набора от използвани източници на информация, така и по отношение на процедурата, прилагана към данните, с оглед извеждане на прогнози, са публикувани (13) и могат да бъдат използвани като полезни елементи в рамките на IATA.
8. Изпитванията, описани в настоящия метод за изпитване, не могат да се използват самостоятелно, нито за подкатегоризация на кожните сенсibiliзатори към подкатегории 1A и 1B, както е определено в GHS на ООН/Регламент CLP, за органите, които прилагат тези две незадължителни подкатегории, нито за прогнозиране на потенциала с оглед вземане на решения за оценка на безопасността. Независимо от това, в зависимост от регулаторната рамка, положителните резултати, получени по тези методи, могат да се използват самостоятелно за класифициране на даден химикал в категория 1 по GHS на ООН/Регламент CLP.

9. Терминът „изпитван химикал“ се използва в настоящия метод за изпитване за обозначаване на това, което се изпитва¹, и не е свързан с приложимостта на изпитванията за изпитване на вещества с една съставка, вещества с повече съставки и/или смеси. Понастоящем има ограничена информация относно приложимостта на изпитванията за вещества, състоящи се от повече от една съставка/смеси (14) (15). Независимо от това изпитванията са технически приложими за изпитването на вещества с повече съставки и на смеси. Въпреки това, преди използването на настоящия метод за изпитване по отношение на смес с цел генериране на данни за планирана регулаторна цел, следва да се разгледа въпросът дали той може да даде адекватни резултати за тази цел и, ако е така, защо². Подобни съображения не са необходими, когато има регулаторно изискване за изпитване на сместа. Освен това, когато се извършва изпитване на вещества с повече съставки или на смеси, следва да се обърне внимание на възможно смущаване на наблюдаваните отклици от цитотоксични съставки.

¹ През юни 2013 г. съвместното заседание на ОИСР се съгласи, че когато е възможно, в новите и в актуализираните насоки за изпитване на ОИСР следва терминът „изпитван химикал“ да се използва последователно при описването на това какво се изпитва.

² Това изречение беше предложено и договорено на заседанието на WNT през април 2014 г.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. На разположение на адрес: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.
- (2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. На разположение на адрес: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En).
- (3) Глава Б.49 от настоящото приложение: Изследване на локалните лимфни възли Глава Б.6 от настоящото приложение: Кожна сенсibiliзация.
- (4) Глава Б.50 от настоящото приложение: Кожна сенсibiliзация: изследване на локалните лимфни възли: DA.
- (5) Глава Б.51 от настоящото приложение: Кожна сенсibiliзация: изследване на локалните лимфни възли: BrdU-ELISA.
- (6) Глава Б.59 от настоящото приложение: In chemico кожна сенсibiliзация: Изследване за директна реакционна способност спрямо пептиди (DPRA).
- (7) Глава Б.60 от настоящото приложение: *In vitro* кожна сенсibiliзация: Метод за изпитване ARE-Nrf2 луцифераза
- (8) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol 9:271-96.
- (9) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. J Exp Med 180:1841-7.
- (10) Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. Eur J Immunol 27:3031-8.
- (11) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation

of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and DNCB. *J Invest Dermatol* 120:390-8.

- (12) OECD (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. [ENV/JM/HA\(2016\)29](#). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. На разположение на адрес: <https://community.oecd.org/community/iatass>.
- (13) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
- (14) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

Допълнение 1

***IN VITRO* КОЖНА СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ: ИЗПИТВАНЕ С АКТИВИРАНЕ НА ЧОВЕШКА КЛЕТЪЧНА ЛИНИЯ (h-CLAT)**

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

1. h-CLAT определя количествено промените в експресията на повърхностни клетъчни маркери, свързани с процеса на активиране на моноцити и дендритни клетки (ДК) (т.е. CD86 и CD54) в моноцитната клетъчна линия THP-1 от левкемия при човека след експозиция на сенсibiliзиращи вещества (1) (2). Измерените нива на експресия на повърхностни клетъчни маркери CD86 и CD54 се използват след това за подпомагане на разграничаването между кожни сенсibiliзатори и непредизвикващи сенсibiliзация вещества.
2. h-CLAT беше оценен в координирано от референтна лаборатория на Европейския съюз за алтернативи на изпитванията върху животни (EURL ECVAM) проучване за валидиране и последваща независима партньорска проверка от страна на Научния консултативен комитет на EURL ECVAM (ESAC). Като взе предвид всички налични доказателства и данни от регулаторните органи и заинтересованите страни, EURL ECVAM препоръча h-CLAT (3) за използване като част от IATA за подкрепа на разграничаването между сенсibiliзатори и непредизвикващи сенсibiliзация вещества за целите на класифицирането на опасността и етикетирането. Примери за използването на данни от h-CLAT в комбинация с друга информация са описани в литературата (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).
3. h-CLAT се оказва прехвърляем на лаборатории с опит в областта на техниките за клетъчна култура и анализ с поточна цитометрия. Нивото на възпроизводимостта в прогнозите, което може да се очаква от изпитването, е от порядъка на 80 % вътре в самата лаборатория и между лабораториите (3)(12).. Резултатите, получени в изследването за валидиране (13) и други публикувани изследвания (14) като цяло показват, че в сравнение с резултатите от LLNA точността при разграничаването на кожните сенсibiliзатори (т.е. категория 1 по GHS на ООН/CLP) от непредизвикващи сенсibiliзация вещества е 85 % (N = 142), с чувствителност от 93 % (94/101) и специфичност от 66 % (27/41) (въз основа на повторен анализ от EURL ECVAM (12), като се вземат предвид всички съществуващи данни, без да се разглеждат отрицателните резултати за химикали с Log Kow, по-голям от 3,5, както е описано в точка 4). Има по-голяма вероятност неверните отрицателни прогнози, свързани с h-CLAT, да се отнасят за химикали, които са с малък до умерен потенциал за кожна сенсibiliзация (т.е. кожна сенсibiliзация подкатегория 1B по

GHS на ООН/Регламент CLP), отколкото при химикали, показващи голям потенциал за кожна сенсibilизация (т.е. подкатегория 1A по GHS на ООН/Регламент CLP) (4)(13)(15). Взета заедно, тази информация показва ползата от метода h-CLAT за подпомагане на определянето на опасността от кожна сенсibilизация. Независимо от това стойностите за точността, посочени тук за h-CLAT като самостоятелно изпитване, са само ориентировъчни, тъй като изпитването трябва да се разглежда в съчетание с други източници на информация в контекста на IATA и в съответствие с разпоредбите на точки 7 и 8 от Общото въведение. Освен това при оценяването на методи за сенсibilизация на кожата, които не използват животни, следва да се има предвид, че LLNA изпитването, както и други изпитвания върху животни, могат да не отразяват напълно положението при хората.

4. Въз основа на наличните понастоящем данни бе показано, че методът h-CLAT е приложим по отношение на изпитвани химикали, които обхващат различни органични функционални групи, реакционни механизми, потенциал за сенсibilизация на кожата (както е определена в *in vivo* проучвания) и физични и химични свойства (3)(14)(15). Методът h-CLAT се прилага за изпитвани химикали, които са разтворими или образуват стабилна дисперсия (т.е. колоид или суспензия, в която изпитваният химикал не се утаява или отделя от разтворителя/носителя в различни фази) в подходящ разтворител/носител (вж. точка 14). Изпитваните химикали с Log Kow по-голямо от 3,5 обикновено дават неверни отрицателни резултати (14). Поради това отрицателните резултати, получени при изпитвани химикали с Log Kow, по-голямо от 3,5, следва да не се вземат под внимание. Все пак, положителните резултати, получени при изпитвани химикали с Log Kow, по-голямо от 3,5, могат да се използват, за да се подпомогне идентифицирането на изпитвания химикал като кожен сенсibilизатор. Освен това, поради ограничения метаболитен капацитет на използваната клетъчна линия (16) и поради условията на опита, про-хаптените (т.е. вещества, които изискват ензимно активиране, например чрез P450 ензими) и пре-хаптените (т.е. вещества, активирани чрез окисление), по-специално тези с малка скорост на окисление, могат също да дадат отрицателни резултати при h-CLAT (15). Флуоресцентните изпитвани химикали могат да бъдат оценени с h-CLAT (17), но независимо от това, силно флуоресцентните изпитвани химикали, които излъчват при същата дължина на вълната като флуоресцеиновия изотиоцианат (FITC) или като пропидиевия йодид (PI), ще предизвикат смущения при откриването с поточна цитометрия и следователно не могат да бъдат правилно оценени с помощта на FITC-конюгирани антитела или PI. В такъв случай могат да се използват други антитела, маркирани с флуорохром, или съответно други маркери за цитотоксичност, при условие че може да се покаже, че дават сходни резултати като маркираните с FITC антитела (вж. точка 24) или PI (вж. точка 18), напр. чрез изпитване на веществата за изпитване за пригодност от допълнение 1—2. С оглед на

гореизложеното отрицателните резултати следва да се тълкуват в контекста на посочените ограничения и заедно с други източници на информация в рамките на IATA. В случаите, когато са налице доказателства за неприложимостта на h-CLAT метода по отношение на други специфични категории изпитвани химикали, той не следва да се използва за тези специфични категории.

5. Както е описано по-горе, методът h-CLAT подкрепя разграничаването между кожни сенсibiliзатори и непредизвикващи сенсibiliзация вещества. Той обаче също така може потенциално да допринесе за оценка на потенциала за сенсibiliзация (4)(5)(9), когато се използва в интегрирани подходи, като например IATA. Независимо от това се изисква по-нататъшна работа, за предпочитане въз основа на данни за човека, за определяне на това как резултатите от h-CLAT могат евентуално да послужат за информация за оценка на потенциала.
6. Определенията са дадени в допълнение 1.1.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

7. Методът h-CLAT е *in vitro* изследване, което определя количествено промените в експресията на повърхностни клетъчни маркери (т.е. CD86 и CD54) в моноцитната клетъчна линия THP-1 от левкемия при човека, след 24 часова експозиция на изпитвания химикал. Тези повърхностни молекули са типични маркери за активиране на моноцитни THP-1 и могат да имитират активиране на ДК, което играе решаваща роля при праймирането на Т-клетките. Промените в експресията на повърхностните маркери се измерват чрез поточна цитометрия след клетъчно оцветяване с антитела, маркирани с флуорохром. Измерването на цитотоксичността се извършва също така едновременно, за да се оцени дали настъпва регулиране на експресията на повърхностните маркери в посока увеличаване при субцитотоксични концентрации. Относителният интензитет на флуоресценцията на повърхностните маркери в сравнение с контролата на разтворител/носител се изчислява и използва в модела за прогнозиране (вж. точка 26), за да се подкрепи разграничаването между сенсibiliзатори и непредизвикващи сенсibiliзация вещества

ДОКАЗВАНЕ НА ПРИГОДНОСТ

8. Преди рутинното използване на изпитването, описано в настоящото допълнение към метод за изпитване Б.71, лабораториите следва да докажат техническата си пригодност, като използват 10-те вещества за изпитване на пригодност, изброени в допълнение 1.2. Освен това ползвателите на изпитвания следва да поддържат база данни с данни за предходни периоди, получени с проверките на реакционната

способност (вж. точка 11) и с положителните контроли и контролите на разтворител/носител (вж. точки 20—22), и да използват тези данни, за да потвърдят, че възпроизводимостта на изпитването в тяхната лаборатория се запазва с течение на времето.

ПРОЦЕДУРА

9. Това изпитване се основава на Протокол № 158 за h-CLAT от базата данни за методи, алтернативни на експериментите с животни (DB-ALM) (18), който представлява протоколът, използван за изследването за валидиране, координирано от EURL ECVAM. Препоръчва се този протокол да се използва при прилагането и използването на h-CLAT метода в лабораторни условия. Следва описание на основните компоненти и процедури за метода h-CLAT, който се състои от две стъпки: *изследване за определяне на дозата и измерване на експресията на CD86/CD54*.

Подготовка на клетките

10. За извършване на метода h-CLAT следва да се използва моноцитната клетъчна линия THP-1 от левкемия при човека. Препоръчва се получаването на клетки (TIB-202™) от добре квалифицирана клетъчна банка, като например Американската банка за типови култури (American Type Culture Collection).
11. Клетките THP-1 се култивират при 37 °C, 5% CO₂ и овлажнена атмосфера в среда RPMI-1640, с добавка на 10 % фетален говежди серум (FBS), 0,05 mM 2-меркаптоетанол, 100 единици/ml пеницилин и 100 µg/ml стрептомицин. Употребата на пеницилин и на стрептомицин в хранителната среда може да бъде избегната. В такъв случай обаче ползвателите следва да се уверят, че липсата на антибиотици в средата за отглеждане не оказва въздействие върху резултатите, например чрез изпитване на веществата за пригодност, изброени в допълнение 1.2. Във всеки случай, за да се сведе до минимум рискът от замърсяване, трябва да се следват добрите практики при клетъчните култури, независимо от наличието или липсата на антибиотици в средата за отглеждане на клетки. THP-1 клетки се посяват редовно всеки 2—3 дни при плътност от 0,1 до $0,2 \times 10^6$ клетки/ml. Те трябва да се поддържат при плътности от 0,1 до $1,0 \times 10^6$ клетки/ml. Преди да бъдат използвани за изпитване, клетките следва да бъдат квалифицирани чрез извършване на проверка за реакционна способност. Проверката на реакционната способност на клетките следва да се извърши, като се използват положителните контроли, 2,4-динитрохлоробензен (DNCB) (CAS № 97-00-7, ≥ 99 % чистота) и никелов сулфат (NiSO₄) (CAS № 10101-97-0, чистота ≥ 99 %) и отрицателната контрола, млечна киселина (LA) (CAS № 50-21-5, чистота ≥ 85 %), две седмици след размразяване. Както DNCB, така и NiSO₄

следва да дадат положителен отклик при повърхностни клетъчни маркери както CD86, така и CD54, а LA следва да даде отрицателен отклик при повърхностни клетъчни маркери както CD86, така и CD54. За изследването се използват само клетките, които са преминали проверката за реакционна способност. Клетките могат да бъдат размножавани до два месеца след размразяването. Броят пасажки не трябва да надвишава 30. Проверката за реакционна способност следва да се извършва в съответствие с процедурите, описани в точки 20—24.

12. За изпитване THP-1 клетките се посяват с плътност $0,1 \times 10^6$ клетки/ml или $0,2 \times 10^6$ клетки/ml, и се извършва предварително култивиране в колби за клетъчни култури съответно за 72 часа или 48 часа. Важно е плътността на клетките в колбата за за клетъчни култури непосредствено след периода на предварително култивиране да бъде възможно най-последователна във всеки експеримент (като се използва едно от двете условия на предварително култивиране, описани по-горе), тъй като плътността на клетките в колбата за култури непосредствено след предварителното култивиране би могла да засегне експресията на CD86/CD54, индуцирана от алергени (19). В деня на изпитването клетките, събрани от колбата за култури, се ресуспендират с прясна хранителна среда при 2×10^6 клетки/ml. След това клетките се разпределят в 24-ямкова плоскодонна плака по 500 μ l (1×10^6 клетки/ямка) или 96-ямкова плоскодонна плака по 80 μ l ($1,6 \times 10^5$ клетки/ямка).

Изследване за определяне на дозата

13. Извършва се *изследване за определяне на дозата*, за да се определи CV75, което е концентрацията на изпитвания химикал, която води до 75 % клетъчна жизнеспособност (CV) в сравнение с контролата на разтворител/носител. Стойността на CV75 се използва, за да се определи концентрацията на изпитваните химикали за измерване на експресията на CD86/CD54 (вж. точки 20—24).

Приготвяне на изпитваните химикали и веществата за контроли

14. Изпитваните химикали и веществата за контроли се приготвят в деня на изпитването. По отношение на метода h-CLAT, изпитваните химикали се разтварят или трайно се диспергират (вж. също точка 4) във физиологичен разтвор или среда като първи вариант на разтворител/носител, или в диметилсулфоксид (DMSO, $\geq 99\%$ чистота) като втори вариант на разтворител/носител, ако изпитваният химикал не е разтворим или не образува стабилна дисперсия в предходните два разтворителя/носителя, до крайни концентрации от 100 mg/ml (във физиологичен разтвор или среда) или 500 mg/ml (в DMSO). Могат да се използват и други разтворители/носители, освен описаните по-горе, при предоставяне на достатъчна научна обосновка. Следва да се вземе предвид стабилността на изпитвания химикал в крайния разтворител/носител.

15. Като се започне от изходните разтвори от 100 mg/ml (във физиологичен разтвор или среда) или 500 mg/ml (в DMSO) на изпитваните химикали, следва да се направят следните стъпки на разреждане:

- За физиологичен разтвор или среда като разтворител/носител: Приготвят се осем изходни разтвора (осем концентрации) чрез серия от двукратни разреждания, като се използва съответният разтворител/носител. След това тези изходни разтвори се разреждат 50-кратно в среда за отглеждане (работни разтвори). Ако горната крайна концентрация в плаката от 1000 µg/ml е нетоксична, максималната концентрация следва да се определи отново чрез провеждането на ново изпитване за цитотоксичност. Крайната концентрация в плаката не трябва да надвишава 5000 µg/ml за изпитвани химикали, разтворени или стабилно диспергирани във физиологичен разтвор или среда.
- За DMSO като разтворител/носител: Приготвят се осем изходни разтвора (осем концентрации) чрез серия от двукратни разреждания, като се използва съответният разтворител/носител. След това тези изходни разтвори се разреждат допълнително 250-кратно в среда за отглеждане (работни разтвори). Крайната концентрация в плаката не трябва да надвишава 1000 µg/ml, дори ако тази концентрация не е токсична.

Работните разтвори в крайна сметка се използват за експозиция чрез добавяне на равен обем работен разтвор към обема на суспензията от ТНР-1 клетки в плаката (вж. също точка 17) за постигане на допълнително двукратно разреждане (обикновено, окончателният обхват на концентрациите в плаката е 7,81—1000 µg/ml).

16. Контролата на разтворител/носител, използвана в метода h-CLAT, е среда за отглеждане (за изпитвани химикали, които са разтворени или трайно диспергирани (вж. точка 4) или в среда, или във физиологичен разтвор), или DMSO (за изпитвани химикали, които са разтворени или трайно диспергирани в DMSO), изпитвана при единична крайна концентрация от 0,2 % в плаката. Тя се подлага на същото разреждане, както е описано за работните разтвори в точка 15.

Прилагане на изпитваните химикали и веществата за контроли

17. Средата за отглеждане или работните разтвори, описани в точки 15 и 16, се смесват 1: 1 (v/v) с клетъчните суспензии, подготвени в 24-ямковата или 96-ямковата плоскодънна плака (вж. точка 12). След това третираните плаки се инкубират за $24 \pm 0,5$ часа при 37 °C под 5 % CO₂. Следва да се вземат мерки за избягване на изпаряването на летливи изпитвани химикали и на кръстосаното замърсяване с изпитвани химикали между ямките, като напр. плаките се запечатат преди инкубирането с изпитваните химикали (20).

Оцветяване с пропидиев йодид (PI)

18. След $24 \pm 0,5$ часа експозиция клетките се прехвърлят в епруветки и се събират чрез центрофугиране. Супернатантите се изхвърлят и оставащите клетки се ресуспендират с 200 μl (в случай на 96-ямкова) или 600 μl (в случай на 24-ямкова плака) фосфатно буфериран физиологичен разтвор, съдържащ 0,1 % говежди серумен албумин (оцветяващ буфер). 200 μl от клетъчната суспензия се прехвърлят в 96-ямкова облодънна плака (в случай на 96-ямкова) или в микроепруветка (в случай на 24-ямкова) и се промиват два пъти с 200 μl (в случай на 96-ямкова) или 600 μl (в случай на 24-ямкова) оцветяващ буфер. Накрая, клетките се ресуспендират в оцветяващ буфер (напр. 400 μl) и се добавя PI разтвор (напр. 20 μl) (например, крайната концентрация на PI е 0,625 $\mu\text{g/ml}$). Други маркери за цитотоксичност, като 7-аминоактиномицин D (7-AAD), трипаново синьо или други, могат да бъдат използвани, ако може да се докаже, че алтернативните оцветители осигуряват сходни резултати като PI, например чрез изпитване на веществата за пригодност от допълнение 1.2.

Измерване на цитотоксичността чрез поточна цитометрия и оценка на стойността на CV75

19. Фиксацията на PI се анализира с помощта на поточна цитометрия с канал за придобиване на данни FL-3. Придобиват се данни за общо 10 000 живи клетки (PI-отрицателни). Клетъчната жизнеспособност може да бъде изчислена с помощта на следната формула от програмата за анализ на цитометъра. Когато клетъчната жизнеспособност е малка, следва да се придобият данни за до 30 000 клетки, включително мъртви клетки. Друга възможност е данните да бъдат придобити в продължение на една минута след започването на анализа.

$$\text{Cell viability} = \frac{\text{Number of living cells}}{\text{Total Number of aquired cells}} \times 100$$

Стойността на CV75 (вж. точка 13), т.е. концентрация, показваща 75 % преживяемост на клетки (25 % цитотоксичност), се изчислява чрез log-линейна интерполация, като се използва следното уравнение:

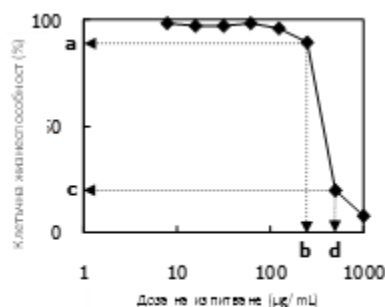
$$\text{Log CV75} = \frac{(75-c) \times \text{Log}(b) - (75-a) \times \text{Log}(d)}{a-c}$$

където:

a е минималната стойност на клетъчната жизнеспособност над 75 %

c е максималната стойност на клетъчната жизнеспособност под 75 %

b и d са концентрациите, показващи съответно стойността на клетъчната жизнеспособност a и c



Могат да се използват други подходи за извеждане на CV75, при условие че се докаже, че това няма въздействие върху резултатите (напр. чрез изпитване на веществата за изпитване за пригодност).

Измерване на експресията на CD86/CD54

Приготвяне на изпитваните химикали и веществата за контроли

20. Подходящият разтворител/носител (физиологичен разтвор, среда или DMSO; вж. точка 14) се използва за разтваряне или трайно диспергиране на изпитваните химикали. Изпитваните химикали се разреждат първо до концентрацията, съответстваща на 100-кратна (за физиологичен разтвор или среда) или 500-кратна (за DMSO) на $1,2 \times CV75$, определена в *изследването за определяне на дозата* (вж. точка 19). Ако не може да се определи CV75 (т.е. ако в *изпитването за определяне на дозата* не се наблюдава достатъчна цитотоксичност), като начална концентрация следва да се използва концентрацията на най-голямата разтворимост или най-стабилна дисперсия на изпитвания химикал, приготвен с всеки разтворител/носител. Обърнете внимание, че крайната концентрация в плаката не следва да надвишава 5000 µg/ml (в случай на физиологичен разтвор или среда) или 1000 µg/ml (в случай на DMSO). След това се правят 1,2-кратни серийни разреждания със съответния разтворител/носител, за да се получат изходните разтвори (осем концентрации, обхващащи от $100 \times 1,2 \times CV75$ до $100 \times 0,335 \times CV75$ (за физиологичен разтвор или среда) или от $500 \times 1,2 \times CV75$ до $500 \times 0,335 \times CV75$ (за DMSO)), които да бъдат изпитани при метода h-CLAT (вж. DB-ALM протокол № 158 за пример на схема за дозиране). След това изходните разтвори се разреждат допълнително 50-кратно (за физиологичен разтвор или среда) или 250-кратно (за DMSO) в среда за отглеждане (работни разтвори). Тези работни разтвори в крайна сметка се използват за експозиция, с допълнително крайно двукратно разреждане в плаката. Ако резултатите не отговарят на критериите за приемливост, описани в точки 29 и 30, по отношение на клетъчната жизнеспособност, може да се повтори *изследването за определяне на дозата*, за да се определи по-точно CV75. Моля, имайте предвид, че

само 24-ямкови плаки могат да бъдат използвани за измерване на експресия на CD86/CD54.

21. Контролата на разтворител/носител се приготвя както е описано в точка 16. Положителната контрола, използвана в метода h-CLAT, е DNCB (вж. точка 11), за която изходните разтвори се приготвят в DMSO и се разреждат както е описано за изходните разтвори в точка 20. DNCB следва да се използва като положителната контрола за *измерване на експресията на CD86/CD54* при крайна единична концентрация в плаката (обикновено 4,0 µg/ml). За получаване на концентрация на DNCB от 4,0 µg/ml в плаката се приготвя 2 mg/ml изходен разтвор на DNCB в DMSO и допълнително се разрежда 250-кратно със среда за отглеждане до 8 µg/ml работен разтвор. Като алтернатива, CV75 на DNCB, която се определя на всяко място за изпитване, също може да се използва като концентрация на положителна контрола. Могат да се използват други подходящи положителни контроли, ако има налични данни за предходни периоди, за извеждане на сравними критерии за приемливост на серията. За положителни контроли крайната единична концентрация в плаката не следва да надвишава 5000 µg/ml (в случай на физиологичен разтвор или среда) или 1000 µg/ml (в случая на DMSO). Критериите за приемливост на серията са същите като тези, които са описани за изпитвания химикал (вж. точка 29), с изключение на последния критерий за приемливост, тъй като положителната контрола се изпитва при една-единствена концентрация.

Прилагане на изпитваните химикали и веществата за контроли

22. За всеки изпитван химикал и за вещество за контроли е необходим един експеримент, за да се получи прогноза. Всеки експеримент се състои от поне две независими серии за *измерване на експресията на CD86/CD54* (вж. точки 26—28). Всяка независима серия се извършва в различен ден или в рамките на един и същи ден, при условие че за всяка серия: а) се приготвят независими пресни изходни разтвори и работни разтвори на изпитвания химикал и разтвори на антитела, и б) използват се независимо събрани клетки (т.е. клетките се събират от различни колби за отглеждане); въпреки това, клетките могат да са от един и същ пасаж. Изпитваните химикали и веществата за контроли, приготвени като работни разтвори (500 µl), се смесват с 500 µl от суспендираните клетки (1×10^6 клетки) при съотношение 1:1, и клетките се инкубират за $24 \pm 0,5$ часа, както е описано в точки 20 и 21. За всяка серия единично повторение за всяка концентрация на изпитвания химикал и вещество за контроли е достатъчно, защото прогноза се получава от най-малко две независими серии.

Оцветяване и анализ на клетките

23. След $24 \pm 0,5$ часа експозиция клетките се прехвърлят от 24-ямкови плаки в епруветки, събират се чрез центрофугиране и след това се промиват два пъти с 1 ml оцветяващ буфер (ако е необходимо, могат да се предприемат допълнителни стъпки на промиване). След промиване клетките се блокират с 600 μ l блокиращ разтвор (оцветяващ буфер, съдържащ 0,01 % (w/v) глобулин (Cohn фракция II, III, човешки; SIGMA, # G2388—10G или еквивалентен) и се инкубират при температура 4 °C в продължение на 15 минути. След блокирането клетките се разделят на три аликвотни части от по 180 μ l в 96-ямкова облодънна плака или микроепруветка.
24. След центрофугирането клетките се оцветяват с 50 μ l маркирани с FITC анти-CD86, анти-CD54 или миши антитела от (изотип) IgG1 при 4 °C в продължение на 30 минути. Антителата, описани в DB-ALM протокол № 158 за h-CLAT (18) следва да се използват чрез разреждане 3: 25 v/v (за CD86 (BD-PharMingen, # 555657; Clone: Fun-1)) или 3:50 v/v (за CD54 (DAKO, # F7143; Clone: 6.5B5) и IgG1 (DAKO, # X0927) с оцветяващ буфер. Тези коефициенти на разреждане на антитела са определени от разработилите изпитването като такива, които осигуряват най-доброто съотношение сигнал/шум. Въз основа на опита на разработилите изпитването интензитетът на флуоресценцията на антителата обикновено е последователен между различните партии. Въпреки това ползвателите могат да разгледат титруване на антитела в условията на собствената си лаборатория, за определяне най-добрите концентрации за използване. Могат да се използват и други маркирани с флуорхром анти-CD86 и/или анти-CD54 антитела, ако може да се докаже, че те осигуряват сходни резултати като FITC-конюгираните антитела, например чрез изпитване на веществата за пригодност от допълнение 1.2. Следва да се отбележи, че промяната на клона или доставчика на антителата, описани в DB-ALM протокол № 158 за h-CLAT (18), може да повлияе на резултатите. След промиване два или повече пъти с 150 μ l оцветяващ буфер, клетките се ресуспендират в оцветяващ буфер (напр. 400 μ l), и се добавя PI-разтворът (напр. 20 μ l за получаване на крайна концентрация от 0,625 μ g/ml) или друг разтвор на маркер за цитотоксичност (вж. точка 18). Нивата на експресията на CD86 и CD54 и клетъчната жизнеспособност се анализират с помощта на поточна цитометрия.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ

Оценка на данните

25. Експресията на CD86 и CD54 се анализира с помощта на поточна цитометрия с канал за придобиване на данни FL-1. Въз основа на средната геометрична стойност на интензитета на флуоресценция (MFI) по следното уравнение се изчислява относителният интензитет на флуоресценцията (RFI) на CD86 и CD54 за клетки от положителни контроли (ctrl) и третирани с химикал клетки:

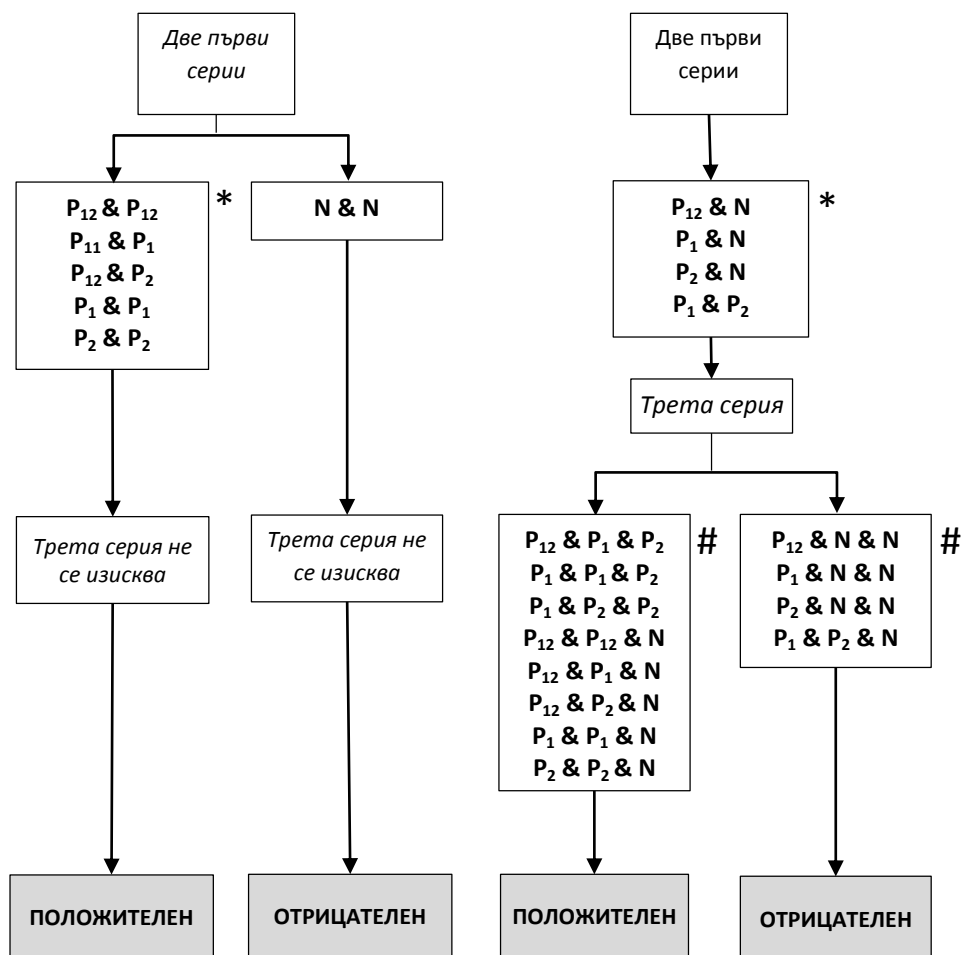
$$RFI = \frac{MFI \text{ of chemical-treated cell} - MFI \text{ of chemical-treated isotype control cells}}{MFI \text{ of solvent/vehicle-treated ctrl cells} - MFI \text{ of solvent/vehicle-treated isotype ctrl cells}} \times 100$$

Клетъчната жизнеспособност на клетките от контролата с изотип (ctrl) (които се оцветяват с миши антитела от (изотип) IgG1, се изчислява също в съответствие с формулата, описана в точка 19.

Модел на прогнозиране

26. За измерване на експресията на *CD86/CD54* всеки изпитван химикал се изпитва в най-малко две независими серии с цел да се изведе единична прогноза (ПОЛОЖИТЕЛНА или ОТРИЦАТЕЛНА). Прогнозата на h-CLAT се счита за ПОЛОЖИТЕЛНА, ако поне едно от следните условия е изпълнено през 2 от 2 или в най-малко 2 от 3 независими серии, в противен случай прогнозата на h-CLAT се счита за ОТРИЦАТЕЛНА (фигура 1):
 - RFI на CD86 е равен на 150 % или по-голям при всяка изпитвана концентрация (с клетъчна жизнеспособност ≥ 50 %);
 - RFI на CD54 е равен на 200 % или по-голям при всяка изпитвана концентрация (с клетъчна жизнеспособност ≥ 50 %);
27. Въз основа на горното, ако и двете първи серии са едновременно положителни за CD86 и/или са едновременно положителни за CD54, прогнозата на h-CLAT се счита за ПОЛОЖИТЕЛНА и не е необходимо да се провежда трета серия. По подобен начин, ако първите две серии са отрицателни за двата маркера, прогнозата на h-CLAT се счита за ОТРИЦАТЕЛНА (при надлежно отчитане на предвиденото в точка 30), без да е необходимо да се провежда трета серия. Ако обаче първите две серии не са съгласувани за поне един от маркерите (CD54 или CD86), е необходима трета серия и окончателната прогноза ще се базира на мажоритарния резултат от трите отделни серии (т.е. 2 от 3). В това отношение следва да се отбележи, че ако се провеждат два независими серии и едната е положителна само за CD86 (наричана по-долу P₁), а другата е положителна само за CD54 (наричана по-долу P₂), е необходима трета серия. Ако тази трета серия е отрицателна и за двата маркера (наричана по-долу N), се счита, че прогнозата на h-CLAT е ОТРИЦАТЕЛНА. От друга страна, ако третата серия е положителна за който и да е маркер (P₁ или P₂), или и за двата маркера (наричана по-долу P₁₂), прогнозата на h-CLAT се счита за ПОЛОЖИТЕЛНА.

Фигура 1: Модел на прогнозиране, използван при метода h-CLAT. Прогнозата по h-CLAT следва да се разглежда в рамките на IATA и в съответствие с разпоредбите на точки 7 и 8 от Общото въведение.



P₁: серия с положителен само CD86; P₂: серия с положителен само CD54; P₁₂: серия с положителни както CD86, така и CD54; N: серия при която положителни не са нито CD86, нито CD54.

* Клетките показват относимите комбинации от резултатите от първите две серии, независимо от реда, в който могат да бъдат получени.

#Клетките показват относимите комбинации от резултатите от трите серии въз основа на резултатите, получени в първите две серии, показани в горната клетка, но не отразяват реда, в който могат да бъдат получени.

28. За изпитваните химикали, прогнозирани като ПОЛОЖИТЕЛНИ по h-CLAT, по избор могат да бъдат определени две стойности на ефективни концентрации (EC) — EC150 за CD86 и EC200 за CD54, т.е. концентрацията, при която изпитваните химикали индуцират RFI от 150 или 200. Тези EC могат да допринесат за оценката на потенциала за сенсibiliзация (9), когато се използват в интегрирани подходи, като

например IATA (4) (5) (6) (7) (8). Те могат да бъдат изчислени по следните уравнения:

$$EC150 \text{ (for CD86)} = B_{conc} + [(150 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC200 \text{ (for CD54)} = B_{conc} + [(200 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

където:

A_{conc} е най-ниската концентрация в $\mu\text{g/ml}$ с $RFI > 150$ (CD86) или 200 (CD54)

B_{conc} е най-високата концентрация в $\mu\text{g/ml}$ с $RFI < 150$ (CD86) или 200 (CD54)

A_{RFI} е RFI при най-ниската концентрация с $RFI > 150$ (CD86) или 200 (CD54)

B_{RFI} е RFI при най-високата концентрация с $RFI < 150$ (CD86) или 200 (CD54)

За целите на по-точното извеждане на стойностите на EC150 и EC200 могат да се изискват три независими серии за измерване на експресията на CD86/CD54. Крайните стойности на EC150 и EC200 след това се определят като медианната стойност на EC, изчислена от трите независими серии. Когато само две от трите независими серии отговарят на критериите за положителност (вж. точки 26—27), се приема по-високата EC150 или EC200 от двете изчислени стойности.

Критерии за приемливост

29. Когато се използва методът h-CLAT трябва да се спазват следните критерии за приемливост (22) (27).

- Клетъчната жизнеспособност в средата и в контролите на разтворител/носител следва да е по-висока от 90 %.
- В контролата на разтворител/носител RFI стойностите както на CD86, така и на CD54 не трябва да надвишават положителните критерии (CD86 $RFI \geq 150\%$ и CD54 $RFI \geq 200\%$). RFI стойностите на контролата на разтворител/носител се изчисляват, като се използва формулата, описана в точка 25 („MFI на химикала“ следва да се замени с „MFI на разтворителя/носителя“, а „MFI на разтворителя/носителя“ следва да се замени с „MFI на контрола (на среда)“).
- За контролите както на среда, така и на разтворител/носител, MFI отношението както на CD86, така и на CD54 към контролата с изотип, следва да бъде $> 105\%$.
- При положителната контрола (DNCB) RFI стойностите както на CD86, така и на CD54, следва да отговарят на положителните критерии (CD86 $RFI \geq 150$ и CD54 $RFI \geq 200$) и клетъчната жизнеспособност следва да бъде повече от 50 %.
- За изпитвания химикал клетъчната жизнеспособност следва да бъде повече от 50 % в най-малко четири изпитвани концентрации за всяка серия.

30. Отрицателни резултати са допустими само за изпитвани химикали, при които клетъчната жизнеспособност е по-малка от 90 % при най-високата изпитвана концентрация (т.е. $1,2 \times CV75$ в съответствие със схемата за серийно разреждане, описана в точка 20). Ако клетъчната жизнеспособност при $1,2 \times C75$ е равна или по-висока от 90 %, отрицателният резултат следва да бъде отстранен. В такъв случай се препоръчва да се направи опит за прецизиране на избора на доза чрез повтаряне на определянето на $CV75$. Следва да се отбележи, че когато 5000 $\mu\text{g/ml}$ във физиологичен разтвор (или среда, или други разтворители/носители), 1000 $\mu\text{g/ml}$ в DMSO или най-високата разтворима концентрация се използват като максимална концентрация на изпитвания химикал, приемливо е наличието на отрицателен резултат, дори ако клетъчната жизнеспособност е над 90 %.

Протокол от изпитването

31. Протоколът от изпитването следва да включва следната информация.

Изпитван химикал

Вещество с една съставка:

- Химична идентификация, като наименование(я) по IUPAC или по CAS, CAS номер(а), SMILES или InChI код, структурна формула, и/или други идентификатори;
- Външен вид, Log Kow, разтворимост във вода, разтворимост в DMSO, молекулно тегло и допълнителни относими физични и химични свойства, според наличността;
- Чистота, химическа идентичност на онечистванията, както е целесъобразно и практически осъществимо и т.н.;
- Обработка преди изпитването, ако се прилага (напр. затопляне, смилане);
- Изпитвана концентрация (концентрации);
- Условия на съхранение и стабилност, доколкото са налични;
- Обосновка за избора на разтворител/носител за всеки изпитван химикал.

Вещество с повече съставки, UVCB и смес

- характеризиране, доколкото е възможно, чрез химическата идентичност (вж. по-горе), чистотата, количествения състав и относимите физични и химични свойства на съставките (вж. по-горе), доколкото са налични.
- Външен вид, разтворимост във вода, разтворимост в DMSO и допълнителни относими физични и химични свойства, според наличността;

- Молекулно тегло или привидно молекулно тегло в случай на смеси/полимери с известен състав или друга информация, относима към провеждането на изследването;
- Обработка преди изпитването, ако се прилага (напр. затопляне, смилане);
- Изпитвана концентрация (концентрации);
- Условия на съхранение и стабилност, доколкото са налични;
- Обосновка за избора на разтворител/носител за всеки изпитван химикал.

Контроли

Положителна контрола

- Химична идентификация, като наименование(я) по IUPAC или по CAS, CAS номер(а), SMILES или InChI код, структурна формула, и/или други идентификатори;
- Външен вид, Log K_{ow} , разтворимост във вода, разтворимост в DMSO, молекулно тегло и допълнителни относими физични и химични свойства, според наличността, където е приложимо;
- Чистота, химическа идентичност на онечистванията, както е целесъобразно и практически осъществимо и т.н.;
- Обработка преди изпитването, ако се прилага (напр. затопляне, смилане);
- Изпитвана концентрация (концентрации);
- Условия на съхранение и стабилност, доколкото са налични;
- Препратка към резултатите за положителните контроли за предходни периоди, доказващи подходящи критерии за приемливост на серията, ако е приложимо.

Отрицателна контрола и контрола на разтворител/носител

- Химична идентификация, като наименование(я) по IUPAC или по CAS, CAS номер(а), SMILES или InChI код, структурна формула, и/или други идентификатори;
- Чистота, химическа идентичност на онечистванията, както е целесъобразно и практически осъществимо и т.н.;
- Външен вид, молекулно тегло и допълнителни относими физични и химични свойства, в случай че са използвани разтворители/носители, различни от упоменатите в Насоките за изпитване и в зависимост от наличността;
- Условия на съхранение и стабилност, доколкото са налични;
- Обосновка за избора на разтворител/носител за всеки изпитван химикал.

Условия на изпитване

- Име и адрес на финансиращия, на изпитващата лаборатория и на ръководителя на изследването;
- Описание на използваното изпитване;
- Използвана клетъчна линия, условия за нейното съхранение и източник (например мястото, от което са взети);
- Използвана поточна цитометрия (например модел), включително инструментални настройки, глобулин, антитела и маркер за цитотоксичност;
- Процедурата, използвана за доказване на пригодността на лабораторията за провеждане на изпитването чрез изпитване на вещества за изпитване за пригодност, и процедурата, използвана за доказване на възпроизводимостта на резултатите от изпитването с течение на времето, например данни за контролите за предходни периоди и/или данни от предходни проверки за реакционна способност.

Критерии за приемане на изпитването

- Клетъчна жизнеспособност, MFI и RFI стойности, получени с контролата на разтворител/носител в сравнение с допустимия размах;
- Клетъчна жизнеспособност и RFI стойности, получени с положителната контрола в сравнение с допустимия размах;
- Клетъчна жизнеспособност при всички изпитвани концентрации на изпитвания химикал.

Процедура за изпитване

- Брой на използваните серии;
- Концентрации на изпитвания химикал, продължителност на прилагане и време на експозицията (при различие от препоръчаното)
- Продължителност на експозицията (ако е различна от препоръчаната);
- Описание на използваните критерии за оценка и за решение;
- Описание на всякакви изменения на процедурата за изпитване.

Резултати

- Таблично представяне на данните, включително на CV75 (ако е приложимо), индивидуални геометрични MFI, RFI, стойности за клетъчната жизнеспособност, стойности EC150/EC200 (ако е приложимо), получени за изпитвания химикал и за

положителната контрола за всяка серия, като се посочва рангът на изпитвания химикал в съответствие с модела на прогнозиране;

- Описание на всякакви други относими наблюдения, ако е приложимо.

Обсъждане на резултатите

- Обсъждане на резултатите, получени с метода h-CLAT;
- Разглеждане на резултатите от изпитването в рамките на контекста на IATA, ако е налична друга относима информация.

Заключения

ЛІТЕРАТУРА

- (1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro* 20, 767–773.
- (2) Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol. In Vitro* 21, 428-437.
- (3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Доступно на: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J Appl Toxicol.* 35, 1318-1332.
- (5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. *J Appl Toxicol.* 35, 1333-1347.
- (6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul Toxicol Pharmacol.* 63, 489-504.
- (7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 69, 371-379.
- (8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol.* 71, 337-351.

- (9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch Toxicol.* 89, 2355-2383.
- (10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol.* DOI 10.1002/jat.3281.
- (11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro* 26, 1150-60.
- (12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Доступно на: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing>
- (13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report Accessible at: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.* 38, 599-609.
- (15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
- (16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch Toxicol* 87, 1683-1699.
- (17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6th report): A study for

- evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.
- (18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Достъпно на: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
- (19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamoto K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70-82.
- (20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, , Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89-96.
- (21) OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 2005, 96 pp.
- (22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No 168. На разположение на адрес: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- (23) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. На разположение на адрес: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).
- (25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27-35.

Допълнение 1.1

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Точност: степента на близост между резултатите от изпитването и приетите референтни стойности. Това е мярка за ефективността на изпитването и един от аспектите на неговата относимост. Терминът често се използва взаимозаменяемо с термина „съответствие“, за да се обозначи относителният дял на правилните резултати при дадено изпитване (21).

АОР (път, водещ до неблагоприятен ефект): последователност от събития от химичната структура на целеви химикал или група от сходни химикали през молекулното инициращо събитие до представляващ интерес *in vivo* резултат (22).

Химикал: Вещество или смес.

CV75: Прогнозната концентрация, показваща клетъчна жизнеспособност 75 %.

EC150: концентрациите, показващи стойности на RFI от 150 на експресията на CD86

EC200: концентрациите, показващи стойности на RFI от 200 на експресията на CD54

Поточна цитометрия: цитометрична техника, при която клетките, суспендирани в течност, се движат в поток една по една във времето през фокус на възбуждаща светлина, която се разсейва по начини, характерни за клетките и техните компоненти; клетките често се маркират с флуоресцентни маркери, така че светлината първо се абсорбира и след това се излъчва при изменени честоти.

Опасност: Вътрешно присъщо свойство на даден агент или ситуация, притежаващо потенциал да предизвика неблагоприятни ефекти когато един организъм, система или (суб-)популация бъдат експонирани на този агент.

IATA (интегриран подход за изпитване и оценка): Структуриран подход, използван за идентифициране на опасност (потенциал), характеризиране на опасност (потенциал) и/или оценка на безопасността (потенциал и експозиция) на даден химикал или група от химикали, който стратегически интегрира и претегля всички данни, относими към предоставянето на информация за вземането на регулаторно решение по отношение на потенциалната опасност и/или риска, и/или необходимостта от допълнително целенасочено и следователно минимално изпитване.

Контрола на среда: Нетретирано повторение, съдържащо всички компоненти на дадена изпитвана система. Тази проба се обработва с пробите, третирани с изпитвания химикал, и с други контролни проби, за определяне дали разтворителят/носителът взаимодейства с изпитваната система.

Смес: смес или разтвор, съставени от две или повече вещества.

Вещество с една съставка: Вещество, определено от неговия количествен състав, в който съдържанието на една основна съставка е най-малко 80 % (w/w).

Вещество с повече съставки: Вещество, определено от неговия количествен състав, в който повече от една основна съставка се съдържа в концентрация $\geq 10\%$ (w/w) и $< 80\%$ (w/w). Веществото с повече съставки е резултат от производствен процес. Разликата между смес и вещество с повече съставки е, че дадена смес е получена чрез смесване на две или повече вещества без химична реакция. Веществото с повече съставки е резултат от химична реакция.

Положителна контрола: Повторение, съдържащо всички компоненти на дадена изпитвана система и третирано с вещество, за което е известно, че предизвиква положителен отклик. За да гарантира, че може да се направи оценка на варирането на отклика в положителната контрола във времето, големината на положителния отклик не следва да е прекомерна.

Пре-хаптени: химикали, които стават сенсibiliзатори чрез абиотично преобразуване

Про-хаптени: химикали, които изискват ензимно активиране за реализирането на потенциал за кожна сенсibilизация

Относителен интензитет на флуоресценцията (RFI): Относителни стойности на средногеометричната стойност на интензитета на флуоресценция (MFI) в третираните с химикал клетки в сравнение с MFI в клетки, третирани с разтворител/носител.

Относителност: описание на взаимовръзката между изпитването и ефекта, представляващ интерес, и дали тя е значима и полезна за определена цел. Това е степента, в която изпитването правилно измерва или прогнозира биологичния ефект, представляващ интерес. Относителността включва разглеждане на точността (съответствието) на дадено изпитване (21).

Надеждност: мярка за степента, в която дадено изпитване може да се извърши възпроизводимо в една и съща лаборатория и в различни лаборатории по различно време, като при извършването се използва един и същи протокол. Оценката за нея се прави, като се изчислява вътрешнолабораторната и междулабораторната възпроизводимост и вътрешнолабораторната повтораемост (21).

Серия: Серията представлява един или повече изпитвани химикали, изпитвани едновременно с контрола на разтворител/носител и с положителна контрола.

Чувствителност: Относителният дял от всички положителни/активни химикали, които са класифицирани правилно чрез изпитването. Това е мярка за точността на изпитване, което предоставя категорийни резултати и е важен фактор при оценката на

относимостта на дадено изпитване.

Оцветяващ буфер: Фосфатно буфериран физиологичен разтвор, съдържащ 0,1 % говежди серумен албумин.

Контрола на разтворител/носител: Нетретирана проба, съдържаща всички компоненти на изпитваната система, с изключение на изпитвания химикал, но включваща разтворителя/носителя, който се използва. Използва се за определяне на базовия отклик за пробите, третирани с изпитвания химикал, разтворен или стабилно диспергиран в същия разтворител/носител. Когато се изпитва с паралелна контрола на среда, тази проба показва също дали разтворителят/носителът взаимодейства с изпитваната система.

Специфичност: Относителният дял от всички отрицателни/неактивни химикали, които са класифицирани правилно чрез изпитването. Това е мярка за точността на изпитването, което предоставя категорийни резултати и е важен фактор при оценката на относимостта на дадено изпитване (21).

Вещество: означава химичен елемент и неговите съединения в естествено състояние или получени чрез всеки производствен процес, включително всяка добавка, необходима за запазване на неговата стабилност и всеки примес, извлечен от използвания процес, с изключение на всеки разтворител, който може да бъде отделен, без да се засяга стабилността на веществото или да се променя неговият състав.

Изпитван химикал: Всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод.

Глобална хармонизирана система на Организацията на обединените нации за класифициране и етикетиране на химикали (GHS на ООН): система, предлагаща класифициране на химикали (вещества и смеси) според стандартизирани видове и степени на физическа, здравна и екологична опасност и разглеждаща съответни съобщителни елементи, като например пиктограми, сигнални думи, предупреждения за опасност, препоръки за безопасност и информационни листове за безопасност, така че те да съобщават информация за тяхното неблагоприятно въздействие с оглед защита на хората (включително работодатели, работещи, служители в транспорта, потребители и аварийни служители) и на околната среда (23).

UVCB: вещества с неизвестен или променлив състав, сложни продукти от реакции или биологични материали.

Валидно изпитване: Изпитване, за което се смята, че притежава достатъчна относимост и надеждност по отношение на конкретна цел и което се основава на научно обосновани принципи. Дадено изпитване никога не е валидно в абсолютен смисъл, а само по отношение на определена цел (21).

Допълнение 1.2

ВЕЩЕСТВА ЗА ИЗПИТВАНЕ ЗА ПРИГОДНОСТ

Преди рутинното използване на изпитването, описано в настоящото допълнение към метод за изпитване Б.71, лабораториите следва да докажат техническата си компетентност, като правилно получат очакваната прогноза по h-CLAT за 10-те вещества, препоръчани в Таблица 1, и чрез получаване на стойности за CV75, EC150 и EC200, които попадат в съответния референтен обхват за минимум 8 от 10-те вещества за изпитване за пригодност. Веществата за изпитване за пригодност са подбрани като представителни за размаха от отклици за опасностите от кожна сенсibilизация. Други критерии за подбор бяха веществата да са налични в търговската мрежа и да са налични висококачествени *in vivo* референтни данни, както и висококачествени *in vitro* данни, получени по метода h-CLAT. Също така са налични публикувани референтни данни за метода h-CLAT (3) (14).

Таблица 1: Препоръчвани вещества за доказване на техническа пригодност по отношение на метода h-CLAT

Вещества за изпитване за пригодност	CAS №	Агрегатно състояние	<i>In vivo</i> прогноза ¹	CV75 Позоваване Размах в µg/ml ²	резултати от h-CLAT за CD86 (референтен за EC150 размах в µg/ml ²)	резултати от h-CLAT за CD54 (референтен за EC200 размах в µg/ml ²)
2,4-Динитрохлоробензен	97-00-7	Твърд	Сенсибилизатор (изключително силен)	2-12	Положително (0,5-10)	Положително (0,5-15)
4-Фенилендиамин	106-50-3	Твърд	Сенсибилизатор (силен)	5-95	Положително (<40)	Отрицателно (>1,5) ³
Никелов сулфат	10101-97-0	Твърд	Сенсибилизатор (умерен)	30-500	Положително (<100)	Положително (10-100)
2-Меркаптобензотиазол	149-30-4	Твърд	Сенсибилизатор (умерен)	30-400	Отрицателно (>10) ³	Положително (10-140)
R(+)-Лимонен	5989-27-5	Течност	Сенсибилизатор (слаб)	>20	Отрицателно (>5) ³	Положително (<250)
Имидазолидинилуреа	39236-46-9	Твърд	Сенсибилизатор (слаб)	25-100	Положително (20-90)	Положително (20-75)
Изопропанол	67-63-0	Течност	Непредизвикващо сенсibilизация вещество	>5000	Отрицателно (>5000)	Отрицателно (>5000)
Глицерол	56-81-5	Течност	Непредизвикващо сенсibilизация вещество	>5000	Отрицателно (>5000)	Отрицателно (>5000)
Млечна киселина	50-21-5	Течност	Непредизвикващо	1500-5000	Отрицателно (>5000)	Отрицателно (>5000)

			сенсифицира я вещество			
4-Аминобензоена киселина	150-13-0	Твърд	Непредизвиква що сенсифицира я вещество	>1000	Отрицателно (>1000)	Отрицателно (>1000)

Съкращения: CAS № = регистрационен номер по Службата за химични индекси.

¹ *In vivo* прогнозата за опасност и (потенциал) се основава на данни от LLNA (3) (14). *In vivo* потенциалът е изведен с използване на критериите, предложени от ECETOC (24).

² Въз основа на наблюдавани стойности за предходни периоди (13) (25).

³ По данни за предходни периоди, за този маркер са получени мнозинство от отрицателни резултати и следователно отрицателният резултат се очаква в най-голяма степен. Предоставеният размах беше определен въз основа на малкото наблюдавани положителни резултати за предходни периоди. В случай че е получен положителен резултат, ЕС-стойността следва да бъде в протоколирания референен размах.

Допълнение 2

***IN VITRO* КОЖНА СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ: ИЗПИТВАНЕ С АКТИВИРАНЕ НА КЛЕТЪЧНА ЛИНИЯ U937 (U-SENS™)**

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

1. U-SENS™ изпитването определя количествено промяната в експресията на повърхностен клетъчен маркер, свързана с процеса на активиране на моноцити и дендритни клетки (ДК) (т.е. CD86) в клетъчна линия U937 на хистиоцитен лимфом при човека след експозиция на сенсibiliзиращи вещества (1). Измерените нива на експресия на повърхностния клетъчен маркер CD86 в клетъчна линия U937 се използват след това за подпомагане на разграничаването между кожни сенсibiliзатори и непредизвикващи сенсibiliзация вещества.
2. U-SENS™ изпитването е било обект на оценка в изследване за валидиране (2), координирано от L'Oreal, и впоследствие на независима партньорска проверка от страна Научния консултативен комитет (ESAC) на референтната лаборатория на Европейския съюз за алтернативи на изпитванията върху животни (EURL ECVAM) (3). Като взе предвид всички налични доказателства и данни от регулаторните органи и заинтересованите страни, EURL ECVAM препоръча U-SENS™ (4) за използване като част от IATA за подкрепа на разграничаването между сенсibiliзатори и непредизвикващи сенсibiliзация вещества за целите на класифицирането на опасността и етиктирането. В своя документ с насоки относно протоколирането на структурирани подходи към интеграцията на данните и индивидуалните източници на информация, използвани в рамките на IATA за кожна сенсibiliзация, понастоящем ОИСП обсъжда редица проучвания на конкретни случаи, описващи различни стратегии за изпитване и модели за прогнозиране. Един от различните определени подходи се основава на U-SENS изследването (5). Примери за използването на данни от U-SENS™ в комбинация с друга информация, включително данни за предходни периоди и налични валидни данни за човека (6), също са докладвани на друго място в литературата (4) (5) (7).
3. Беше показано, че U-SENS™ изпитването може да се прехвърли на лаборатории с опит в областта на техниките за клетъчна култура и анализа с поточна цитометрия. Нивото на възпроизводимостта в прогнозите, което може да се очаква от изпитването, е от порядъка на 90 % и 84 % съответно вътре в самата лаборатория и между лабораториите (8). Резултатите, получени в изследването за валидиране (8) и други публикувани изследвания (1) като цяло показват, че в сравнение с резултатите от LLNA точността при разграничаването на кожните сенсibiliзатори (т.е.

категория 1 по GHS на OOH/CLP) от непредизвикващи сенсibilизация вещества е 86 % (N = 166), с чувствителност от 91 % (118/129) и специфичност от 65 % (24/37). В сравнение с резултатите при човека точността при разграничаването на кожни сенсibilизатори (т.е. категория 1 по GHS на OOH/CLP) от непредизвикващи сенсibilизация вещества е 77 % (N = 101), с чувствителност от 100 % (58/58) и специфичност от 47 % (20/43). Има по-голяма вероятност, в сравнение с LLNA, неверните отрицателни прогнози, свързани с U-SENSTM, да се отнасят за химикали, които са с малък до умерен потенциал за кожна сенсibilизация (т.е. кожна сенсibilизация подкатегория 1B по GHS на OOH/CLP), отколкото за химикали, показващи голям потенциал за кожна сенсibilизация (т.е. подкатегория 1A по GHS на OOH/CLP) (1)(8)(9). Взета като цяло, тази информация показва ползата от U-SENSTM изпитването за подпомагане на определянето на опасностите от кожна сенсibilизация. Независимо от това стойностите за точността, посочени тук за U-SENSTM като самостоятелно изпитване, са само ориентировъчни, тъй като изпитването трябва да се разглежда в съчетание с други източници на информация в контекста на IATA и в съответствие с разпоредбите на точки 7 и 8 от Общото въведение. Освен това при оценяването на методи за сенсibilизация на кожата, които не използват животни, следва да се има предвид, че LLNA изпитването, както и други изпитвания върху животни, могат да не отразяват напълно положението при хората.

4. Въз основа на наличните към момента данни е доказано, че U-SENSTM изпитването е приложимо за изпитвани химикали (включително за козметични съставки, напр. консерванти, повърхностноактивни вещества, активни вещества, багрила), които обхващат разнообразни органични функционални групи, физични и химични свойства, потенциали за кожна сенсibilизация (както са определени в *in vivo* изследвания) и спектъра от реакционни механизми, за които е известно, че са свързани с кожната сенсibilизация (т.е. акцептор на Михаел, образуване на Шифови бази, агент за ацилово нуклеофилно заместване, бимолекулно нуклеофилно заместване [SN₂], или ароматно нуклеофилно заместване [SNA_r]) (1) (8) (9) (10). U-SENSTM изпитването се прилага за изпитвани химикали, които са разтворими или образуват стабилна дисперсия (т.е. колоид или суспензия, в която изпитваният химикал не се утаява или отделя от разтворителя/носителя в различни фази) в подходящ разтворител/носител (вж. точка 13). Химикали в набора от данни, за които се съобщава, че са пре-хаптени (т.е. вещества, които се активират чрез окисляване) или про-хаптени (т.е. вещества, които изискват ензимно активиране, например посредством P450 ензими) са били прогнозирани правилно от U-SENSTM (1) (10). Веществата, разрушаващи мембрани, могат да доведат до неверни положителни резултати, дължащи се на неспецифично увеличаване на експресията на CD86, тъй като 3 от 7 неверни положителни резултата в сравнение с референтната

класификация *in vivo* са повърхностноактивни вещества (1). Положителните резултати с повърхностноактивните вещества сами по себе си следва да се разглеждат предпазливо, докато отрицателните резултати с повърхностноактивни вещества могат все пак да се използват за подпомагане на идентифицирането на изпитвания химикал като непредизвикващо сенсibiliзация вещество. Флуоресцентните изпитвани химикали могат да бъдат оценени с U-SENS™ (1), но независимо от това, силно флуоресцентните изпитвани химикали, които излъчват при същата дължина на вълната като флуоресцеиновия изотиоцианат (FITC) или като пропидиевия йодид (PI), ще предизвикат смущения при откриването с поточна цитометрия и следователно не могат да бъдат правилно оценени с помощта на FITC-конюгирани антитела (потенциално неверни отрицателни резултати) или PI (жизнеспособност, която не е измерима). В такъв случай могат да се използват други антитела, маркирани с флуорохром, или съответно други маркери за цитотоксичност, при условие че може да се покаже, че дават сходни резултати като маркираните с FITC антитела или PI (вж. точка 18), напр. чрез изпитване на веществата за изпитване за пригодност от допълнение 2.2. С оглед на гореизложеното положителните резултати от повърхностноактивните вещества и отрицателните резултати, получени при силно флуоресцентни изпитвани химикали следва да се тълкуват в контекста на посочените ограничения и заедно с други източници на информация в рамките на IATA. В случаите, когато са налице доказателства за неприложимостта на U-SENS™ изпитването по отношение на други специфични категории изпитвани химикали, той не следва да се използва за тези специфични категории.

5. Както е описано по-горе, U-SENS™ изпитването подкрепя разграничаването между кожни сенсibiliзатори и непредизвикващи сенсibiliзация вещества. То обаче може да допринесе за оценка на потенциала за сенсibiliзация, когато се използва в интегрирани подходи, като например IATA. Независимо от това се изисква по-нататъшна работа, за предпочитане въз основа на данни за човека, за определяне на това как резултатите от U-SENS™ могат евентуално да послужат за информация за оценка на потенциала.
6. Определенията са дадени в допълнение 2.1.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

7. U-SENS™ изпитването е *in vitro* изследване, което определя количествено промените в експресията на повърхностния клетъчен маркер CD86 в клетъчна линия U937 на хистиоцитен лимфом при човека, след 45 ± 3 часова експозиция на изпитвания химикал. Повърхностният маркер CD86 е типичен маркер за активиране

на U937. За CD86 е известно, че е ко-стимулираща молекула, която може да имитира моноцитно активиране, което играе решаваща роля при праймирането на Т-клетките. Промените в експресията на повърхностния клетъчен маркер CD86 се измерват чрез поточна цитометрия след клетъчно оцветяване, обичайно с антитела, маркирани с флуоресцеинов изотиоцианат (FITC). Измерване на цитотоксичността (напр. чрез използване на PI) се извършва също така конкурентно, за да се оцени дали настъпва регулиране на експресията на повърхностния клетъчен маркер CD86 в посока увеличаване при субцитотоксични концентрации. Стимулационният индекс (SI) на повърхностния клетъчен маркер CD86 в сравнение с контролата на разтворител/носител се изчислява и използва в модела за прогнозиране (вж. точка 19), за да се подкрепи разграничаването между сенсibiliзатори и непредизвикващи сенсibiliзация вещества

ДОКАЗВАНЕ НА ПРИГОДНОСТ

8. Преди рутинното използване на изпитването, описано в настоящото допълнение, за метод за изпитване Б.71, лабораториите следва да докажат техническата си пригодност, като използват 10-те вещества за изпитване на пригодност, изброени в допълнение 2.2, в съответствие с добрите практики за *in vitro* методите (11) . Освен това ползвателите на изпитването следва да поддържат база данни с данни за преходни периоди, получени с проверките на реакционната способност (вж. точка 11) и с положителни контроли и контроли на разтворител/носител (вж. точки 15—16), и да използват тези данни, за да потвърдят, че възпроизводимостта на изпитването в тяхната лаборатория се запазва с течение на времето.

ПРОЦЕДУРА

9. Това изпитване се основава на Протокол № 183 за U-SENS™ от базата данни за методи, алтернативни на експериментите с животни (DB-ALM) (12). Стандартните работни процедури (СРП) следва да се прилагат, когато се прилага и използва U-SENS™ изпитването в лабораторията. Може да се използва автоматизирана система за провеждане на U-SENS™, ако може да се докаже, че тя осигурява сходни резултати, например чрез изпитване на веществата за изпитване за пригодност от допълнение 2.2. По-долу е представено описание на основните компоненти и процедури за U-SENS™ изпитването.

Подготовка на клетките

10. Клетъчната линия U937 на хистиоцитен лимфом при човека (13) следва да се използва за извършване на U-SENS™ изпитването. Клетките (клон CRL1593.2)

следва да бъдат получени от добре квалифицирана клетъчна банка, като например Американската банка за типови култури (American Type Culture Collection).

11. Клетките U937 се култивират при 37 °C, 5% CO₂ и овлажнена атмосфера в среда RPMI-1640, с добавка на 10 % фетален телешки серум (FCS), 2 mM L-глутамин, 100 единици/ml пеницилин и 100 µg/ml стрептомицин (пълноценна среда). С U937 клетки се осъществяват рутинно пасаж на всеки 2—3 дни при плътност съответно клетки/ml, а клетъчната жизнеспособност, измерена чрез изключване с трипаново синьо, следва да бъде $\geq 90\%$ (да не се прилага при първия пасаж след размразяването). Преди да бъдат използвани за изпитване, всяка партида от клетки, FCS или антитела следва да бъде квалифицирана чрез извършване на проверка за реакционна способност. Проверката за реакционна способност на клетките следва да се извърши, като се използва положителната контрола, пикрилсулфонова киселина (2,4,6-тринитробензенсулфонова киселина: TNBS) (CAS № 2508-19-2, $\geq 99\%$ чистота) и отрицателната контрола млечна киселина (LA) (CAS № 50-21-5, $\geq 85\%$ чистота), най-малко една седмица след размразяване. За проверката за реакционна способност следва да се изпитат шест крайни концентрации за всяка от 2-те контроли (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100µg/ml и LA: 1, 10, 20, 50, 100, 200µg/ml). TNBS, разтворим в пълноценна среда, следва да дава положителен и свързан с концентрацията отклик на CD86 (напр. когато положителна концентрация, SI на CD86 ≥ 150 , е последвана от концентрация с увеличаващ се SI на CD86), а LA, разтворена в пълноценна среда, следва да дава отрицателен отклик на CD86 (вж. точка 21). За изследването следва да се използва само партидата клетки, преминала 2 пъти проверката за реакционна способност. Клетките могат да бъдат размножавани до седем седмици след размразяването. Броят пасаж не трябва да надвишава 21. Проверката за реакционна способност следва да се извършва в съответствие с процедурите, описани в точки 18—22.
12. За изпитване U937 клетките се посяват с плътност 3×10^5 клетки/ml или 6×10^5 клетки/ml, и се извършва предварително култивиране в колби за клетъчни култури съответно 2 дни или 1 ден. Могат да се използват и условия на предварително култивиране, различни от описаните по-горе, ако е предоставена достатъчна научна обосновка и ако може да се докаже, че те осигуряват подобни резултати, например чрез изпитване на веществата за изпитване за пригодност от допълнение 2.2. В деня на изпитването клетките, събрани от колбата за култури, се ресуспендират с прясна хранителна среда при 5×10^5 клетки/ml. След това клетките се разпределят в 96-ямкова плоскодонна плака с 100 µl (крайна клетъчна плътност от $0,5 \times 10^5$ клетки/ямка).

Приготвяне на изпитваните химикали и веществата за контроли

13. Оценката на разтворимостта се извършва преди изпитването. За тази цел изпитваните химикали се разтварят или стабилно се диспергират в концентрация 50 mg/ml в пълноценна среда като първи възможен разтворител, или диметилсулфоксид (DMSO, $\geq 99\%$ чистота), като втори вариант на разтворител/носител, ако изпитваният химикал не е разтворим в разтворител/носител пълноценна среда. За изпитването изпитваният химикал се разтваря в крайна концентрация от 0,4 mg/ml в пълноценна среда, ако химикалът е разтворим в този разтворител/носител. Ако химикалът е разтворим само в DMSO, химикалът се разтваря в концентрация от 50 mg/ml. Могат да се използват и други разтворители/носители, освен описаните по-горе, при предоставяне на достатъчна научна обосновка. Следва да се вземе предвид стабилността на изпитвания химикал в крайния разтворител/носител.
14. Изпитваните химикали и веществата за контроли се приготвят в деня на изпитването. Тъй като не се провежда изследване за откриване на доза, за първата серия следва да се изпитат 6 крайни концентрации (1, 10, 20, 50, 100 и 200 $\mu\text{g/ml}$) в съответния разтворител/носител или в пълноценна среда, или в 0,4 % DMSO в среда. За последващите серии, като се започне от разтвори на изпитваните химикали от 0,4 mg/ml в пълноценна среда или 50 mg/ml в DMSO, се приготвят най-малко 4 работни разтвора (т.е. най-малко 4 концентрации), като се използва съответният разтворител/носител. Накрая, работните разтвори се използват за третиране чрез добавяне на равен обем суспензия от U937 клетки (вж. точка 11 по-горе) към обема на работния разтвор в плаката, за да се постигне допълнително 2-кратно разреждане (12). Концентрациите (най-малко 4 концентрации) за всяка следваща серия се избират въз основа на индивидуалните резултати от всички предишни серии (8). Използваемите крайни концентрации са 1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 и 200 $\mu\text{g/ml}$. Максималната крайна концентрация е 200 $\mu\text{g/ml}$. В случай че се наблюдава положителна стойност на CD86 при 1 $\mu\text{g/ml}$, се прави оценка на 0,1 $\mu\text{g/ml}$, за да се открие концентрацията на изпитвания химикал, която не индуцира CD86 над положителния праг. За всяка серия се изчислява EC150 (концентрация, при която даден химикал достига положителния праг за CD86 от 150 %, вж. точка 19), ако се наблюдава положителна концентрация-отклик за CD86. Когато изпитваният химикал индуцира положителен отклик за CD86, който не е свързан с концентрацията, изчисляването на EC150 може да не е относимо, както е описано в протокол № 183 от DB-ALM за U-SENSTM (12). За всяка серия се изчислява CV70 (концентрация, при която даден химикал достига прага на цитотоксичност от 70 %, вж. точка 19), винаги когато е възможно (12). За да се изследва ефектът концентрация-отклик, от увеличение на CD86, всички концентрации от използваемите концентрации следва да се избират равномерно

разположени между EC150 (или най-високата отрицателна концентрация на CD86, която не е цитотоксична), и CV70 (или най-високата разрешена концентрация, т.е. 200 µg/ml). Трябва да се изпитат минимум 4 концентрации на серия с най-малко 2 концентрации, които са общи с предишната серия или серии, за целите на сравняването.

15. Контролата на разтворител/носител, използвана в изпитването U-SENS™, е пълноценна среда (за разтворени или стабилно диспергирани изпитвани химикали) (вж. точка 4) или 0,4 % DMSO в пълноценна среда (за изпитвани химикали, разтворени или стабилно диспергирани в DMSO).
16. Положителната контрола, използвана в изпитването U-SENS™, е TNBS (вж. точка 11), приготвена в пълноценна среда. TNBS следва да се използва като положителната контрола за измерване на експресията на CD86 при крайна единична концентрация в плаката (50 µg/ml), при която се получава > 70 % клетъчна жизнеспособност. За получаване на концентрация на TNBS от 50 µg/ml в плаката, се приготвя 1 M (т.е. 293 mg/ml) изходен разтвор на TNBS в пълноценна среда и допълнително се разрежда 2930-кратно с пълноценна среда до 100 µg/ml работен разтвор. Млечната киселина (LA, CAS № 50-21-5) следва да се използва като отрицателната контрола при 200 µg/ml, разтворена в пълноценна среда (от изходен разтвор от 0,4 mg/ml). Във всяка плака от всяка серия се приготвят три повторения на нетретирана контрола на пълноценна среда, контрола на разтворител/носител, отрицателни и положителни контроли (12). Могат да се използват други подходящи положителни контроли, ако има налични данни за предходни периоди, за извеждане на сравними критерии за приемливост на серията. Критериите за приемливост на серията при работа са същите като описаните за изпитвания химикал (вж. точка 12).

Прилагане на изпитваните химикали и веществата за контроли

17. Контролата на разтворител/носител или работните разтвори, описани в точки 14-16, се смесват 1:1 (v/v) с клетъчните суспензии, подготвени в 24-ямковата или 96-ямковата плоскодънна плака (вж. точка 12). След това третираните плаки се инкубират за 45 ± 3 часа при 37 °C под 5 % CO₂. Преди инкубирането плаките се запечатват с полупропусклива мембрана, за да се избегне изпаряване на летливи изпитвани химикали и кръстосано замърсяване между клетките, третирани с изпитваните химикали (12).

Оцветяване на клетките

18. След 45 ± 3 часа експозиция клетките се прехвърлят във V-образна микротитърна плака и се събират чрез центрофугиране. Смушението на разтворимостта се определя като кристали или капки, наблюдавани под микроскоп, 45 ± 3 часа след третирането

(преди клетъчното оцветяване). Супернатантите се изхвърлят и останалите клетки се промиват веднъж с 100 µl ледено студен фосфатно буфериран физиологичен разтвор (PBS), съдържащ 5 % фетален телешки серум (оцветяващ буфер). След центрофугирането клетките се ресуспендират със 100 µl оцветяващ буфер и се оцветяват с 5 µl (например 0,25 µg) маркирани с FITC анти-CD86 или миши антитела от (изотип) IgG1 при 4 °C за 30 минути със защита срещу светлина. Следва да се използват антителата, описани в протокол № 183 от DB-ALM за U-SENS™ (12) (за CD86: BD-PharMingen #555657 Clone: Fun-1 или Caltag/Invitrogen # MHCD8601 Clone: BU63; а за IgG1: BD-PharMingen # 555748 или Caltag/Invitrogen # GM4992). Въз основа на опита на разработилите изпитването интензитетът на флуоресценцията на антителата обикновено е последователен между различните партии. Други клонове или доставчик на антитела, които са преминали проверката за реакционна способност, могат да се използват за изследването (вж. точка 11). Въпреки това ползвателите могат да разгледат титруване на антитела в условията на собствената си лаборатория, за определяне на най-добрата концентрация за използване. Може да се използва и друга система за откриване, например маркирани с флуорхром анти-CD86 антитела, ако може да се докаже, че те осигуряват сходни резултати като FITC-конюгираните антитела, например чрез изпитване на веществата за изпитване на пригодност от допълнение 2.2. След промиване с 100 µl оцветяващ буфер два пъти и веднъж с 100 µl ледено студен PBS, клетките се ресуспендират в ледено студен PBS (напр. 125 µl за проби, които се анализират ръчно епруветка по епруветка, или 50 µl при използване на плака с автоматично пробовземане) и се добавя PI разтвор (крайна концентрация от 3 µg/ml). Други маркери за цитотоксичност, като 7-аминоактиномицин D (7-AAD), или трипаново синьо, могат да бъдат използвани, ако може да се докаже, че алтернативните оцветители осигуряват сходни резултати като PI, например чрез изпитване на веществата за изпитване на пригодност от допълнение 2.2.

Анализ с поточна цитометрия

19. Нивото на експресията на CD86 и клетъчната жизнеспособност се анализират с помощта на поточна цитометрия. Клетките се показват в точкова диаграма с големина (FSC) и гранулираност (SSC), изобразена в логаритмична скала, с цел ясно да се идентифицира популацията в първи аналитичен прозорец R1 и да се отстранят остатъците. Придобиват се данни за общо 10 000 клетки в аналитичен прозорец R1 за всяка ямка. Клетките от същия аналитичен прозорец R1 се визуализират в рамките на FL3 или FL4/SSC точкова диаграма. Жизнеспособните клетки се отграничават чрез поставяне на втори аналитичен прозорец R2, с който се избира популацията от клетки, отрицателни на пропидиев йодид (канал FL3 или FL4). Клетъчната жизнеспособност може да бъде изчислена с помощта на следната формула от

програмата за анализ на цитометъра. Когато клетъчната жизнеспособност е малка, могат да се придобият данни за до 20 000 клетки, включително мъртви клетки. Друга възможност е данните да бъдат придобити в продължение на една минута след започването на анализа.

$$\text{Cell viability} = \frac{\text{Number of living cells}}{\text{Total Number of aquired cells}} \times 100$$

След това процентът на FL1-положителните клетки се измерва сред тези жизнеспособни клетки, включени в аналитичен прозорец R2 (в рамките на R1). Експресията на клетъчната повърхност на CD86 се анализира в FL1/SSC точкова диаграма, с аналитичен прозорец към жизнеспособни клетки (R2).

За ямките с пълноценна среда/IgG1 прагът за анализа се определя близо до основната популация, така че контролите на пълноценна среда да са с IgG1 в рамките на целевата зона от 0,6 до 0,9 %.

Смущение в цвета се определя като отместване на точковата диаграма на маркирания с FITC IgG1 парцел (средногеометричен SI на IgG1 ≥ 150 %).

Стимулационният индекс (SI) на CD86 за клетки в контроли (нетретирана или в 0,4 % DMSO) и за третирани с химикал клетки се изчислява по следната формула:

$$S.I. = \frac{\% \text{ of } CD86^{+} \text{ treated cells} - \% \text{ of } IgG1^{+} \text{ treated cells}}{\% \text{ of } CD86^{+} \text{ control cells} - \% \text{ of } IgG1^{+} \text{ control cells}} \times 100$$

% на IgG1⁺ клетки в нетретирани контроли: отнася се за процента на FL1-положителните клетки, разпознаваеми от IgG1, определен с прага за анализа (приемлив диапазон $\geq 0,6$ % и $< 1,5$ %, вж. точка 22) от жизнеспособните нетретирани клетки.

% на IgG1⁺/CD86⁺ клетки в контроли/третирувани клетки: отнася се за процента на FL1-положителните клетки, разпознаваеми от IgG1/CD86, определени без придвижване на прага за анализа между жизнеспособните клетки в контроли/третираните клетки.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ

Оценка на данните

20. Следните параметри се изчисляват в рамките на U-SENSTM изпитването: стойност CV70, т.е. концентрация, при която се наблюдава 70 % преживяемост на U937 клетки (30 % цитотоксичност) и стойност EC150, т.е. концентрацията, при която изпитваните химикали индуцират стимулационен индекс на CD86 (SI) от 150 %.

CV70 се изчислява чрез лог-линейна интерполация, като се използва следната

формула:

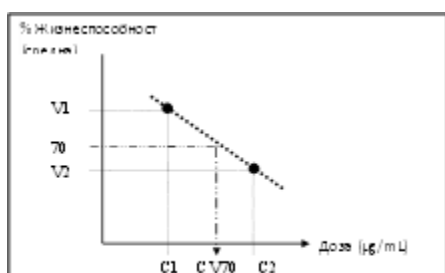
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

където:

V1 е минималната стойност на клетъчната жизнеспособност над 70 %

V2 е максималната стойност на клетъчната жизнеспособност под 70 %

C1 и C2 са концентрациите, показващи съответно стойностите на клетъчната жизнеспособност V1 и V2



Могат да се използват други подходи за извеждане на CV70, при условие че се докаже, че това няма въздействие върху резултатите (напр. чрез изпитване на веществата за изпитване за пригодност).

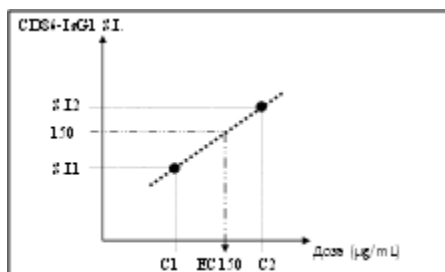
EC150 се изчислява чрез лог-линейна интерполация, като се използва следната формула:

$$EC150 = C1 + [(150 - S.I.1) / (S.I.2 - S.I.1) * (C2 - C1)]$$

където:

C1 е най-високата концентрация в µg/ml с CD86 SI < 150 % (SI 1).

C2 е най-ниската концентрация в µg/ml с CD86 SI ≥ 150 % (SI 2).



Стойностите на EC150 и CV70 се изчисляват

- за всяка серия: отделните стойности EC150 и CV70 се използват като инструменти за изследване на ефекта концентрация-отклик от увеличението на CD86 (вж. точка 14),
- въз основа на средните стойности на жизнеспособността се определя общият CV70 (12),
- въз основа на средните стойности на SI на CD86 се определя общият EC150 за изпитвания химикал, прогнозиран като ПОЛОЖИТЕЛЕН с USENSTM (вж. точка 21) (12).

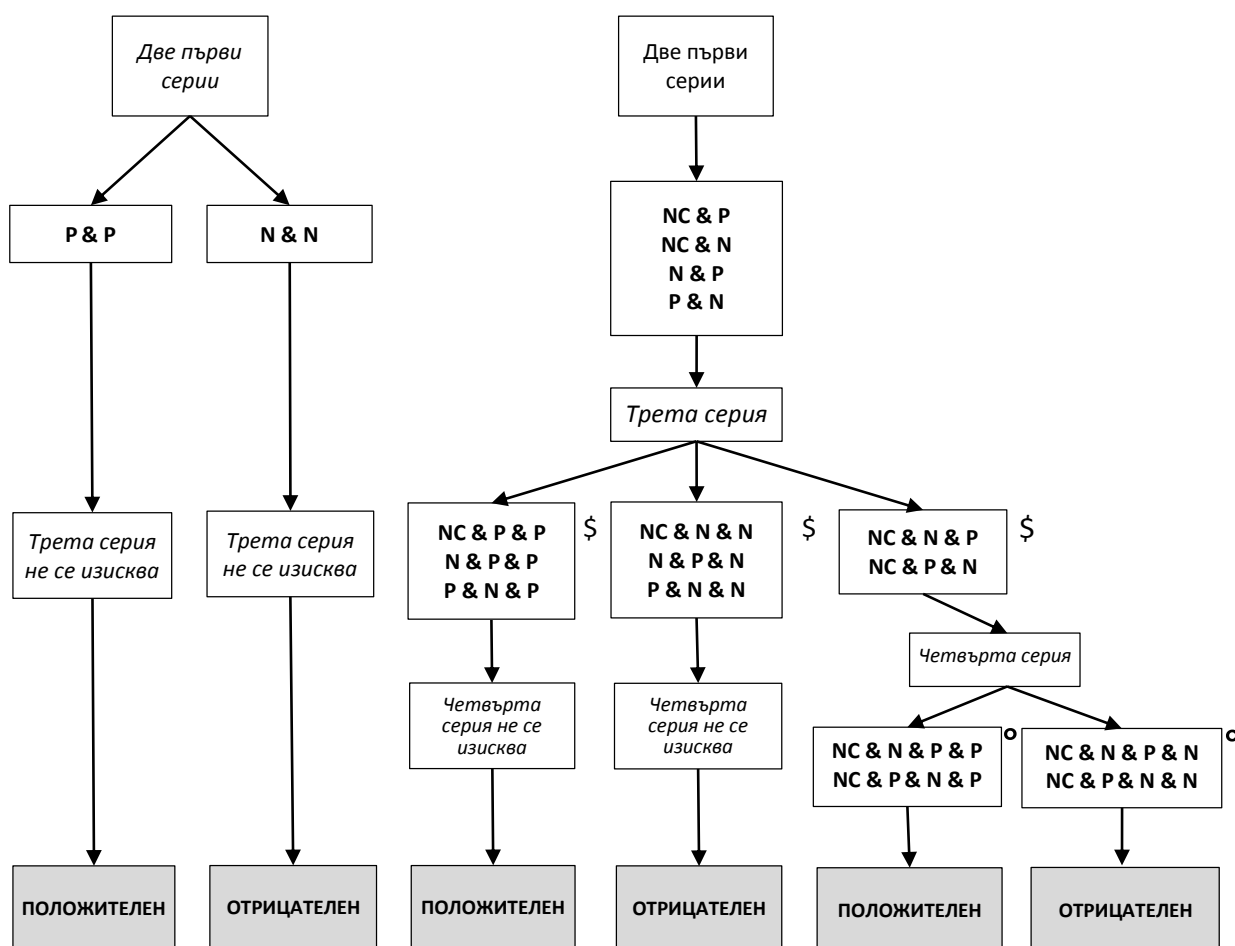
Модел на прогнозиране

21. За измерване на експресията на CD86 всеки изпитван химикал се изпитва в най-малко четири концентрации и най-малко две независими серии (провеждани в различен ден) с цел да се изведе единична прогноза (ОТРИЦАТЕЛНА или ПОЛОЖИТЕЛНА).

- Счита се, че индивидуалното заключение от U-SENSTM серия е отрицателно (наричано по-долу „N“), ако SI на CD86 е по-малко от 150 % при всички нецитотоксични концентрации (жизнеспособност на клетките ≥ 70 %) и ако не е наблюдавано смущение (цитотоксичност, разтворимост: вж. точка 18, или за цвят: вж. точка 19 независимо от нецитотоксичните концентрации, при които е открито смущението). Във всички други случаи: SI на CD86 по-висок или равен на 150 % и/или наблюдавани смущения, индивидуалното заключение от дадена U-SENSTM серия се счита за положително (наричано по-долу „P“).
- Счита се, че дадена прогноза на USENSTM е ОТРИЦАТЕЛНА, ако поне две независими серии са отрицателни (N) (фигура 1). Ако и двете първи серии са отрицателни (N), прогнозата на U-SENSTM се счита за ОТРИЦАТЕЛНА и не е необходимо да се провежда трета серия.
- Счита се, че дадена прогнозата на USENSTM е ПОЛОЖИТЕЛНА, ако поне две независими серии са положителни (P) (фигура 1). Ако и двете първи серии са положителни (P), прогнозата на U-SENSTM се счита за ПОЛОЖИТЕЛНА и не е необходимо да се провежда трета серия.
- Тъй като не се провежда изследване за откриване на доза, съществува изключение, ако в първата серия SI на CD86 е по-висок или равен на 150 % само при най-високата концентрация, която не е цитотоксична. Тогава се счита, че серията НЕ ПОЗВОЛЯВА ЗАКЛЮЧЕНИЕ (NC) и следва допълнителни концентрации да се изпитат в допълнителни серии (между най-високата концентрация, която не е цитотоксична, и най-ниската концентрация на цитотоксичност — вж. точка 20). В случай че дадена серия е идентифицирана като NC, трябва да се проведат най-малко

2 допълнителни серии, както и четвърта серия в случай че серии 2 и 3 не се съгласуват (N и/или P независимо едно от друго) (фигура 1). Последващите серии ще се считат за положителни, дори ако само една концентрация, която не е цитотоксична, дава стойност на CD86, равна на 150 % или по-висока, тъй като определянето на концентрацията е било коригирано за конкретния изпитван химикал. Крайната прогноза ще се базира на представявания мнозинство резултат от трите или четирите отделни серии (т.е. 2 от 3 или 2 от 4) (фигура 1).

Фигура 1: Модел на прогнозиране, използван в U-SENSTM изпитването. Прогнозата по U-SENSTM следва да се разглежда в рамките на IATA и в съответствие с предвиденото в точка 4 и в точки 7, 8 и 9 от Общото въведение.



N: Серия, в която не се наблюдава нито положителен CDR86, нито смущение;

P: Серия, в която се наблюдава положителен CDR86 и/или смущение(я);

NC: Не позволява заключение. Първа серия, която не позволява заключение при CD86 положителен само при най-високата нецитотоксична концентрация;

#: Индивидуално заключение „Не позволява заключение“ (NC), което се приписва само на първата серия, автоматично води до необходимост от трета серия с оглед достигане на мнозинство от Положителни (P) или Отрицателни (N) заключения в поне 2 от 3 независими серии.

\$: #Клетките показват относимите комбинации от резултатите от трите серии въз основа на резултатите, получени в първите две серии, показани в горната клетка.

°: Клетките показват относимите комбинации от резултатите от четирите серии въз основа на резултатите, получени в първите три серии, показани в горната клетка.

Критерии за приемливост

22. Когато се използва U-SENSTM изпитването трябва да се спазват следните критерии за приемливост (12).

- В края на периода на експозиция от 45 ± 3 часа средната жизнеспособност на трите повторения с нетретираните U937 клетки трябва да бъде $> 90 \%$ и не трябва се наблюдава изместване при експресията на CD86. Базовата експресия на CD86 при нетретираните клетки U937 трябва да е в диапазона $\geq 2 \%$ и $\leq 25 \%$.
- Когато се използва като разтворител DMSO, валидността на контролата на носител DMSO се оценява чрез изчисляване на SI на DMSO в сравнение с нетретираните клетки, и оттам средната жизнеспособност на клетките от трите повторения трябва да бъде $> 90 \%$. Контролата на носител DMSO е валидна, ако средната стойност на нейния SI на CD86 в трите повторения е по-малка от 250% от средната стойност на SI на CD86 в трите повторения нетретираните U937 клетки.
- Сериите се считат за валидни, ако най-малко две от три стойности на IgG1 за нетретираните клетки U937 са попаднали в диапазона $\geq 0,6 \%$ и $< 1,5 \%$.
- Паралелната изпитвана отрицателна контрола (млечна киселина) се счита за валидна, ако най-малко две от трите повторения са били отрицателни (SI на CD86 $< 150 \%$) и нецитотоксични (клетъчна жизнеспособност $\geq 70 \%$).
- Положителната контрола (TNBS) се счита за валидна, ако най-малко две от трите повторения са били положителни (SI на CD86 $\geq 150 \%$) и нецитотоксични (клетъчна жизнеспособност $\geq 70 \%$).

Протокол от изпитването

23. Протоколът от изпитването следва да включва следната информация.

Изпитван химикал

Вещество с една съставка:

- Химична идентификация, като наименование(я) по IUPAC или по CAS, CAS номер(а), SMILES или InChI код, структурна формула, и/или други идентификатори;
- Външен вид, пълна разтворимост в пълноценна среда, разтворимост в DMSO, молекулно тегло и допълнителни относими физични и химични свойства, според наличността;
- Чистота, химическа идентичност на онечистванията, както е целесъобразно и практически осъществимо и т.н.;
- Обработка преди изпитването, ако се прилага (напр. затопляне, смилане);
- Изпитвана концентрация (концентрации);
- Условия на съхранение и стабилност, доколкото са налични;
- Обосновка за избора на разтворител/носител за всеки изпитван химикал.

Вещество с повече съставки, UVCB и смес:

- характеризиране, доколкото е възможно, чрез химическата идентичност (вж. по-горе), чистотата, количествения състав и относимите физични и химични свойства на съставките (вж. по-горе), доколкото са налични.
- Външен вид, пълна разтворимост в пълноценна среда, разтворимост в DMSO и допълнителни относими физични и химични свойства, според наличността;
- Молекулно тегло или привидно молекулно тегло в случай на смеси/полимери с известен състав или друга информация, относима към провеждането на изследването;
- Обработка преди изпитването, ако се прилага (напр. затопляне, смилане);
- Изпитвана концентрация (концентрации);
- Условия на съхранение и стабилност, доколкото са налични;
- Обосновка за избора на разтворител/носител за всеки изпитван химикал.

Контроли

Положителна контрола

- Химична идентификация, като наименование(я) по IUPAC или по CAS, CAS номер(а), SMILES или InChI код, структурна формула, и/или други идентификатори;
- Външен вид, разтворимост в DMSO, молекулно тегло и допълнителни относими физични и химични свойства, според наличността, където е приложимо;

- Чистота, химическа идентичност на онечистванията, както е целесъобразно и практически осъществимо и т.н.;
- Обработка преди изпитването, ако се прилага (напр. затопляне, смилане);
- Изпитвана концентрация (концентрации);
- Условия на съхранение и стабилност, доколкото са налични;
- Препратка към резултатите за положителните контроли за предходни периоди, доказващи подходящи критерии за приемливост на серията, ако е приложимо.

Отрицателна контрола и контрола на разтворител/носител

- Химична идентификация, като наименование(я) по IUPAC или по CAS, CAS номер(а), SMILES или InChI код, структурна формула, и/или други идентификатори;
- Чистота, химическа идентичност на онечистванията, както е целесъобразно и практически осъществимо и т.н.;
- Външен вид, молекулно тегло и допълнителни относими физични и химични свойства, в случай че са използвани разтворители/носители, различни от упоменатите в Насоките за изпитване и в зависимост от наличността;
- Условия на съхранение и стабилност, доколкото са налични;
- Обосновка за избора на разтворител/носител за всеки изпитван химикал.

Условия на изпитване

- Име и адрес на финансиращия, на изпитващата лаборатория и на ръководителя на изследването;
- Описание на използваното изпитване;
- Използвана клетъчна линия, условия за нейното съхранение и източник (например мястото, от което са взети);
- Използвана поточна цитометрия (например модел), включително инструментални настройки, глобулин, антитела и маркер за цитотоксичност;
- Процедурата, използвана за доказване на пригодността на лабораторията за провеждане на изпитването чрез изпитване на вещества за изпитване за пригодност, и процедурата, използвана за доказване на възпроизводимостта на резултатите от изпитването с течение на времето, например данни за контролите за предходни периоди и/или данни от предходни проверки за реакционна способност.

Критерии за приемливост на изпитването

- Стойности на клетъчната жизнеспособност и SI на CD86, получени с контролата на разтворител/носител в сравнение с допустимия размах;
- Стойности на клетъчната жизнеспособност и SI, получени с положителната контрола в сравнение с допустимия размах;
- Клетъчна жизнеспособност при всички изпитвани концентрации на изпитвания химикал.

Процедура за изпитване

- Брой на използваните серии;
- Концентрации на изпитвания химикал, продължителност на прилагане и време на експозицията (при различие от препоръчаното)
- Продължителност на експозицията;
- Описание на използваните критерии за оценка и за решение;
- Описание на всякакви изменения на процедурата за изпитване.

Резултати

- Таблично представяне на данните, включително на стойности на CV70 (ако е приложимо), SI, клетъчна жизнеспособност, стойности на EC150 (ако е приложимо), получени за изпитвания химикал и за положителната контрола за всяка серия, като се посочва рангът на изпитвания химикал в съответствие с модела на прогнозиране;
- Описание на всякакви други относими наблюдения, ако е приложимо.

Обсъждане на резултатите.

- Обсъждане на резултатите, получени с U-SENS™ изпитването;
- Разглеждане на резултатите от изпитването в рамките на контекста на IATA, ако е налична друга относима информация.

Заклучения

ЛИТЕРАТУРА

- (1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.
- (2) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Достъпно на: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations
- (3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28178 EN; doi 10.2787/815737. На _____ разположение _____ на _____ адрес: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].
- (4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28553 EN; doi 10.2760/588955. На _____ разположение _____ на _____ адрес: <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing>.
- (5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014. *Cosmetics* 3, 14.
- (6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. На _____ разположение _____ на _____ адрес: [<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>].
- (7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.
- (8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015).

Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.

- (9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehn, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.
- (10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683-1696.
- (11) OECD. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. На разположение на адрес: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf.
- (12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENSTM), 33pp. Достъпно на: [<http://ecvam-dbal.m.jrc.ec.europa.eu/>].
- (13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.
- (14) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. На разположение на адрес: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (15) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: United Nations Publications. На разположение на адрес: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
- (16) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. На разположение на адрес:

<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.

- (17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. На разположение на адрес: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

Допълнение 2.1

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Точност: степента на близост между резултатите от изпитването и приетите референтни стойности. Това е мярка за ефективността на изпитването и един от аспектите на неговата относимост. Терминът често се използва взаимозаменяемо с термина „съответствие“, за да се обозначи относителният дял на правилните резултати при дадено изпитване (14).

АОР (път, водещ до неблагоприятен ефект): последователност от събития от химичната структура на целеви химикал или група от сходни химикали през молекулното инициращо събитие до представляващ интерес *in vivo* резултат (15).

Отклик на концентрацията при CD86: Съществува зависимост от концентрацията (или отклик на концентрация), когато положителна концентрация (SI на $CD86 \geq 150$) е последвана от концентрация с увеличаващ се SI на $CD86$.

Химикал: Вещество или смес.

CV70: Прогнозната концентрация, показваща клетъчна жизнеспособност 70 %.

Изместване: Изместването се определя така i) коригираната стойност на $CD86^+$ в % при повторение 3 за нетретираната контрола е по-малка от 50 % от средната на коригираните стойности на $CD86^+$ в % при повторения 1 и 2 за нетретираната контрола; и ii) коригираната стойност на $CD86^+$ в % при повторение 3 за отрицателната контрола е по-малка от 50 % от средната на коригираните стойности на $CD86^+$ в % при повторения 1 и 2 за отрицателната контрола;

EC150: прогнозните концентрации, показващи равен на 150 % SI на експресията на $CD86$.

Поточна цитометрия: цитометрична техника, при която клетките, суспендирани в течност, се движат в поток една по една във времето през фокус на възбуждаща светлина, която се разсейва по начини, характерни за клетките и техните компоненти; клетките често се маркират с флуоресцентни маркери, така че светлината първо се абсорбира и след това се излъчва при изменени честоти.

Опасност: Вътрешно присъщо свойство на даден агент или ситуация, притежаващо потенциал да предизвика неблагоприятни ефекти когато един организъм, система или (суб-)популация бъдат експонирани на този агент.

ИАТА (интегриран подход за изпитване и оценка): Структуриран подход, използван за идентифициране на опасност (потенциал), характеризиране на опасност (потенциал) и/или оценка на безопасността (потенциал и експозиция) на даден

химикал или група от химикали, който стратегически интегрира и претегля всички данни, относими към предоставянето на информация за вземането на регулаторно решение по отношение на потенциалната опасност и/или риска, и/или необходимостта от допълнително целенасочено и следователно минимално изпитване.

Смес: смес или разтвор, съставени от две или повече вещества.

Вещество с една съставка: Вещество, определено от неговия количествен състав, в който съдържанието на една основна съставка е най-малко 80 % (w/w).

Вещество с повече съставки: Вещество, определено от неговия количествен състав, в който повече от една основна съставка се съдържа в концентрация $\geq 10\%$ (w/w) и $< 80\%$ (w/w). Веществото с повече съставки е резултат от производствен процес. Разликата между смес и вещество с повече съставки е, че дадена смес е получена чрез смесване на две или повече вещества без химична реакция. Веществото с повече съставки е резултат от химична реакция.

Положителна контрола: Повторение, съдържащо всички компоненти на дадена изпитвана система и третирано с вещество, за което е известно, че предизвиква положителен отклик. За да гарантира, че може да се направи оценка на варирането на отклика в положителната контрола във времето, големината на положителния отклик не следва да е прекомерна.

Пре-хаптени: химикали, които стават сенсibiliзатори чрез абиотично преобразуване, напр. чрез окисление.

Про-хаптени: химикали, които изискват ензимно активиране за реализирането на потенциал за кожна сенсibiliзация.

Относимост: описание на взаимовръзката между изпитването и ефекта, представляващ интерес, и дали тя е значима и полезна за определена цел. Това е степента, в която изпитването правилно измерва или прогнозира биологичния ефект, представляващ интерес. Относимостта включва разглеждане на точността (съответствието) на дадено изпитване (14).

Надеждност: мярка за степента, в която дадено изпитване може да се извърши възпроизводимо в една и съща лаборатория и в различни лаборатории по различно време, като при извършването се използва един и същи протокол. Оценката за нея се прави, като се изчислява вътрешнолабораторната и междулабораторната възпроизводимост и вътрешнолабораторната повтораемост (14).

Серия: Серията представлява един или повече изпитвани химикали, изпитвани едновременно с контрола на разтворител/носител и с положителна контрола.

Чувствителност: Относителният дял от всички положителни/активни химикали,

които са класифицирани правилно чрез изпитването. Това е мярка за точността на изпитването, което предоставя категорийни резултати, и е важен фактор при оценката на относимостта на дадено изпитване (14).

SI: Стимулационен индекс. Относителни стойности на средногеометричната стойност на интензитета на флуоресценция в третираните с химикал клетки в сравнение с клетки, третирани с разтворител.

Контрола на разтворител/носител: Нетретирана проба, съдържаща всички компоненти на изпитваната система, с изключение на изпитвания химикал, но включваща разтворителя/носителя, който се използва. Използва се за определяне на базовия отклик за пробите, третирани с изпитвания химикал, разтворен или стабилно диспергиран в същия разтворител/носител. Когато се изпитва с паралелна контрола на среда, тази проба показва също дали разтворителят/носителят взаимодейства с изпитваната система.

Специфичност: Относителният дял от всички отрицателни/неактивни химикали, които са класифицирани правилно чрез изпитването. Това е мярка за точността на изпитването, което предоставя категорийни резултати и е важен фактор при оценката на относимостта на дадено изпитване (14).

Оцветяващ буфер: Фосфатно буфериран физиологичен разтвор, съдържащ 5 % фетален телешки серум.

Вещество: означава химичен елемент и неговите съединения в естествено състояние или получени чрез всеки производствен процес, включително всяка добавка, необходима за запазване на неговата стабилност и всеки примес, извлечен от използвания процес, с изключение на всеки разтворител, който може да бъде отделен, без да се засяга стабилността на веществото или да се променя неговият състав.

Изпитван химикал: Всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод.

Глобална хармонизирана система на Организацията на обединените нации за класифициране и етикетиране на химикали (GHS на ООН): система, предлагаща класифициране на химикали (вещества и смеси) според стандартизирани видове и степени на физическа, здравна и екологична опасност и разглеждаща съответни съобщителни елементи, като например пиктограми, сигнални думи, предупреждения за опасност, препоръки за безопасност и информационни листове за безопасност, така че те да съобщават информация за тяхното неблагоприятно въздействие с оглед защита на хората (включително работодатели, работещи, служители в транспорта, потребители и аварийни служители) и на околната среда (16).

UVCB: вещества с неизвестен или променлив състав, сложни продукти от реакции или биологични материали.

Валидно изпитване: Изпитване, за което се смята, че притежава достатъчна относимост и надеждност по отношение на конкретна цел и което се основава на научно обосновани принципи. Дадено изпитване никога не е валидно в абсолютен смисъл, а само по отношение на определена цел (14).

Допълнение 2.2**ВЕЩЕСТВА ЗА ИЗПИТВАНЕ ЗА ПРИГОДНОСТ**

Преди рутинното използване на изпитването, описано в настоящото допълнение към метод за изпитване Б.71, лабораториите следва да докажат техническата си пригодност, като правилно получат очакваната прогноза по U-SENS™ за 10-те вещества, препоръчани в Таблица 1, и чрез получаване на стойности за CV70 и EC150, които попадат в съответния референтен обхват за минимум 8 от 10-те вещества за изпитване за пригодност. Веществата за изпитване за пригодност са подбрани като представителни за размаха от отклици за опасностите от кожна сенсibilизация. Други критерии за подбор бяха веществата да са налични в търговската мрежа и да са налични висококачествени *in vivo* референтни данни, както и висококачествени *in vitro* данни, получени по U-SENS™ изпитването. Също така са налични публикувани референтни данни за U-SENS™ изпитването (1) (8).

Таблица 1: Препоръчвани вещества за доказване на техническа пригодност по отношение на U-SENS™ изпитването

Вещества за изпитване за пригодност	CAS №	Агрегатно състояние	<i>In vivo</i> прогноза ¹	U-SENS™ Разтворител/ Носител	U-SENS™ CV70 Позоваване Размах в µg/ml ²	U-SENS™ референтен за EC150 размах в µg/ml ²
4-Фенилендиамин	106-50-3	Твърд	Сенсибилизатор (силен)	Пълноценна среда ³	<30	Положително (≤10)
Пикрилсулфонова киселина	2508-19-2	Течност	Сенсибилизатор (силен)	Пълноценна среда	>50	Положително (≤50)
Диетилов малеат	141-05-9	Течност	Сенсибилизатор (умерен)	DMSO	10-100	Положително (≤20)
Резорцинол	108-46-3	Твърд	Сенсибилизатор (умерен)	Пълноценна среда	>100	Положително (≤50)
Канелен алкохол	104-54-1	Твърд	Сенсибилизатор (слаб)	DMSO	>100	Положително (10-100)
4-Алиланизол	140-67-0	Течност	Сенсибилизатор (слаб)	DMSO	>100	Положително (<200)
Захарин	81-07-2	Твърд	Непредизвикващо сенсибилизация вещество	DMSO	>200	Отрицателно (>200)

Глицерол	56-81-5	Течност	Непредизвикв ащо сенсibiliзац ия вещество	Пълноценн а среда	>200	Отрицателно (>200)
Млечна киселина	50-21-5	Течност	Непредизвикв ащо сенсibiliзац ия вещество	Пълноценн а среда	>200	Отрицателно (>200)
Салицилова киселина	69-72-7	Твърд	Непредизвикв ащо сенсibiliзац ия вещество	DMSO	>200	Отрицателно (>200)

Съкращения: CAS № = регистрационен номер по Службата за химични индекси.

- ¹ *In vivo* прогнозата за опасност и (потенциал) се основава на данни от LLNA (1) (8). *In vivo* потенциалът е изведен с използване на критериите, предложени от ECETOC (17).
- ² Въз основа на наблюдавани стойности за предходни периоди (1) (8).
- ³ Пълноценна среда: Среда RPM-1640, с добавка на 10 % фетален телешки серум, 2 mM L-глутамин, 100 единици/ml пеницилин и 100 µg/ml стрептомицин (8).

Допълнение 3

***IN VITRO* КОЖНА СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ: ИЗСЛЕДВАНЕ IL-8 LUC**

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

1. За разлика от изследванията, при които се анализира експресията на маркерите на клетъчната повърхност, изследването IL-8 Luc измерва количествено измененията на експресията на IL-8 — цитокин, свързан с активирането на дендритни клетки (ДК). В получената от THP-1 IL-8 репортерна клетъчна линия (THP-G8, създадена от моноцитната клетъчна линия THP-1 от остра левкемия при човека) експресията на IL-8 се измерва след експозиция на сенсibiliзатори (1). След това експресията на луциферазата се използва за подпомагане на разграничаването между кожни сенсibiliзатори и непредизвикващи сенсibiliзация вещества.
2. IL-8 Luc изследването бе оценено чрез изследване за валидиране (2), проведено от Японския център за валидиране на алтернативни методи (JaCVAM), **Министерството на икономиката, търговията и промишлеността (METI)** и японското дружество за алтернативи на опитите с животни (JSAAE) и впоследствие бе подложено на независима партньорска проверка (3) под егидата на JaCVAM и на Министерството на здравеопазването, труда и благосъстоянието (MHLW) с подкрепата на **Международната група за сътрудничество в областта на алтернативните методи за изпитване (ICATM)**). Вземайки предвид всички налични доказателства и данни от регулаторните органи и заинтересованите страни, изследването IL-8 Luc се счита за полезно като част от IATA за подкрепа на разграничаването между сенсibiliзатори и непредизвикващи сенсibiliзация вещества за целите на класифицирането на опасността и етикетирването. Примери за използването на данни от изследването IL-8 Luc в комбинация с друга информация са описани в литературата (4) (5) (6).
3. Бе показано, че изследването IL-8 Luc е прехвърляемо към лаборатории с опит в клетъчните култури и измерването на луциферазата. Вътрелаборната и междулабораторната възпроизводимост са били съответно 87,7 % и 87,5 % (2). Данните, получени в изследването за валидиране (2) и други публикувани изследвания (1) (6) показват, че в сравнение с LLNA изследването IL-8 Luc е заключило за 118 от 143 химикала като положителни или отрицателни, и за 25 химикала като не позволяващи да се даде заключение, и точността на изследването IL-8 Luc при разграничаването на кожните сенсibiliзатори (категория 1 по GHS на ООН/Регламент CLP) от непредизвикващите сенсibiliзация вещества (без категория по GHS на ООН/Регламент CLP) е 86 % (101/118), с чувствителност от

96 % (92/96) и специфичност от 41 % (9/22). С изключение на веществата извън областта на приложимост, описана по-долу (точка 5), изследването IL-8 Luc е заключило за 113 от 136 химикала като положителни или отрицателни, и за 23 химикала като не позволяващи да се даде заключение, и точността на изследването IL-8 Luc е 89 % (101/113), с чувствителност от 96 % (92/96) и специфичност от 53 % (9/17). С използване на данни за хора, цитирани в Urbisch et al. (7) изследването IL-8 Luc е заключило за 76 от 90 химикала като положителни или отрицателни, и за 14 химикала като не позволяващи да се даде заключение, и точността е 80 % (61/76), с чувствителност от 93 % (54/58) и специфичност от 39 % (7/18). С изключение на веществата извън областта на приложимост, изследването IL-8 Luc е заключило за 71 от 84 химикала като положителни или отрицателни, и за 13 химикала като не позволяващи да се даде заключение, и точността е 86 % (61/71), с чувствителност от 93 % (54/58) и специфичност от 54 % (7/13). Има по-голяма вероятност неверните отрицателни прогнози, свързани с изследването IL-8 Luc, да се отнасят за химикали, които са с малък/умерен потенциал за кожна сенсibiliзация (кожна сенсibiliзация подкатегория 1B по GHS на ООН/Регламент CLP), отколкото при химикали, показващи голям потенциал за кожна сенсibiliзация (т.е. подкатегория 1A по GHS на ООН/Регламент CLP) (6). Взета заедно, информацията показва, че изследването IL-8 Luc оказва подкрепа за идентифициране на опасностите от кожна сенсibiliзация. Точността на изследването IL-8 Luc като самостоятелно изпитване е само ориентиrowъчна, тъй като изпитването трябва да се разглежда в съчетание с други източници на информация в контекста на IATA и в съответствие с разпоредбите на точки 7 и 8 от Общото въведение. Освен това при оценяването на изпитвания за сенсibiliзация на кожата, които не използват животни, следва да се има предвид, че LLNA и други изпитвания върху животни могат да не отразяват напълно положението при хората.

4. Въз основа на наличните понастоящем данни бе показано, че изследването IL-8 Luc е приложимо по отношение на изпитвани химикали, които обхващат различни органични функционални групи, реакционни механизми, потенциал за сенсibiliзация на кожата (както е определено в *in vivo* проучвания) и физични и химични свойства (2)(6).
5. Въпреки че изследването IL-8 Luc използва като разтворител X-VIVO™ 15, с него правилно са оценени химикали с $\text{Log } K_{ow} > 3,5$ и тези с разтворимост във вода от около 100 µg/ml, изчислена с EPI Suite™, и неговата ефективност за откриване на сенсibiliзатори със слаба разтворимост във вода е по-добра от тази на изследването IL-8 Luc с използване на диметилсулфоксид (DMSO) като разтворител (2). Въпреки това отрицателните резултати за изпитвани химикали, които не са разтворени при 20 mg/ml, могат да доведат до неверни отрицателни резултати, дължащи се на

тяхната неспособност да се разтворят в X-VIVO™ 15. Поради това отрицателните резултати за тези химикали не следва да се вземат под внимание. В изследването за валидиране беше установено наличието на висок процент неверни отрицателни резултати за анхидриди. Освен това, поради ограничения метаболитен капацитет на клетъчната линия (8) и условията на опита про-хаптените (вещества, изискващи метаболитно активиране) и пре-хаптените (вещества, които се активират от окисление от въздуха) могат да дадат отрицателни резултати при изследването. Обаче независимо от това, че отрицателните резултати от съмнения за пре-/про-хаптени следва да се тълкуват предпазливо, изследването IL-8 Luc е оценило правилно 11 от 11 пре-хаптена, 6/6 про-хаптена, и 6/8 пре-/про-хаптена в набора от данни за изследването IL-8 Luc (2). Въз основа на неотдавнашния задълбочен преглед на три изпитвания, при които не се използват животни (DPRA, KeratinoSens™ и h-CLAT), за установяване на пре- и про-хаптени (9), както и въз основа на факта, че клетките THP-G8, използвани в изпитването IL-8 Luc, са клетъчна линия, получена от THP-1, която се използва в h-CLAT, изпитването IL-8 Luc може също да допринесе за увеличаване на чувствителността на изпитванията за установяване на пре- и про-хаптени, в комбинация с други изпитвания. Повърхностноактивни вещества, изпитвани до момента, дават (неверни) положителни резултати, независимо от техния вид (напр. катионни, анионни или нейонни). Накрая, химикали, които смущават луциферазата, могат да доведат до объркване при нейната активност/измерване, като предизвикват привидно инхибиране или повишена луминесценция (10). Например за концентрации на фитоестрогени, по-високи от 1 µM, има данни, че смущават сигналите за луминесценцията в други изпитвания с репортерни гени, основани на луциферазата, поради свръхактивиране на луциферазния репортерен ген. Вследствие на това експресията на луциферазата, получена при високи концентрации на фитоестрогени или съединения, за които се подозира, че предизвикват подобно на фитоестрогени активиране на луциферазния репортерен ген, трябва да бъде внимателно разглеждана (11). Въз основа на горното повърхностноактивните вещества, анхидридите и химикалите, пречещи на луциферазата, са извън областта на приложимост на това изследване. В случаите, когато са налице доказателства за неприложимостта на изследването IL-8 Luc по отношение на други специфични категории изпитвани химикали, изпитването не следва да се използва за тези специфични категории.

6. Както е описано по-горе, изследването IL-8 Luc подкрепя разграничаването между кожни сенсibiliзатори и непредизвикващи сенсibiliзация вещества. Необходима е допълнителна работа, за предпочитане въз основа на данни от хора, за да се определи дали резултатите от изследването IL-8 Luc могат да допринесат за оценката на потенциала, когато се разглеждат в комбинация с други източници на информация.

7. Определенията са дадени в допълнение 3.1.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

8. При изследването IL-8 Luc се използва моноцитната клетъчна линия THP-1 от левкемия при човека, която е получена от Американската банка за типови култури (Manassas, VA, САЩ). При използването на тази клетъчна линия департаментът по дерматология на Tohoku University School of Medicine създаде получена от THP-1 IL-8 репортерна клетъчна линия, THP-G8, носеща гените на луциферази Stable Luciferase Orange (SLO) и Stable Luciferase Red (SLR), съответно под контрола на промоторите IL-8 и глицералдехид-3-фосфатдехидрогеназа (GAPDH) (1). Това позволява количествено измерване на индукцията на луциферазния ген чрез откриване на луминесценция, получена от добре установени произвеждащи светлина луциферазни субстрати като показател за активността на IL-8 и GAPDH в клетките след експозиция на сенсibiliзиращи химикали.
9. Системата за изследване в два цвята включва луцифераза, излъчваща в оранжево (SLO; $\lambda_{\max} = 580 \text{ nm}$) (12) за генната експресия на промотора IL-8, както и на излъчваща в червено луцифераза (SLR); $\lambda_{\max} = 630 \text{ nm}$) (13) за генната експресия на промотора, използван като вътрешна контрола, GAPDH. Двете луциферзи излъчват различни цветове при реакция с d-луциферин от светулки и луминесценцията им се измерва едновременно в еднофазна реакция чрез разделяне на емисията от сместа за изследването, чрез използване на оптичен филтър (14) (допълнение 3.2).
10. THP-G8 клетките се третират в продължение на 16 часа с изпитвания химикал, след което се измерват активността на луциферазата SLO (SLO-LA), която отразява активността на IL-8 промотора, и активността на луциферазата SLR (SLR-LA), която отразява активността на GAPDH промотора. За да станат съкращенията лесни за разбиране, SLO-LA и SLR-LA се обозначават съответно като IL8LA и GAPLA. В таблица 1 е дадено описание на термините, свързани с луциферазна активност в изследването IL-8 Luc. Измерените стойности се използват за изчисляване на нормализирана IL8LA (nIL8LA), която е отношението на IL8LA към GAPLA; индукцията на nIL8LA (Ind-IL8LA), която е отношението на средноаритметичните стойности на четирикратно измерените стойности на nIL8LA на THP-G8 клетките, третирани с изпитван химикал, към стойностите на nIL8LA на нетретирани клетки THP-G8; и инхибирането на GAPLA (Inh-GAPLA), което е отношението на средноаритметичните стойности на четирикратно измерените стойности на GAPLA на THP-G8 клетките, третирани с изпитван химикал, към стойностите на GAPLA на нетретирани клетки THP-G8, и се използва като индикатор за цитотоксичност.

Таблица 1: Описание на термините, свързани с луциферазната активност при изследването IL-8 Luc

Съкращения	Определение
GAPLA	луциферазна активност на SLR, отразяваща активността на GAPDH промотора
IL8LA	луциферазна активност на SLO, отразяваща активността на IL-8 промотора
nIL8LA	IL8LA / GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA на THP-G8 клетки, третирани с химикали/nIL8LA на нетретирани клетки
Inh-GAPLA	GAPLA на THP-G8 клетки, третирани с химикали/GAPLA на нетретирани клетки
CV05	Най-ниската концентрация на химикала, при която Inh-GAPLA става < 0,05.

11. На разположение са стандарти за ефективност (PS) (15), за да се улесни валидирането на модифицирани *in vitro* IL-8 изпитвания с луцифераза, подобни на изследването IL-8 Luc, и да се даде възможност за съвременно изменение на Насока за изпитване 442Е на ОИСП с оглед на тяхното включване. Взаимното приемане на данни в ОИСП (MAD) ще бъде гарантирано само за изпитвания, валидирани съгласно PS, ако тези изпитвания са били проверени и включени в Насока за изпитване 442Е от ОИСП (16).

ДОКАЗВАНЕ НА ПРИГОДНОСТ

12. Преди рутинното използване на изпитването, описано в настоящото допълнение към метод за изпитване Б.71, лабораториите следва да докажат техническата си пригодност, като използват 10-те вещества за изпитване на пригодност, изброени в допълнение 3.3, в съответствие с добрите практики за *in vitro* методите (17). Освен това ползвателите на изпитването следва да поддържат база данни с данни за предходни периоди, получени с проверките на реакционната способност (вж. точка 15) и с положителни контроли и контроли на разтворител/носител (вж. точки 21—24), и да използват тези данни, за да потвърдят, че възпроизводимостта на изпитването в тяхната лаборатория се запазва с течение на времето.

ПРОЦЕДУРА

13. Стандартната работна процедура (СПП) за изследването IL-8 Luc е налице и следва да бъде използвана при провеждане на изпитването (18). Лабораториите, които желаят да извършват изпитването, могат да получат рекомбинантната клетъчна

линия THP-G8 от GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Япония, след подписване на Споразумение за трансфер на материал (МТА) в съответствие с условията в образца на ОИСР. В точките по-долу е представено описание на основните компоненти и процедури за изследването.

Подготовка на клетките

14. Клетъчна линия THP-G8 от GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Япония, следва да се използва за провеждането на изследването IL-8 Luc (вж. точки 8 и 13). След получаване клетките се размножават (2—4 пасажа) и се съхраняват замразени като хомогенни изходни култури. Клетките от тези изходни култури могат да бъдат размножавани до максимум 12 пасажа или най-много 6 седмици. Средата, използвана за размножаване, е среда за отглеждане RPMI-1640, съдържаща 10 % фетален говежди серум (FBS), антибиотичен/антимикотичен разтвор (100U/ml пеницилин G, 100µg/ml стрептомицин и 0,25µg/ml амфотерицин В в 0,85 % физиологичен разтвор) (напр. GIBCO Cat#15240-062), 0,15µg/ml пуромицин (напр. CAS: 58-58-2) и 300 µg/ml G418 (напр. CAS:108321-42-2).
15. Преди да бъдат използвани за изпитване, клетките следва да бъдат квалифицирани чрез извършване на проверка за реакционна способност. Тази проверка следва да бъде извършена 1—2 седмици или 2—4 пасажа след размразяването, като се използва положителната контрола, 4-нитробензилбромид (4-NBB) (CAS №: 100-11-8, чистота ≥ 99 %), и отрицателната контрола, млечна киселина (LA) (CAS:50-21-5, чистота ≥ 85 %). 4-NBB следва да даде положителен отклик на Ind-IL8LA ($\geq 1,4$), докато LA следва да даде отрицателен отклик на Ind-IL8LA ($< 1,4$). За изследването се използват само клетките, които преминават проверката за реакционна способност. Проверката следва да се извършва в съответствие с процедурите, описани в точки 22—24.
16. За изпитване THP-G8 клетките се посяват с плътност 2 до 5×10^5 клетки/ml и се извършва предварително култивиране в колби за клетъчни култури съответно от 48 до 96 часа. В деня на провеждане на изпитването клетките, събрани от колбите за клетъчни култури, се промиват с RPMI-1640, съдържащ 10 % FBS, без никакви антибиотици, и след това се ресуспендират с RPMI-1640, съдържащ 10 % от FBS, без никакви антибиотици, при 1×10^6 клетки/ml. След това клетките се разпределят в 96-ямкова плоскодонна черна плака (напр. Costar Cat#3603) с 50µl (5×10^4 клетки/ямка).

Приготвяне на изпитвания химикал и веществата за контроли

17. Изпитваният химикал и веществата за контроли се приготвят в деня на изпитването. По отношение на изследването IL-8 Luc изпитваните химикали се разтварят в X-

VIVO™ 15, налична в търговската мрежа безсерумна среда (Lonza, 04-418Q) до

к
р
а
й
н
а
т
а

к
о
н
ц
е

18. Първата изпитвателна серия има за цел да се определи цитотоксичната концентрация и да се изследва потенциалът за кожна сенсibiliзация на химикалите. С помощта на X-VIVO™ 15 серийните разреждания на изходните разтвори на изпитваните химикали в X-VIVO™ 15 се приготвят с коефициент на разреждане от две (вж. допълнение 3.5), като се използва 96-ямков блок за изследване (напр. Costar Cat#EW-01729-03). След това 50 µl/ямка разреден разтвор се добавя към 50 µl от клетъчната суспензия в 96-ямкова плоскодънна черна плака. Така за изпитвани химикали, които са разтворими в X-VIVO™ 15, крайните концентрации на изпитваните химикали варират от 0,002 до 2 mg/ml (допълнение 3.5). За изпитвани химикали, които не са разтворими в X-VIVO™ 15 при 20 mg/ml, се определят само коефициенти на разреждане, които варират от 2 до 2¹⁰, въпреки че действителните крайни концентрации на изпитваните химикали остават несигурни и зависят от концентрацията на наситените разтвори на изпитваните химикали в изходния разтвор X-VIVO™ 15.

19. При последващите изпитвателни серии (т.е. второ, трето и четвърто повторения) изходният разтвор X-VIVO™ 15 се приготвя в концентрация 4 пъти по-висока от концентрацията на клетъчна жизнеспособност 05 (CV05; най-ниската концентрация, при която Inh-GAPLA става < 0,05) в първия опит. Ако при най-високата концентрация в първата серия Inh-GAPLA не намалява под 0,05, изходният разтвор X-VIVO™ 15 се приготвя при най-високата концентрация в първата серия. Концентрацията на CV05 се изчислява, като концентрацията на изходния разтвор в първата серия се раздели на коефициента на разреждане за CV05 (X) (коефициент на разреждане CV05 (X); коефициентът на разреждане, изискван за разреждане на изходния разтвор до CV05) (вж. допълнение 3.5). За изпитвани вещества, които не са

15 се добавя към 20 mg изпитван химикал (независимо от разтворимостта на изпитвания химикал) в микроцентрофужна епруветка и се довежда до обем от 1 ml, след това се смесва енергично във вихров смесител и се разклаща на ротора при максимална скорост 8 rpm в продължение на 30 минути при температура на околната среда около 20 °C. Освен това, ако твърдите химикали са все още неразтворими,

разтворими в X VIVO при 20 mg/ml, CV05 се определя от концентрацията на изходния разтвор $\times 1/X$. За серии от 2 до 4 се приготвя втори изходен разтвор като 4 $\times$ CV50 (допълнение 3.5).

20. Серийните разреждания на вторите изходни разтвори на X-VIVO™ 15 се приготвят при коефициент на разреждане 1,5, като се използва 96-ямков блок за изследване. След това 50 μ l/ямка разреден разтвор се добавя към 50 μ l от клетъчната суспензия в ямките на 96-ямкова плоскодънна черна плака. Всяка концентрация на всеки изпитван химикал следва да бъде изпитана в 4 ямки. След това пробите се смесват с клатачна машина за плаки и се инкубират за 16 часа при 37 °C и 5 % CO₂, след което луциферазната активност се измерва, както е описано по-долу.
21. Контролата на разтворител е сместа от 50 μ l/ямка X-VIVO™ и 50 μ l/ямка клетъчна суспензия в RPMI-1640 със съдържание на 10 % FBS.
22. Препоръчителната положителна контрола е 4-NBB. 20 mg от 4-NBB се приготвят в микроцентрифужна епруветка от 1,5 ml, към която се добавя X-VIVO™ 15 до 1 ml. След това съдържанието на епруветката се смесва енергично във вихров смесител и се разклаща на ротор при максимална скорост 8 rpm в продължение на най-малко 30 минути. След центрофугиране при 20 000 g в продължение на 5 min, супернатантът се разрежда с коефициент 4 с X-VIVO™ 15 и 500 μ l от разредения супернатант се прехвърлят към ямка в 96-ямков блок за изследване. Разреденият супернатант се разрежда допълнително с X-VIVO™ 15 с коефициенти 2 и 4 и 50 μ l от разтвора се добавят към 50 μ l суспензия от THP-G8 клетки в ямките на 96-ямкова плоскодънна черна плака (допълнение 3.6). Всяка концентрация на положителната контрола следва да бъде изпитана в 4 ямки. Плаката се разбърква на клатачна машина за плаки и се инкубира в CO₂ инкубатор за 16 часа (37 °C, 5% CO₂), след което луциферазна активност се измерва както е описано в точка 29.
23. Препоръчителната положителна контрола е LA. 20 mg от LA се приготвят в микроцентрифужна епруветка от 1,5 ml, към която се добавя X-VIVO™ до 1 ml (20 mg/ml). Двадесет mg/ml разтвор на LA се разрежда с коефициент 5 с X-VIVO™ 15 (4 mg/ml); 500 μ l от този 4 mg/ml разтвор на LA се прехвърлят към ямка от 96-ямков блок за изследване. Този разтвор се разрежда с коефициент 2 с X-VIVO™ 15 и след това се разрежда отново с коефициент 2, за да се получат разтвори от 2 mg/ml и 1 mg/ml. 50 μ l от тези 3 разтвора и контрола на носител (X-VIVO™ 15) се добавят към 50 μ l от суспензия от THP-G8 клетки в ямките на 96-ямкова плоскодънна черна плака. Всяка концентрация на отрицателната контрола се изпитва в 4 ямки. Плаката се разбърква на клатачна машина за плаки и се инкубира в CO₂ инкубатор за 16 часа (37 °C, 5% CO₂), след което луциферазната активност се измерва както е описано в точка 29.

24. Могат да се използват други подходящи положителни или отрицателни контроли, ако има налични данни за предходни периоди, за извеждане на сравними критерии за приемливост на серията.
25. Следва да се вземат мерки за избягване на изпаряването на летливи изпитвани химикали и на кръстосаното замърсяване с изпитвани химикали между ямките, като напр. плаките се запечатат преди инкубирането с изпитваните химикали.
26. Изпитваните химикали и контролата на разтворител изискват от 2 до 4 серии, за да се изведе положителна или отрицателна прогноза (вж. таблица 2). Всяка серия се провежда в различен ден с пресен изходен разтвор в X-VIVO™ 15 на изпитваните химикали и независимо събрани клетки. Клетките могат да са от един и същ пасаж.

Измервания на луциферазната активност

27. Луминесценцията се измерва с луцинометър с 96-ямкова микроплака, оборудван с оптични филтри, напр. Phelios (ATTO, Токио, Япония), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Германия) и серията ARVO (PerkinElmer, Waltham, MA, САЩ). Луцинометърът трябва да се калибрира за всяко изпитване, за да се осигури възпроизводимост (19). За това калибриране на разположение са рекомбинантни луциферази, излъчващи в оранжево и в червено.
28. 100µl предварително затоплен реактив Tripluc® за изследване на луцифаза (Tripluc) се прехвърлят към всяка ямка на плаката, съдържаща клетъчната суспензия, третирана със или без химикал. Плаката се разклаща в продължение на 10 минути при температура на околната среда от около 20 °C. Плаката се поставя в луцинометъра за измерване на луциферазната активност. Биолуминесценцията се измерва в продължение на 3 секунди, всеки път при отсъствие (F0) и наличие (F) на оптичния филтър. Трябва да се представи обосновка ако се използват алтернативни настройки, например в зависимост от използвания модел на луцинометър.
29. Параметрите за всяка концентрация се изчисляват въз основа на измерените стойности, напр. IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, средната $\pm$ SD на IL8LA, средната стойност $\pm$ SD на GAPLA, средната стойност $\pm$ SD на nIL8LA, средната $\pm$ SD of Ind-ILV8LA, средната $\pm$ SD of Inh-GAPLA, средната $\pm$ SD of Inh-GAPLA, и 95 %-ия доверителен интервал на Ind-IL8LA. Определенията на параметрите, използвани в настоящата точка, са дадени съответно в допълнения I и IV.
30. Преди измерването, цветовото разграничаване при многоцветни изследвания на репортери обичайно се постига с помощта на детектори (луцинометър и четец за плаки), оборудвани с оптични филтри, като дълговълнови или късовълнови

пропускащи филтри с рязка граница между зоните, или лентово-пропускащи филтри. Коефициентите на пропускане на филтрите за всеки цвят на сигнала от биолуминесценция трябва да бъдат калибрирани преди изпитването, съгласно допълнение 3.2.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ

Оценка на данните

31. Критериите за положително/отрицателно решение изискват във всяка серия:

- прогноза от IL-8 Luc изследване да бъде счетена за положителна ако даден изпитван химикал има $\text{Ind-IL8LA} \geq 1,4$ и долната граница на доверителния 95 % интервал на $\text{Ind-IL8LA} \geq 1,0$
- прогноза от IL-8 Luc изследване да бъде счетена за отрицателна ако даден изпитван химикал има $\text{Ind-IL8LA} < 1,4$ и/или долната граница на доверителния 95 % интервал на $\text{Ind-IL8LA} < 1,0$

Модел на прогнозиране

32. Изпитваните химикали, които дават два положителни резултата от 1-та , 2-та , 3-та или 4-та серия, се определят като положителни, а тези, които дават три отрицателни резултата от 1-та , 2-та , 3-та или 4-та серия, се определят като предполагаеми отрицателни (таблица 2). Сред предполагаемите отрицателни химикали, химикалите, които са разтворени при 20 mg/ml с X-VOVO™ 15, се оценяват като отрицателни, а химикалите, които не са разтворени при 20 mg/ml с X-VOVO™ 15, не следва да бъдат разглеждани (фигура 1).

Таблица 2: Критерии за определяне на положителни и предполагаеми отрицателни

1-а серия	2-а серия	3-а серия	4-а серия	Крайна прогноза	
Положително	Положително	-	-	Положително	
	Отрицателно	Положително	-	Положително	
		Отрицателно	Положително	Положително	Положително
			Отрицателно	Предполагаемо отрицателно	
Отрицателно	Положително	Положително	-	Положително	
		Отрицателно	Положително	Положително	
			Отрицателно	Предполагаемо отрицателно	
		Отрицателно	Положително	Положително	Положително
	Отрицателно		Предполагаемо отрицателно		
		Отрицателно	Предполагаемо отрицателно		

Отрицателно	-	Предполагаемо отрицателно
-------------	---	---------------------------

Фигура 1: Модел за прогнозиране на крайна оценка



Критерии за приемливост

33. Когато се използва IL-8 Luc изследване трябва да са спазени следните критерии за приемливост.

- Ind-IL8LA следва да бъде повече от 5,0 поне в една концентрация на положителната контрола, 4-NBB, за всяка серия.
- Ind-IL8LA следва да бъде по-малко от 1,4 във всяка концентрация на отрицателната контрола, млечна киселина, за всяка серия.
- Данните от плаки, за които GAPLA от контролните ямки с клетки и Triplus, но без химикали, е по-малко от 5 пъти стойността на ямката, която съдържа само среда за изпитване (50 µl/ямка с RPMI-1640, съдържаща 10 % FBS, и 50 µl/ямка с X-VIVO™ 15) следва да се отхвърлят.
- Данните от плаки, за които стойността на Inh-GAPLA при всички концентрации на изпитваните или контролните химикали е по-малка от 0,05, следва да бъдат отхвърлени. В този случай първото изпитване трябва да се повтори, така че най-високата крайна концентрация от повторното изпитване да е най-ниската крайна концентрация от предходното изпитване.

Протокол от изпитването

34. Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Изпитвани химикали

Вещество с една съставка:

- Химична идентификация, като наименование(я) по IUPAC или по CAS, CAS номер(а), SMILES или InChI код, структурна формула, и/или други идентификатори;
- Външен вид, разтворимост във вода, молекулно тегло и допълнителни относими физични и химични свойства, според наличността;
- Чистота, химическа идентичност на онечистванията, както е целесъобразно и практически осъществимо и т.н.;
- Обработка преди изпитването, ако се прилага (напр. затопляне, смилане);
- Разтворимост в X-VIVO™ 15. За химикали, които са неразтворими в X-VIVO™ 15., независимо дали след центрофугирането се наблюдава утаяване или флотация;
- Изпитвана концентрация (концентрации);
- Условия на съхранение и стабилност, доколкото са налични;
- Обосновка за избора на разтворител/носител за всеки изпитван химикал, ако не е използван X-VIVO™ 15.

Вещество с повече съставки, UVCB и смес:

- характеризиране, доколкото е възможно, чрез химическата идентичност (вж. по-горе), чистотата, количествения състав и относимите физични и химични свойства на съставките (вж. по-горе), доколкото са налични.
- Външен вид, разтворимост във вода и допълнителни относими физични и химични свойства, според наличността;
- Молекулно тегло или привидно молекулно тегло в случай на смеси/полимери с известен състав или друга информация, относима към провеждането на изследването;
- Обработка преди изпитването, ако се прилага (напр. затопляне, смилане);
- Разтворимост в X-VIVO™ 15. За химикали, които са неразтворими в X-VIVO™ 15., независимо дали след центрофугирането се наблюдава утаяване или флотация;
- Изпитвана концентрация (концентрации);
- Условия на съхранение и стабилност, доколкото са налични.
- Обосновка за избора на разтворител/носител за всеки изпитван химикал, ако не е използван X-VIVO™ 15.

Контроли

Положителна контрола:

- Химична идентификация, като наименование(я) по IUPAC или по CAS, CAS номер(а), SMILES или InChI код, структурна формула, и/или други идентификатори;
- Външен вид, разтворимост във вода, молекулно тегло и допълнителни относими физични и химични свойства, според наличността, където е приложимо;
- Чистота, химическа идентичност на онечистванията, както е целесъобразно и практически осъществимо и т.н.;
- Обработка преди изпитването, ако се прилага (напр. затопляне, смилане);
- Изпитвана концентрация (концентрации);
- Условия на съхранение и стабилност, доколкото са налични;
- Препратка към резултатите за положителните контроли за предходни периоди, доказващи подходящи критерии за приемливост, ако е приложимо.

Отрицателна контрола:

- Химична идентификация, като наименование(я) по IUPAC или по CAS, CAS номер(а) и/или други идентификатори;
- Чистота, химическа идентичност на онечистванията, както е целесъобразно и практически осъществимо и т.н.;
- Външен вид, молекулно тегло и допълнителни относими физични и химични свойства, в случай че са използвани отрицателни контроли, различни от упоменатите в Насоките за изпитване и в зависимост от наличността;
- Условия на съхранение и стабилност, доколкото са налични;
- Обосновка за избора на разтворител за всеки изпитван химикал.

Условия на изпитване

- Име и адрес на финансиращия, на изпитващата лаборатория и на ръководителя на изследването;
- Описание на използваното изпитване;
- Използвана клетъчна линия, условия за нейното съхранение и източник (например мястото, от което е взета);

- Номер на партидата и произход на FBS, наименование на доставчика, номер на партидата на 96-ямковата плоскодънна черна плака и номер на партидата на реактива Tripluc;
- Брой на пасажите и клетъчна плътност, използвани за изпитването;
- Метод на преброяване на клетките, използван за посяване преди изпитването, и мерки, предприети за гарантиране на хомогенно разпределение на броя на клетките;
- Използван луцинометър (напр. модел), включително настройки, използван луциферазен субстрат, и доказване на съответни измервания на луминесценцията въз основа на контролното изпитване, описано в допълнение 3.2;
- Процедурата, използвана за доказване на пригодността на лабораторията за извършване на изпитването (например чрез изпитване на вещества за изпитването за пригодност), или за доказване на възпроизводимостта на характеристиките на изпитването във времето.

Процедура за изпитване

- Брой на извършените повторения и серии;
- Концентрации на изпитвания химикал, процедура за прилагане и време на експозицията (ако са различни от препоръчаните)
- Описание на използваните критерии за оценка и за решение;
- Описание на използваните критерии за приемливост на изследването.
- Описание на всякакви изменения на процедурата за изпитване.

Резултати

- Измервания на IL8LA и GAPLA;
- Изчисления за nIL8LA, Ind-IL8LA и Inh-GAPLA;
- 95 %-ият доверителен интервал на Ind-IL8LA;
- Графика, показваща кривите доза-отклик за индукцията на луциферазна активност и за жизнеспособността;
- Описание на всякакви други относими наблюдения, ако е приложимо.

Обсъждане на резултатите

- Обсъждане на резултатите, получени с IL-8 Luc изследването;
- Разглеждане на резултатите от изследването в контекста на IATA, ако е налична друга относима информация.

Заключение

ЛИТЕРАТУРА

- (1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci* 124:359-69.
- (2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. На разположение на адрес: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (3) OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. На разположение на адрес: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (4) OECD (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. На разположение на адрес: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol* 69:371-9.
- (6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 29:1816-30.
- (7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol* 71:337-51.
- (8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. (2010). A comparative

evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275-84.

- (9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147-155.
- (10) Thorne N, Inglese J, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.
- (11) OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en>.
- (12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286-91.
- (13) Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271-9.
- (14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891-4.
- (15) OECD (2017). To be published - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Paris, France
- (16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OECD, Paris, France.
- (17) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic

Cooperation and Development, Paris. На разположение на адрес:
http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf.

- (18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, Available at.
http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.
- (19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. *Photochem Photobiol* 86:1046-9.
- (20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OECD, Paris, France.
- (21) United Nations (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. На разположение на:
http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

Допълнение 3,1**ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

Точност: степента на близост между резултатите от изпитването и приетите референтни стойности. Това е мярка за ефективността на изпитването и един от аспектите на неговата относимост. Терминът често се използва взаимозаменяемо с термина „съответствие“, за да се обозначи относителният дял на правилните резултати при дадено изпитване (16).

АОР (път, водещ до неблагоприятен ефект): последователност от събития от химичната структура на прицелен химикал или група от сходни химикали през молекулното инициращо събитие до представляващ интерес *in vivo* резултат (20).

Химикал: Вещество или смес.

CV05: Клеъчна жизнеспособност 05, т.е. минимална концентрация, при която химикалите показват стойност на Inh-GAPLA по-малка от 0,05.

FInSLO-LA: Съкращение, използвано в доклада за валидиране и в предишни публикации по отношение на IL-8 Luc изследването за позоваване на Ind-IL8LA. За определението вж. Ind-IL8LA.

GAPLA: активност на Stable Luciferase Red (SLR) ($\lambda_{\max} = 630 \text{ nm}$) , регулирана от GAPDH промотора и показваща клетъчната жизнеспособност и броя на жизнеспособните клетки.

Опасност: Вътрешно присъщо свойство на даден агент или ситуация, притежаващо потенциал да предизвика неблагоприятни ефекти когато един организъм, система или (суб-)популация бъдат експонирани на този агент.

IATA (интегриран подход за изпитване и оценка): Структуриран подход, използван за идентифициране на опасност (потенциал), характеризиране на опасност (потенциал) и/или оценка на безопасността (потенциал и експозиция) на даден химикал или група от химикали, който стратегически интегрира и претегля всички данни, относими към предоставянето на информация за вземането на регулаторно решение по отношение на потенциалната опасност и/или риска, и/или необходимостта от допълнително целенасочено и следователно минимално изпитване.

II-SLR-LA: Съкращение, използвано в доклада за валидиране и в предишни публикации по отношение на IL-8 Luc изследването за позоваване на Ind-GAPLA. За определението вж. Ind-GAPLA.

IL-8 (интерлевкин-8): Цитокин, получен от ендотелиални клетки, фибробласти, кератиноцити, макрофаги и моноцити, който причинява хемотаксис на неутрофили и

Т-клетъчни лимфоцити.

IL8LA: луциферазна активност на Stable Luciferase Orange (SLO) ($\lambda_{\max} = 580 \text{ nm}$), която се регулира от IL-8 промотора.

Ind-IL8LA: кратност на индукция на IL8LA. Получава се чрез разделяне на nIL8LA на клетки THP-G8, третирани с химикали, на nIL8LA на нестимулирани THP-G8 клетки, и представлява индукцията на активността на IL-8 промотора от химикали.

Inh-GAPLA: Инхибиране на GAPLA. Получава се чрез разделяне на GAPLA на клетки THP-G8, третирани с химикали, на GAPLA на нетретирани THP-G8 клетки, и представлява цитотоксичност на химикалите.

Минимален праг на индукция (MIT): най-ниската концентрация, при която даден химикал отговаря на положителните критерии

Смес: смес или разтвор, съставени от две или повече вещества.

Вещество с една съставка: Вещество, определено от неговия количествен състав, в който съдържанието на една основна съставка е най-малко 80 % (w/w).

Вещество с повече съставки: Вещество, определено от неговия количествен състав, в който повече от една основна съставка се съдържа в концентрация $\geq 10\%$ (w/w) и $< 80\%$ (w/w). Веществото с повече съставки е резултат от производствен процес. Разликата между смес и вещество с повече съставки е, че дадена смес е получена чрез смесване на две или повече вещества без химична реакция. Веществото с повече съставки е резултат от химична реакция.

nIL8LA: луциферазната активност на SLO, отразяваща активността на IL-8 промотора (IL8LA), нормализирана с луциферазната активност на SLR луциферазата, отразяваща активността на GAPDH промотора (GAPLA). Представлява активността на IL-8 промотора след вземане предвид на клетъчната жизнеспособност или броя на клетките.

nSLO-LA: Съкращение, използвано в доклада за валидиране и в предишни публикации по отношение на IL-8 Luc изследването за позоваване на nIL8LA. За определението вж. nIL8LA.

Положителна контрола: Повторение, съдържащо всички компоненти на дадена изпитвана система и третирано с вещество, за което е известно, че предизвиква положителен отклик. За да гарантира, че може да се направи оценка на варирането на отклика в положителната контрола във времето, големината на положителния отклик не следва да е прекомерна.

Пре-хаптени: химикали, които стават сенсibiliзатори чрез абиотично преобразуване

Про-хаптени: химикали, които изискват ензимно активиране за реализирането на потенциал за кожна сенсibiliзация.

Относителност: описание на взаимовръзката между изпитването и ефекта, представляващ интерес, и дали тя е значима и полезна за определена цел. Това е степента, в която изпитването правилно измерва или прогнозира биологичния ефект, представляващ интерес. Относителността включва разглеждане на точността (съответствието) на дадено изпитване (16).

Надеждност: мярка за степента, в която дадено изпитване може да се извърши възпроизводимо в една и съща лаборатория и в различни лаборатории по различно време, като при извършването се използва един и същи протокол. Оценката за нея се прави, като се изчислява вътрешнолабораторната и междулабораторната възпроизводимост и вътрешнолабораторната повтораемост (16).

Серия: Серията представлява един или повече изпитвани химикали, изпитвани едновременно с контрола на разтворител/носител и с положителна контрола.

Чувствителност: Относителният дял от всички положителни/активни химикали, които са класифицирани правилно чрез изпитването. Това е мярка за точността на изпитването, което предоставя категорийни резултати, и е важен фактор при оценката на относителността на дадено изпитване (16).

SLO-LA: Съкращение, използвано в доклада за валидиране и в предишни публикации по отношение на IL-8 Luc изследването за позоваване на IL8LA. За определението вж. IL8LA.

SLR-LA: Съкращение, използвано в доклада за валидиране и в предишни публикации по отношение на IL-8 Luc изследването за позоваване на GAPLA. За определението вж. GAPLA.

Контрола на разтворител/носител: Нетретирана проба, съдържаща всички компоненти на изпитваната система, с изключение на изпитвания химикал, но включваща разтворителя/носителя, който се използва. Използва се за определяне на базовия отклик за пробите, третирани с изпитвания химикал, разтворен или стабилно диспергиран в същия разтворител/носител. Когато се изпитва с паралелна контрола на среда, тази проба показва също дали разтворителят/носителът взаимодейства с изпитваната система.

Специфичност: Относителният дял от всички отрицателни/неактивни химикали, които са класифицирани правилно чрез изпитването. Това е мярка за точността на изпитването, което предоставя категорийни резултати и е важен фактор при оценката на относителността на дадено изпитване (16).

Вещество: химичен елемент и неговите съединения в естествено състояние или получени чрез всеки производствен процес, включително всяка добавка, необходима

за запазване на стабилността на продукта и всеки примес, извлечен от използвания процес, с изключение на всеки разтворител, който може да бъде отделен, без да се засяга стабилността на веществото или да се променя неговият състав.

Повърхностноактивно вещество: също така наречено повърхностноактивен агент, представлява вещество, като например детергент, което е в състояние да намали повърхностното напрежение на дадена течност и по този начин да позволи образуването на пяна в течността или проникването ѝ в твърди вещества; Известно е също като мокрител. (TG437)

Изпитван химикал: Всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод.

THP-G8: IL-8 репортерна клетъчна линия, използвана в IL-8 Luc изследване. Макрофагоподобната човешка клетъчна линия THP-1 е трансфектирана с гени на SLO и SLR луцифери, съответно под контрола на IL-8 и GAPDH промотори.

Глобална хармонизирана система на Организацията на обединените нации за класифициране и етикетироване на химикали (GHS на ООН): система, предлагаща класифициране на химикали (вещества и смеси) според стандартизирани видове и степени на физическа, здравна и екологична опасност и разглеждаща съответни съобщителни елементи, като например пиктограми, сигнални думи, предупреждения за опасност, препоръки за безопасност и информационни листове за безопасност, така че те да съобщават информация за тяхното неблагоприятно въздействие с оглед защита на хората (включително работодатели, работещи, служители в транспорта, потребители и аварийни служители) и на околната среда (21).

UVCB: вещества с неизвестен или променлив състав, сложни продукти от реакции или биологични материали.

Валиден метод за изпитване: Изпитване, за което се смята, че притежава достатъчна относимост и надеждност по отношение на конкретна цел и което се основава на научно обосновани принципи. Дадено изпитване никога не е валидно в абсолютен смисъл, а само по отношение на определена цел.

Допълнение 3.2

ПРИНЦИП НА ИЗМЕРВАНЕ НА ЛУЦИФЕРАЗНАТА АКТИВНОСТ И ОПРЕДЕЛЯНЕ НА КОЕФИЦИЕНТИТЕ НА ПРОПУСКАНЕ НА ОПТИЧНИТЕ ФИЛТРИ ЗА SLO И SLR

Мултирепортерната система за изследване Triplus- може да се използва с луминометър от тип с микроплаки с многоцветна система за откриване, която може да бъде оборудвана с оптичен филтър (напр. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). Оптичният филтър, използван при измерването, е 600—620 nm дълговълнов или късовълнов филтър, или 600—700 nm лентово-пропускащ филтър.

Измерване на двуцветни луцифери с оптичен филтър.

Това е пример с използване на Phelios AB-2350 (ATTO). Този луминометър е оборудван с 600 nm дълговълнов филтър (R60 HOYA Co.), 600 nm LP, Филтър 1) за разделяне на SLO ($\lambda_{\max} = 580 \text{ nm}$) и SLR ($\lambda_{\max} = 630 \text{ nm}$) луминесценцията.

За определяне коефициентите на пропускане на 600 nm LP, първо, с използването на пречистени ензими, SLO и SLR луцифери, се измерва i) интензитетът на биолуминесценцията на SLO и SLR без филтър (F0), ii) интензитетът на биолуминесценцията на SLO и SLR, която преминава през 600 nm LP (Филтър 1), и iii) изчисляват се коефициентите на пропускане на SLO и SLR на 600 nm LP за SLO и SLR, изброени по-долу.

Transmission coefficients		Abbreviation	Definition
SLO	Filter 1 Transmission coefficients	κO_{R60}	The filter's transmission coefficient for the SLO
SLR	Filter 1 Transmission coefficients	κR_{R60}	The filter's transmission coefficient for the SLR

Когато интензитетът на SLO и SLR в изпитваната проба са определени съответно като O и R, i) светлинният интензитет без филтър (цялата оптична) F0 и ii) интензитетът на светлината, която се пропуска през 600 nm LP (Филтър 1) F1, са описани по-долу.

$$F0=O+R$$

$$F1=\kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$$

Тези формули могат да бъдат перифразирани по следния начин:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

След това, като се използват изчислените коефициенти на пропускане (κO_{R60} и κR_{R60}) и измерените F0 и F1, може да се изчисли O- и R-стойността, както следва:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

Материали и методи за определяне на коефициента на пропускане

(1) Реактиви

Отделни пречистени луциферазни ензими:

Лиофилизиран пречистен SLO ензим

Лиофилизиран пречистен SLR ензим

(които за работата по валидирането са получени от GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Япония, с клетъчна линия THP-G8)

Реактив за изследването:

Реактив Tripluc® за изследване с луцифераза (например от TOYOBO Cat#MRA-301)

Среда за изследване с луцифераза (30 ml, съхранявана при 2—8 °C)

Реактив	Конц.	Крайна конц. в средата	Изисквано количество
RPMI-1640	-	-	27 ml
FBS	-	10 %	3 ml

(2) Приготвяне на ензимен разтвор

В епруветка се разтваря лиофилизиран пречистен луциферазен ензим чрез добавяне на 200 µl 10 ~ 100 mM Tris/HCl или Hepes/HCl (pH 7,5 ~ 8,0), с добавка на 10 % (w/v) глицерол, ензимният разтвор се разделя на 10 µl-ови аликвотни части в 1,5 ml епруветки за еднократна употреба и те се съхраняват във фризера при -80 °C. Замразеният ензимен разтвор може да се използва за период до 6 месеца. Когато се използва, се добавя 1 ml от средата за изпитване с луцифераза (RPMI-1640 с 10% FBS) към всяка епруветка, съдържаща ензимните разтвори (разреден ензимен разтвор), и се държат върху лед, за да се предотврати

дезактивирането.

(3) Измерване на биолуминесценцията

Реактивът Tripluc[®] за изследване с луцифаза (Tripluc) се размразява и се държи при стайна температура или във водна баня, или при температурата на околния въздух. Луминометърът се включва 30 минути преди започване на измерването, за да се даде възможност за стабилизиране на фотоумножителя. 100 µl от разределения ензимен разтвор се прехвърлят в черна 96-ямкова плоскодънна плака (референтната SLO проба в # B1, # B2, # B3, референтната SLR проба в # D1, # D2, # D3). След това към всяка ямка на плаката, съдържаща разределения ензимен разтвор, с помощта на автоматична пипета се прехвърлят по 100 µl предварително затоплен Tripluc. Плаката се разклаща в продължение на 10 минути при стайна температура (около 25 °C) с помощта на клатачна машина за плаки. Ако се появят мехурчета от разтворите в плаките, тези мехурчета се отстраняват. Плаката се поставя в луминометъра за измерване на луциферазна активност. Биолуминесценцията се измерва в продължение на 3 секунди, всеки път при отсъствие (F0) и наличие (F) на оптичния филтър.

Коефициентът на пропускане на оптичния филтър е изчислен, както следва:

Коефициент на пропускане (SLO (κ_{OR60})) = (#B1 от F1 + #B2 от F1 + #B3 от F1) / (#B1 от F0 + #B2 от F0 + #B3 от F0)

Коефициент на пропускане (SLR (κ_{R60})) = (#D1 от F1 + #D2 от F1 + #D3 от F1) / (#D1 от F0 + #D2 от F0 + #D3 от F0)

Изчислените коефициенти на пропускане се използват за всички измервания, извършени с помощта на същия луминометър.

Контрол на качеството на оборудването

Следва да се използват процедурите, описани в протокола IL-8 Luc (18).

Допълнение 3.3

ВЕЩЕСТВА ЗА ИЗПИТВАНЕ ЗА ПРИГОДНОСТ

Преди рутинното използване на изпитването, описано в настоящото допълнение към метод за изпитване Б.71, лабораториите следва да докажат техническата си пригодност, като получат очакваната прогноза по IL-8 Luc изследването за 10-те вещества, препоръчани в Таблица 1, и чрез получаване на стойности, които попадат в съответния референтен обхват за минимум 8 от 10-те вещества за изпитване за пригодност (подбрани като представителни за размаха от отклици за опасностите от кожна сенсibiliзация). Други критерии за подбор бяха веществата да са налични в търговската мрежа и да са налични висококачествени *in vivo* референтни данни, както и висококачествени *in vitro* данни, получени по IL-8 Luc изследването. Също така са налични публикувани референтни данни за IL-8 Luc изследването (6) (1).

Таблица 1: Препоръчвани вещества за доказване на техническа пригодност по отношение на IL-8
Luc изследването

Вещество	CAS №	Рационалистический прогноз ¹	IL-8
			Референен размах (µg/ml) ³

2
,
4
-
Д
и
н
и
т
р
о
х
л
о
р
о
б
е
н
з
е
н
Ф
о
р
м
а
л
д
е
х
и
д
2
-
М
е
р
к
а
п
т
о
б
е
н
з
о
т
и
а
з

50-00-0

Н
е
р
а
в
ъ
т
р
в
о
р
и
м
Сенсибилизатор
(изключително силен)
П
о
л
о
ж
и
т
е
л
н
о

Р
а
е
з
ч
т
н
в
о
о
с
р
т
и
м
Сенсибилизатор
(силен)
П
о
л
о
ж
и
т
е
л
н
о

Н
е
р
а
в
ъ
т
р
в
о
р
и
м
Сенсибилизатор
(умерен)
П
о
л
о
ж
и
т
е
л
н
о

о
л

Е
т
и
л
е
н
д
и
а
м
и
н
Д
и
м
е
т
а
к
р
и
л
а
т
н
а
е
т
и
л
е
н
г
л
и
к
о
л
а
4
-
А
л
и
л
а
н
и
з
о
л

Р
а
е
з
ч
т
н
в
о
о
с
р
т
и
м

Сенсибилизатор
(умерен)

П
о
л
о
ж
и
т
е
л
н
о

Н
е
Т
р
е
а
ч
з
н
т
о
в
с
о
т
р
и
м

Сенсибилизатор
(слаб)

П
о
л
о
ж
и
т
е
л
н
о

Н
е
Т
р
е
а
ч
з
н
т
о
в
с
о
т
р
и
м

Сенсибилизатор
(слаб)

П
о
л
о
ж
и
т
е
л
н
о

(Естрогол

Стрептомицин сулфат

Глицерол

Изопропагенол

Р
а
Т з
в т
ъ в
р о
д р
и
мНепредизвикващо
сенсibilизация
веществоО
т
р
и
ц
а
т
е
л
н
оР
а
Т а
е з
ч т
н в
о о
с р
т и
мНепредизвикващо
сенсibilизация
веществоО
т
р
и
ц
а
т
е
л
н
о
оР
а
Т а
е з
ч т
н в
о о
с р
т и
мНепредизвикващо
сенсibilизация
веществоО
т
р
и
ц
а
т
е
л
н
о

Съкращения: CAS № = регистрационен номер по Службата за химични индекси.

¹ *in vivo* потенциалът е изведен с използване на критериите, предложени от ECETOC (19).

² Въз основа на наблюдавани стойности за предходни периоди (1) (6).

³ CV05 и IL-8 Luc MIT бяха изчислени с помощта на разтворимостта във вода, дадена от EPI Suite™.

⁴ CV05: минималната концентрация, при която химикалите показват стойност на Inh-GAPLA по-малка от 0,05.

⁵ MIT: най-ниските концентрации, при които даден химикал отговаря на положителните критерии

Допълнение 3.4

ИНДЕКСИ И КРИТЕРИИ ЗА ОЦЕНКА

nIL8LA (nSLO-LA)

j-тото повторение ($j = 1-4$) на i-тата концентрация ($i = 0-11$) се измерва съответно за IL8LA (SLO-LA) и GAPLA (SLR-LA). Нормализираната IL8LA, посочена като nIL8LA (nSLO-LA), и се определя като:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

Това е базовата единица на измерване в това изследване.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Кратното увеличение на усреднената nIL8LA (nSLO-LA) за повторението при i-тата концентрация, сравнена с него при концентрация 0, Ind-IL8LA, е първичната мярка на това изследване. Това съотношение се изчислява по следната формула:

$$Ind - IL8LA_i = \{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{ij}\} / \{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{0j}\}$$

Водещата лаборатория предложи стойност от 1,4 да съответства на положителен резултат за изпитвания химикал. Тази стойност се основава на проучването на данните на водещата лаборатория за предходни периоди. След това екипът за управление на данните използва тази стойност през всички фази на проучването за валидиране. Първичният резултат, Ind-IL8LA, е отношението на 2 средноаритметични стойности, както е показано в уравнението.

95 % доверителен интервал (95 % ДИ)

95 %-ят доверителен интервал (95 % ДИ) въз основа на съотношението може да се оцени, така че да се покаже точността на тази първична мярка за резултати. Долната граница на 95 % ДИ ≥ 1 показва, че nIL8LA при i-та концентрация е значимо по-голяма от тази при контролата на разтворител. Съществуват няколко начина за построяване на 95 % ДИ. В това проучване използвахме метода, познат като теорема на Fieller. Тази теорема за доверителен интервал от 95 % се получава по следната формула:

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A} \right],$$

където:

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}, \quad B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}, \quad C = \bar{y}_i^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{ and } n_0 = 4,$$

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}, \quad sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \bar{x}_0)^2,$$

$$n_{yi} = 4, \quad \bar{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij}), \quad sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yi} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \bar{y}_i)^2.$$

$t_{0.975(v)}$ е 97,5 перцентил на централното t-разпределение с v на степента на свобода, където

$$v = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0} \right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Inh-GAPLA е съотношение на усреднената GAPLA (SLR-LA) за повторението на i -тата концентрация в сравнение с това при контролата на разтворител, и се изписва с

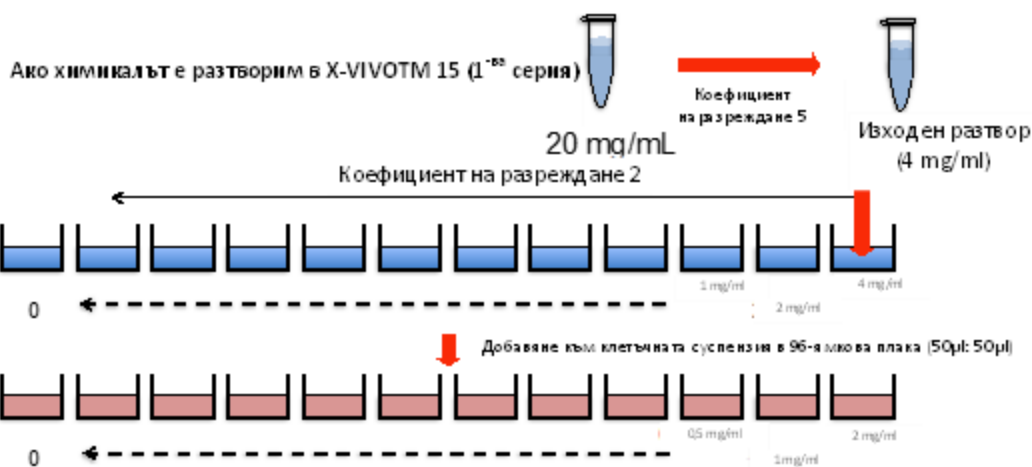
$$Inh - GAPLA_i = \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij}\} / \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j}\}.$$

Тъй като GAPLA е знаменателят на nIL8LA, една изключително малка стойност причинява голямо вариране в nIL8LA. Поради това стойностите на Ind-IL8LA с изключително малка стойност на Inh-GAPLA (под 0,05) могат да се считат за недобра прецизност.

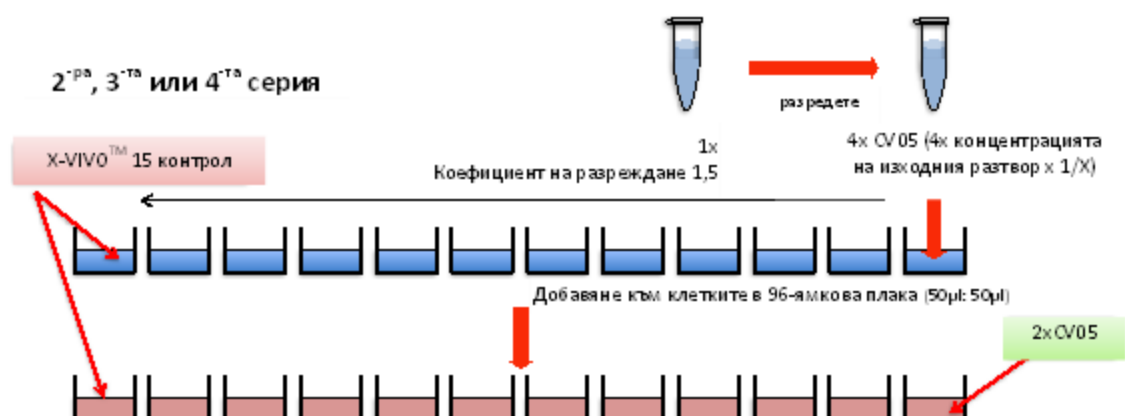
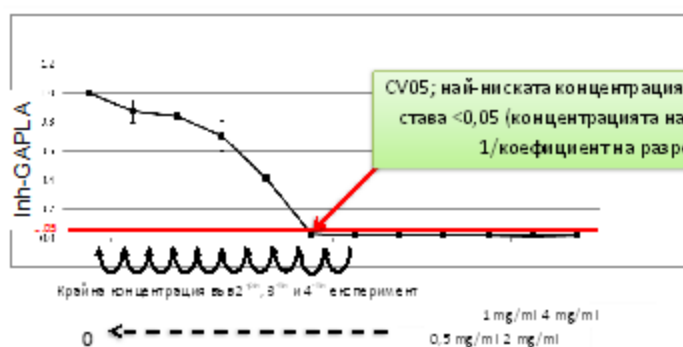
Допълнение 3.5

СХЕМАТА НА МЕТОДИТЕ ЗА РАЗТВАРЯНЕ НА ХИМИКАЛИ ЗА IL-8 LUC ИЗСЛЕДВАНЕТО.

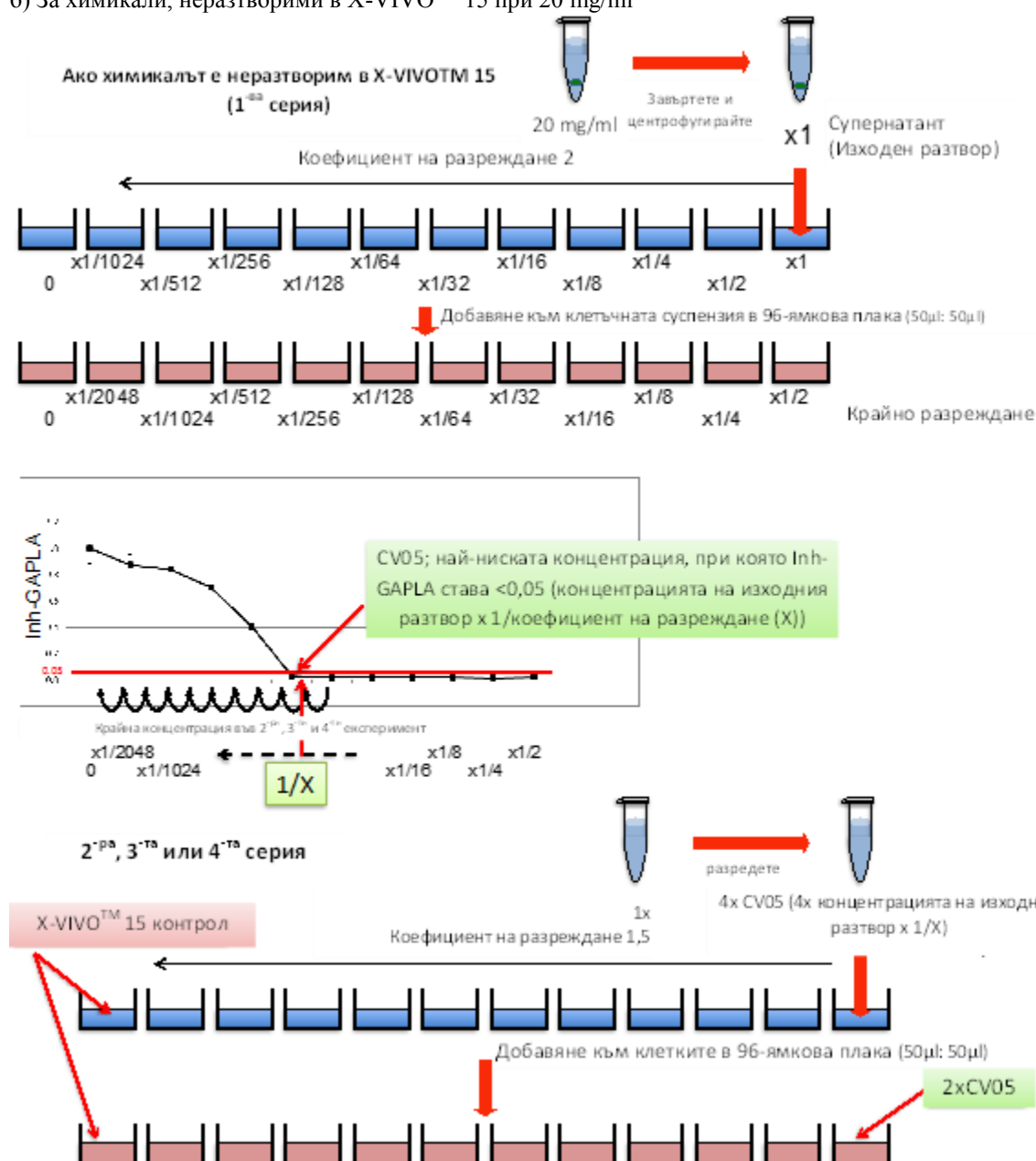
а) За химикали, разтворени в X-VIVO™ 15 при 20 mg/ml



Определяне на най-високата концентрация на следните експерименти

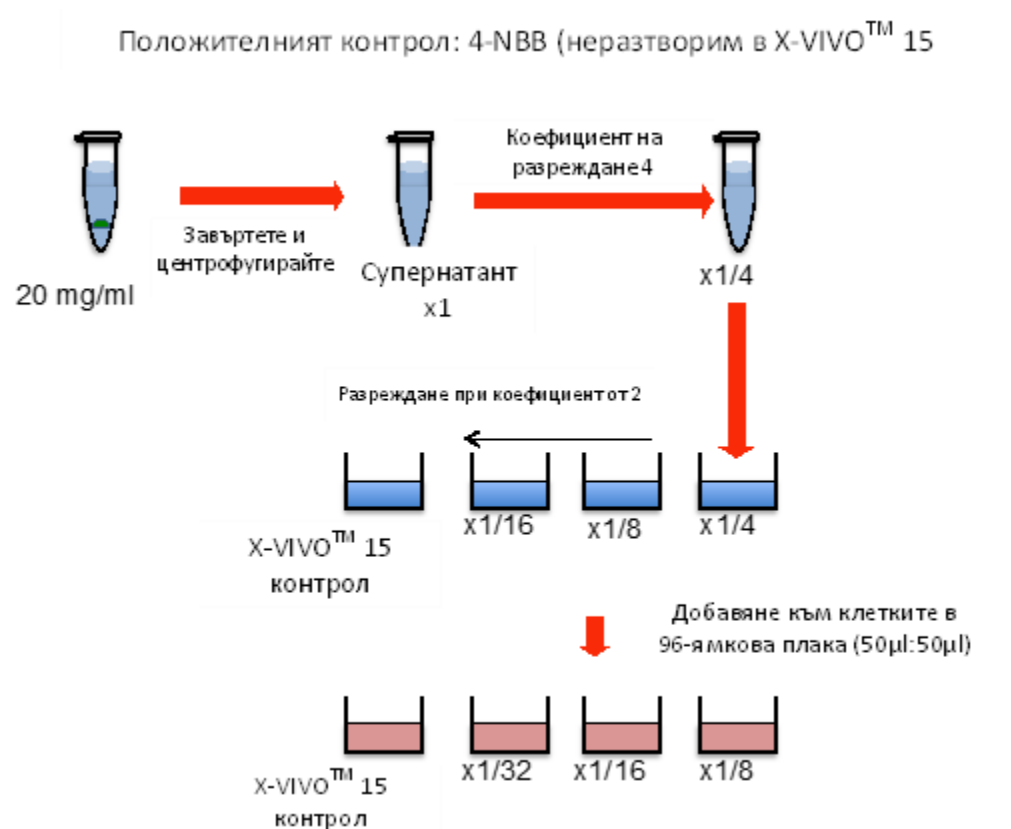


б) За химикали, неразтворими в X-VIVO™ 15 при 20 mg/ml



Допълнение 3.6

СХЕМАТА НА МЕТОДА ЗА РАЗТВАРЯНЕ НА 4-NBB ЗА ПОЛОЖИТЕЛНАТА КОНТРОЛА ПРИ IL-8 LUC ИЗСЛЕДВАНЕТО.



“

9) В част В се добавят следните глави:

„B.52 ИЗПИТВАНЕ С ЯПОНСКА ОРИЗИЯ ЗА ВЪЗПРОИЗВЕЖДАНЕ В ЕДНО ПОКОЛЕНИЕ С УДЪЛЖЕНИЕ (MEOGRT)

ВЪВЕДЕНИЕ

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСР (TG) 240 (2015). Изпитването с японска оризия в едно поколение с удължение (MEOGRT) описва цялостен метод за изпитване, основан на риби, експонирани през множество поколения, за получаване на данни, относими към оценката на екологичната опасност и риска от химикали, включително за които се подозира, че нарушават функционирането на ендокринната система. Експозицията в MEOGRT продължава до излюпването (до две седмици след оплождането — wpf) във второто поколение (F2) . Ще бъдат необходими допълнителни проучвания, за да се обоснове ползата от удължаване при поколение F2 след излюпването; понастоящем няма достатъчно информация, за да се осигурят относими условия или критерии, които да оправдават удължаването при поколение F2. Този метод за изпитване обаче може да бъде актуализиран при разглеждане на нова информация и данни. Например, насоки за удължаването при поколение F2 през възпроизводството могат да бъдат потенциално полезни при определени обстоятелства (напр. химикали с висок потенциал на биоконцентрация или индикации за трансгенерационни ефекти при други таксони). Този метод за изпитване може да се използва за оценка на потенциалното хронично въздействие върху риби на химикали, включително на химикали, потенциално нарушаващи функционирането на ендокринната система. Методът придава първостепенно значение на потенциалните относими към популацията въздействия (а именно неблагоприятно въздействие върху преживяемостта, развитието, растежа и възпроизводството) при изчисляването на концентрацията без наблюдавано въздействие (NOEC) или концентрацията с ефект (EC_x), въпреки че следва да се отбележи, че подходите на EC_x рядко са подходящи за големи изследвания от този тип, при които увеличаването на броя на изпитваните концентрации, така че да се даде възможност за определяне на желаната EC_x, може да е непрактично, което може също да причини значителни опасения за хуманното отношение към животните поради големия брой използвани животни. За химикали, за които не се изисква оценка при „множество поколения“ или химикали, които не са потенциални нарушители на функционирането на ендокринната система, може да са по-подходящи други методи за изпитване (1). Японската оризия е подходящият вид за използване в настоящия метод за изпитване, предвид краткия му жизнен цикъл и възможността за определяне на генетичния му пол (2), което се счита за критичен компонент в настоящия метод за изпитване. Конкретните методи и крайни точки от

наблюдения, описани подробно в настоящия метод, са приложими само за японската оризия. Други малки рибни видове (например зеброво данио) могат да бъдат адаптирани към подобен протокол за изпитване.

2. Настоящият метод за изпитване измерва няколко биологични крайни точки. Основният акцент се отдава на потенциалните неблагоприятни ефекти за относимите към популацията параметри, включително преживяемостта, макроскопското развитие, растежа и възпроизводството. На второ място, с цел да се осигури механистична информация и да се осигури връзка между резултатите от други видове полеви и лабораторни изследвания, когато има *a posteriori* доказателства за химикал с потенциална активност, нарушаваща функционирането на ендокринната система (например андрогенна или естрогенна активност при други изпитвания и изследвания), тогава се получава друга полезна информация чрез определяне на иРНК на *вителогенина* (*vtg*), или вителогенинов белтък (VTG), фенотипни вторични полови белези (SSC), като свързани с генетичния пол, и хистопатологична оценка. Следва да се отбележи, че ако даден изпитван химикал или неговите метаболити не са подозирани, че са нарушители на функционирането на ендокринната система, може да не е необходимо да се измерват тези вторични крайни точки, а може да бъдат по-подходящи изследвания с по-малко ресурси и по-малко интензивни изследвания с животни (1). Определенията, използвани за този метод за изпитване, са дадени в допълнение 1.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

3. Поради ограничения брой изпитвани химикали и лаборатории, участващи във валидирането на това доста сложно изследване, се очаква, че когато има достатъчно изследвания, за да се установи въздействието на този нов модел на изследване, методът за изпитване ще бъде преразгледан и ако е необходимо, преработен с оглед на придобития опит. Данните могат да се използват на ниво 5 от концептуалната рамка на ОИСП за изпитване и оценка на веществата, нарушаващи функционирането на ендокринната система (3). Методът за изпитване започва с експозицията на половозрели риби (поколението F0) на изпитвания химикал по време на възпроизводството. Експозицията продължава през развитието и възпроизводството в F1, и излюпването в поколение F2; по този начин изследването позволява оценка както на структурни, така и на активационни ендокринни пътища. При тълкуването на крайните точки, свързани с ендокринната система, може да се приложи подход, основан на тежестта на доказателствата.
4. Изследването следва да включва достатъчен брой индивиди, за да се осигури достатъчна мощност за относимите към възпроизводството крайни точки (вж.

допълнение 3), като същевременно се гарантира, че броят на използваните животни е необходимият минимум, от съображения за хуманно отношение към животните. С оглед на големия брой използвани опитни животни е важно внимателно да се разгледа необходимостта от провеждане на изпитването във връзка със съществуващи данни, които вече могат да съдържат относима информация за много от крайните точки в MEOGRT. Известна помощ в това отношение може да бъде получена от рамката на ОИСП за изпитване на токсичността при риби (1).

5. Методът за изпитване е разработен главно за разграничаване на ефектите от отделно взето вещество. Ако обаче се изисква изпитване върху смес, следва да се прецени дали то ще осигури приемливи резултати за предвидената регулаторна цел.
6. Преди започване на изпитването е важно да се разполага с информация за физичните и химичните свойства на изпитвания химикал, по-специално за да се позволи приготвянето на стабилни разтвори на химикала. Необходимо е също така да се разполага с достатъчно чувствителен метод за анализ за проверката на концентрациите на изпитвания химикал.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

7. Изпитването започва с експозиция на полово зрели мъжки и женски животни (най-малко 12 wpf) в двойки за размножаване в продължение на 3 седмици, през които изпитваният химикал се разпространява в организма на родителското поколение (F0) в съответствие с неговото токсикокинетично поведение. Колкото е възможно по-близо до първия ден на четвъртата седмица, хайверът се събира за началото на поколение F1. По време на отглеждането на поколение F1 (общо 15 седмици) се прави оценка на способността за излюпване и преживяемостта. Освен това проби от риби се вземат при 9 — 10 wpf, за крайни точки за развитието и хвърлянето на хайвер се оценява за три седмици, от 12 до 14 wpf. Поколение F2 започва след третата седмица от оценката на възпроизводството и се отглежда до завършване на излюпването.

КРИТЕРИИ ЗА ВАЛИДНОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО

8. Прилагат се следните критерии за валидност на изпитването:
 - концентрацията на разтворен кислород трябва да бъде ≥ 60 % от стойността на насищане при равновесие с атмосферния въздух (ASV) по време на изпитването;

- средната температура на водата за целия период на изследването трябва да бъде между 24 °C и 26 °C. Кратковременните отклонения от средната стойност при отделните аквариуми не трябва да надвишават 2 °C;
- Средната плодовитост при контролите във всяко от поколенията (F0 и F1) трябва да надвишава 20 хайверни зърна на двойка на ден. Оплождаването при всички хайверни зърна, получени по време на оценката, следва да бъде по-голямо от 80 %. В допълнение, от 16 от препоръчителните 24 двойки за размножаване от контролите (> 65 %) следва да се получат повече от 20 хайверни зърна на двойка на ден;
- Способността за излюпване при хайверните зърна трябва да бъде ≥ 80 % (средно) при контролите (във всяко от поколенията F1 и F2);
- Преживяемостта след излюпването до 3 wpf и от 3 wpf до края на поколение F1 (т.е. 15 wpf) следва да бъде съответно ≥ 80 % (средно) и ≥ 90 % (средно) при контролите (F1);
- следва да бъдат на разположение доказателства, че концентрацията на изпитвания химикал в разтвора е била задоволително поддържана в рамките на ± 20 % от усреднените измерени стойности;

По отношение на температурата на водата, макар и да не е критерий за валидност, повторенията в рамките на едно третиране не следва да бъдат статистически различни едно от друго, а третираните групи в рамките на изпитването не трябва да бъдат статистически различни една от друга (въз основа на ежедневни измервания на температурата и като се изключат кратковременните отклонения).

9. Въпреки че може да се наблюдава намаляване на възпроизводството в групите с по-голяма експозиция, следва да има достатъчно възпроизводство поне в третата най-висока група и във всички групи на F0 по-надолу, за да се запълнят инкубаторите за излюпване. Освен това следва да има достатъчна преживяемост на ембриона в групата с третата най-висока и в тези с по-ниска експозиция в F1, за да се даде възможност за оценка на крайните точки при пробовземането на субадултни екземпляри (вж. точки 36 и 38 и допълнение 9). Освен това трябва да има поне минимална преживяемост след излюпването (~ 20 %) в групата с втората най-висока експозиция на F1. Това не са критерии за валидност сами по себе си, а препоръки, позволяващи да се изчислят статистически устойчиви стойности на NOEC.
10. Ако се наблюдава отклонение от критериите за валидност на изпитването, последиците следва да се съобразят с надеждността на резултатите от изпитването и тези отклонения и съображения следва да бъдат включени в протокола от изпитването.

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

Апаратура

11. Обикновено лабораторно оборудване и специално следното:

- а) устройства за измерване на съдържанието на кислород и рН-метри;
- б) оборудване за определяне твърдост и алкалност на водата;
- в) подходяща апаратура за контрол на температурата и за предпочитане непрекъснат мониторинг;
- г) съдове, направени от химически инертни материали и с подходящ капацитет по отношение на препоръчителната гъстота на зареждане и отглеждане (вж. допълнение 3);
- д) подходящи точни везни (т.е. точност до $\pm 0,5$ mg).

Вода

12. Всяка вода, в която изпитваният вид показва съответните признаци за дългосрочно преживяване и растеж, може да се използва като вода за изпитването. Необходимо е постоянно качество на водата по време на изпитването. За да се гарантира, че водата за разреждане няма да повлияе неправилно върху резултата от изпитването (например чрез образуване на комплекс с изпитвания химикал) или да навреди на параметрите на рибния запас за размножаване, пробите за анализ следва да се вземат на интервали. Правят се измервания на тежки метали (например Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), основни аниони и катиони (например Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), пестициди, общ органичен въглерод и суспендирани твърди частици, например на всеки шест месеца, когато се знае, че водата за разреждане има относително постоянно качество. Някои от химичните характеристики на приемливата вода за разреждане са изброени в допълнение 2. Стойността на рН на водата следва да е от 6,5 до 8,5, но по време на дадено изпитване трябва да е в диапазон $\pm 0,5$ рН единици.

Система на експозиция

13. Не са посочени конструкцията и материалите, използвани за системата за експозиция. За конструкцията на системата за изпитване следва да се използват стъкло, неръждаема стомана или друг химически инертен материал, които не са били замърсени при предишни изпитвания. За целите на това изпитване, подходяща система за експозиция може да се състои от непрекъсната проточна система (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13).

Разтвори за изпитване

14. Изходният разтвор на изпитвания химикал следва да бъде доставен в системата за експозиция с подходяща помпа. Дебитът на изходния разтвор следва да се калибрира в съответствие с аналитичното потвърждаване на изпитваните разтвори преди иницирирането на експозицията, и обемът да се проверява периодично по време на изпитването. Разтворът за изпитване във всяка камера се обновява в достатъчна степен (напр. най-малко 5 обновявания на обем/ден до 16 обновявания на обем/ден или до 20 ml/min поток) в зависимост от стабилността на изпитвания химикал и качеството на водата.
15. Разтворите за изпитване при избраните концентрации се приготвят чрез разреждане на изходен разтвор. Изходният разтвор следва да се приготвя за предпочитане чрез просто смесване или разбъркване на изпитвания химикал във водата за разреждане, като се използват механични средства (например разклащане и/или с помощта на ултразвук). За постигане на подходящо концентриран изходен разтвор могат да се използват колони/системи за насищане или методи за пасивно дозиране (14). Следва да се положат всички усилия за избягване на използването на разтворители или носители, защото: 1) някои разтворители сами по себе си могат да доведат до токсичност и/или нежелани или неочаквани отклици, 2) изпитването на химикали над водоразтворимостта им (както често може да се случи при използването на разтворители) може да доведе до неточно определяне на ефективните концентрации, 3) използването на разтворители в по-дългосрочни изпитвания може да доведе до значителна степен на „образуване на биофилм“, свързано с микробна активност, което може да повлияе на условията на околната среда, както и на способността да се поддържат концентрации на експозиция, и 4) при липса на данни от предходни периоди, които показват, че разтворителят не оказва влияние върху резултата от изследването, употребата на разтворители изисква третиране на контроли на разтворител, което има последици за хуманното отношение към животните, като се изискват допълнителни животни за провеждане на изпитването. За трудни за изпитване химикали могат да се използват разтворители в краен случай, и за определяне на най-добрия метод следва да бъде консултиран документ 23 на ОИСП с насоки за изпитване за токсичност във водна среда на трудни вещества и смеси (15). Изборът на разтворител се определя чрез химичните свойства на изпитвания химикал и наличието на данни от предходни периоди относно употребата на разтворителя. Ако се използват носители на разтворител, следва да се направи оценка на подходящите контроли на разтворител, в допълнение към контролите, които не са разтворител (отрицателни) (само на вода за разреждане). В случай, че употребата на даден разтворител е неизбежна и се извършва микробна активност (образуване на биофилм), препоръчва се записване/отчитане на образуването на биофилм на съд (поне веднъж седмично) по време на цялото изпитване. В идеалния случай концентрацията на разтворителя следва да се поддържа постоянна в

контролата на разтворител и всички третираня по изпитването. Ако концентрацията на разтворителя не се поддържа постоянна, в контролата на разтворител следва да се използва най-високата концентрация на разтворителя в третиране при изпитването. В случаите, когато се използва носител на разтворител, максималните концентрации на разтворителя не трябва да надвишават 100 µl/l или 100 mg/l (15) и се препоръчва да се поддържа концентрацията на разтворителя възможно най-ниско (напр. < 20 µl/l), за да се избегне потенциалното въздействие на разтворителя върху измерените крайни точки (16).

Изпитвани животни

Избор и отглеждане на риби

16. Изпитваният вид е японската оризия *Oryzias latipes* поради краткия му жизнен цикъл и възможността за определяне на генетичния пол. Въпреки че други малки рибни видове могат да бъдат адаптирани към подобен протокол за изпитване, конкретните методи и крайни точки от наблюдения, описани подробно в настоящия метод за изпитване, са приложими само за японската оризия (вж. точка 1). Японската оризия се отглежда лесно в плен; съществуват публикувани методи за нейното отглеждане (17) (18) (19), като са достъпни данни от изпитвания за краткосрочната леталност, за ранни стадии от живота и за целия жизнен цикъл (5) (6) (8) (9) (20). Всички риби се излагат на светлина на периоди с продължителност 16 часа светлина — 8 часа тъмнина. Рибите са хранени с живи науплии от артемии (*Artemia* spp.), които при необходимост могат да бъдат допълнени с налична в търговската мрежа храна във вид на люспи. Наличната в търговската мрежа храна във вид на люспи следва редовно да се анализира за съдържание на замърсители.
17. Ано се спазват подходящи практики за развъждане, не се изисква конкретен протокол за отглеждане. Например японската оризия може да се отглежда в 2-литрови съдове с 240 ларви на риби във всеки съд до 4-та wpf, след това те могат да се отглеждат в 2-литрови съдове с 10 риби във всеки съд до 8-та wpf, след което двойките за размножаване се прехвърлят в 2-литрови съдове.

Аклиматизация и избор на риби

18. Изпитваните риби следва да бъдат избрани от един единствен лабораторен запас, който е бил аклиматизиран в продължение на най-малко две седмици преди изпитването при условия на качеството на водата и осветеност, подобни на използваните при изпитването (Забележка: този период на аклиматизация не е период преди експозицията *in situ*). Препоръчва се изпитваните риби да са получени от отглеждане вътре в лабораторията, тъй като превозът на полово зрели риби е стресиращ и може да попречи на надеждното хвърляне на хайвера. Рибите следва да

бъдат хранени с науплии от артемии два пъти на ден през целия период на държане и по време на фазата на експозиция, допълнени с налична в търговската мрежа храна във вид на люспи, ако е необходимо. За да се осигури адекватно възпроизводство, за започване на това изпитване за необходими се смятат минимум 42 двойки за размножаване (54 двойки за размножаване, ако се изисква контрола на разтворител, отчасти поради липса на данни за предходни периоди в подкрепа на използването само на контролата на разтворител). Освен това, за всяка двойка за размножаване от F0 следва да се провери, че е XX-XY (т.е. нормално допълване на полови хромозоми при всеки пол), за да се избегне евентуалното включване на спонтанни XX мъжки индивиди (вж. точка 39).

19. По време на аклиматизационната фаза смъртността при рибите за отглеждане трябва да бъде документирана и трябва да се приложат следните критерии след 48-часов период на адаптиране:

- При смъртност, по-голяма от 10 % от популацията за отглеждане седем дни преди прехвърлянето към системата за изпитване: отхвърля се цялата партида;
- При смъртност между 5 и 10 % от популацията за отглеждане седем дни преди прехвърлянето към системата за изпитване: аклиматизация за седем допълнителни дни към 2-седмичния период на аклиматизация; ако смъртността е повече от 5% през вторите седем дни, цялата партида се отхвърля;
- При смъртност под 5 % от популацията седем дни преди прехвърлянето към системата за изпитване: партидата се приема.

20. Рибите не трябва да бъдат лекувани за заболяване в рамките на периода на аклиматизация от две седмици преди изпитването, нито по време на периода на експозиция и ако е възможно, лечение на заболявания следва напълно да се избягва. В проучването не трябва да се използват риби с клинични признаци на заболяване. Следва да се поддържа регистър на наблюденията и профилактичното и терапевтичното лечение на заболявания през периода на отглеждане, предхождащ изпитването.

21. Фазата на експозиция следва да започне с полово диморфни, с определен генетичен пол полово зрели риби, от лабораторна популация полово зрели животни, отглеждана при температура 25 ± 2 °C. Рибите следва да бъдат идентифицирани като доказано годни за размножаване (т.е. да са дали жизнеспособно потомство) по време на седмицата, предшестваща експозицията. За цялата група риби, използвани в изпитването, диапазонът на индивидуалните тегла по пол в началото на изпитването следва да се поддържа в рамките на ± 20 % от средноаритметичната стойност на теглото, измерена за същия пол. Подпроба от риби трябва да се претегли преди

изпитването, за да се оцени средното тегло. Избраните риби следва да са най-малко на 12 wpf, с тегло ≥ 300 mg за женските и ≥ 250 mg за мъжките.

ПЛАНИРАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО

Концентрации на изпитване

22. Препоръчва се да се използват пет концентрации на химикали плюс контрола (и). Всички източници на информация следва да бъдат взети предвид при подбора на обхвата на изпитваните концентрации, включително на количествените зависимости структура-активност (QSAR), read-across от аналози, резултати от изпитвания на риби, като например изпитвания за смъртност в резултат от остра токсичност (глава B.1 от настоящото приложение), краткосрочното изследване на репродуктивната способност на риби (глава B.48 от настоящото приложение) и други методи за изпитване, например глави B.15, B.37, B.41, B.47 или B.49 от настоящото приложение (21) (22) (23) (24) (25) (26) , ако са на разположение, или ако е необходимо, от изпитване за определяне на обхвата, евентуално включващо фаза на размножаване. Ако е необходимо, изпитването за определяне на обхвата може да се проведе при условия (качество на водата, система за изпитване, зареждане на животни), подобни на тези, използвани при крайното изпитване. Ако е необходимо използване на разтворител и няма налични данни за предходни периоди, изпитването за определяне на обхвата може да се използва, за да се определи пригодността на разтворителя. Най-високата изпитвана концентрация не трябва да надвишава разтворимостта във вода, 10 mg/l или 1/10 от 96h-LC50 (27). Най-ниската концентрация следва да бъде от 10 до 100 пъти по-ниска от най-високата концентрация. Използването на пет концентрации в това изпитване дава възможност не само за измерване на зависимостта доза-отклик, но и осигурява най-ниската концентрация, при която се наблюдава ефект (LOEC) и NOEC, които са необходими за оценка на риска в някои регулаторни програми или юрисдикции. Обикновено кратността на разделянето между номиналните концентрации на изпитвания химикал между съседни нива на третиране е $\leq 3,2$.

Повторения в рамките на третираните групи и контролите

23. Следва да се използват най-малко шест изпитвателни камери за повторения за всяка изпитвана концентрация (вж. допълнение 7). По време на фазата на възпроизводството (с изключение на поколение F0) структурата на повторенията се удвоява за оценката на плодовитостта и във всяко повторение има само една двойка за размножаване (вж. точка 42).
24. В допълнение към изпитваните концентрации следва да се използва контрола на вода за разреждане и, ако е необходимо, контрола на разтворител. За да се гарантира

достатъчна статистическа мощност, трябва да се използва удвоен брой на камери с повторения за контролите (т.е. най-малко дванадесет повторения следва да се използват за контролите). По време на фазата на възпроизводството броят на повторенията при контролите е удвоен (т.е. 24 повторения като минимум, и всяко повторение има само една двойка за чифтосване). След възпроизводството повторенията с контроли следва да съдържат не повече от 20 ембриона (риби).

ПРОЦЕДУРА

Започване на изпитването

25. Репродуктивно активните полово зрели риби, използвани за започване на поколение F0 на изпитването, се избират въз основа на два критерия: възраст (обикновено повъзрастни от 12 wpf, но се препоръчва да не надвишава 16 wpf) и тегло (следва да бъде ≥ 300 mg за женските и ≥ 250 mg за мъжките).
26. Двойките женски-мъжки, които отговарят на горните спецификации, се прехвърлят като индивидуални двойки във всеки съд с повторение, т.е. дванадесет повторения с контроли, и шест повторения с третиране с химикал при започване на изпитването. На тези съдове на случаен принцип се присвоява третиране (напр. T1 — T5 и контрола) и повторение (напр. A-L при контролите и A-F при третиране) и след това съдовете се поставят в системата за експозиция при подходящ за всеки съд поток.

Условия на експозиция

27. В допълнение 3 може да се намери пълно обобщение на параметрите и условията за изпитванията. Придържането към тези спецификации следва да доведе до това рибите в контролите да са с крайни точки, подобни на тези, изброени в допълнение 4.
28. По време на изпитването разтвореният кислород, рН и температурата трябва да се измерват в поне един съд за изпитване от всяка третирана група и контролата. Като минимум, тези измервания, с изключение на температурата, трябва да се правят веднъж седмично през периода на експозиция. Средната температура на водата за целия период на изследването трябва да бъде между 24 и 26 °C по време на цялото изпитване. Температурата следва да се измерва всеки ден по време на периода на експозиция. Стойността на рН на водата следва да е от 6,5 до 8,5, но по време на дадено изпитване трябва да е в диапазон $\pm 0,5$ рН единици. Повторенията в рамките на едно третиране не следва да бъдат статистически различни едно от друго, а третираните групи в рамките на изпитването не трябва да бъдат статистически различни една от друга (въз основа на ежедневни измервания на температурата и като се изключат кратковременните отклонения).

Продължителност на експозицията

29. При изпитването се извършва експозиция за три седмици на половозрепи риби от F0. През седмица 4, приблизително на ден 24 от изпитването, се установява F1, а двойките за размножаване от F0 се умъртвяват по хуманен начин и се записват теглото и дължината (вж. точка 34). Това е последвано от експозиция на поколение F1 за още 14 седмици (общо 15 седмици за F1) и поколение F2 в продължение на две седмици до излюпването. Общата продължителност на изпитването по принцип е 19 седмици (т.е. до излюпването на F2). Графиците за изпитването са показани в таблица 2 и допълнително са подробно обяснени в допълнение 9.

Режим на хранене

30. Рибите могат да бъдат хранени *ad libitum* с науплии на възраст 24 часа от *Artemia* spp., които при необходимост могат да бъдат допълнени с налична в търговската мрежа храна във вид на люспи. Наличната в търговската мрежа храна във вид на люспи следва редовно да се анализира за замърсители като органохлорни пестициди, многопръстенни ароматни въглеводороди, полихлорирани бифенили. Следва да се избягва храна с повишени нива на ендокринно активни вещества (т.е. фитоестрогени), които биха могли да нарушат отклика при изпитването. Неконсумираната храна и фекалните отпадъци следва да се отстраняват от съдовете за изпитване според изискванията, напр. чрез внимателно почистване на дъното на всеки съд, с използване на сифон. Страните и дъното на всеки съд също така се почистват веднъж или два пъти седмично (напр. чрез остъргване с шпатула). Пример за график на хранене може да бъде намерен в допълнение 5. Скоростта на хранене се основава на броя риби на повторение. Поради това скоростта на хранене се намалява, ако има смъртност в едно повторение.

Аналитично определяне и измервания

31. Преди започване на периода на експозиция следва да бъде гарантирано правилното функциониране на системата за доставяне на химикала. Всички необходими методи за анализ следва да бъдат установени, включително с достатъчно информация за стабилността на химикала в системата за изпитване. По време на изпитването концентрациите на изпитвания химикал се определят на подходящи интервали, за предпочитане поне веднъж седмично в едно повторение за всяка третирана група, с ротация всяка седмица между повторенията от една и съща третирана група.
32. По време на изпитването дебитите на разредителя и изходния разтвор следва да се проверяват съответно на интервали (напр. поне три пъти седмично). Препоръчва се резултатите да се основават на измерени концентрации. Обаче ако концентрацията на изпитвания химикал в разтвора е поддържана на задоволително ниво в рамките на

$\pm 20 \%$ от средните измерени стойности по време на изпитването, тогава резултатите могат да се основават или на номиналната, или на измерената стойност. В случай на химикали, които значително се натрупват в риби, изпитваните концентрации могат да намалееят с растежа на рибите. В такива случаи се препоръчва честотата на обновяване на разтвора за изпитване във всяка камера да бъде адаптирана, така че да се поддържат възможно най-постоянни концентрации на изпитване.

Наблюдения и измерени крайни точки

33. Измерените крайни точки включват плодовитост, оплождане, излюпване, растеж и преживяемост за оценка на възможните ефекти на ниво популация. Наблюденията на поведението също следва да се правят ежедневно, като се отбелязва всяко необичайно поведение. Други механистични крайни точки включват *vtg* и РНК в черния дроб, нива на белтък VTG чрез имуноанализ (28), фенотипни маркери за определяне на пола, като характерни папиларни израстъци върху мъжката анална перка, гонадна хистопатология за оценка на пола и хистопатологична оценка на бъбрек, черен дроб и гонада (вж. списъка с крайните точки в таблица 1). Всички тези специфични крайни точки се оценяват в контекста на определяне на генетичния пол на отделния индивид, въз основа на наличието или отсъствието на гена *dmy*, определящ мъжкия пол при японската оризия (вж. точка 41). Освен това се прави оценка на времето за хвърляне на хайвер. В допълнение към това могат да се изведат прости отношения на фенотипния пол, като се използва информацията от преброяванията на папилите на аналната перка, за да се определи съответната оризия като фенотипно мъжка или женска. Не се очаква този метод на изпитване да открие малки отклонения от очакваното съотношение между половете, тъй като относително малкият брой риби на повторение няма да осигури достатъчна статистическа мощност. Също така в хода на хистопатологичната оценка се прави оценка на гонадата и се извършват много по-мощни анализи за оценка на гонадния фенотип в контекста на генетичния пол.
34. Основната цел на този метод за изпитване е да се оценят потенциалните относими към популацията въздействия на даден изпитван химикал. Механистични крайни точки (VTG, SSC и някои хистопатологични ефекти при гонадите) могат също да спомогнат да се определи дали даден ефект се осъществява чрез ендокринна активност. Тези механистични крайни точки обаче могат да бъдат повлияни и от системна и други видове токсичност. Следователно, хистопатологията на черния дроб и бъбреците може също така да бъде оценена в детайли, за да се спомогне за по-доброто разбиране на всякакви отклици при механистични крайни точки. Ако обаче тези подробни оценки не бъдат извършени, макроскопските аномалии, наблюдавани случайно по време на хистопатологичната оценка, следва все пак да се отбелязват и протоколират.

Умъртвяване на риби по хуманен начин

35. При прекратяване на експозицията на риби от поколение F0 и F1, когато се вземат подпроби от субадултни риби, рибите следва да бъдат умъртвени с подходящи количества разтвор за подлагане на анестезия (напр. трикаинов метансулфонат, MS-222 (CAS.886-86-2), 100-500 mg/l), буфериран с 300 mg/l NaHCO₃ (натриев бикарбонат, CAS RN 144-55-8), за да се намали дразненето на лигавицата. Ако рибите показват признаци на значително страдание (много силна болка и смърт може да се предвиди по надежден начин) и се считат за умиращи, животните следва да бъдат подложени на анестезия и умъртвени, и при анализа на данните да бъдат третираны като смъртност. Когато дадена риба е умъртвена поради заболяемост, това следва да бъде отбелязано и протоколирано. В зависимост от момента, в който рибата се умъртвява по време на изследването, може да се съхрани рибата за хистопатологичен анализ (фиксиране на рибата за възможна хистопатология).

Боравене с хайвера и рибата в стадий ларва

Събиране на хайвер от двойките за размножаване за получаване на следващо поколение чрез размножаване

36. Събирането на хайвер се извършва в първия ден (или първите два дни, ако е необходимо) на изпитвателна седмица 4, за преминаване от F0 към F1, и изпитвателна седмица 18 за преминаване от F1 към F2. Седмица на изпитване 18 съответства на полово зрели риби от F1 на възраст 15 wpf (седмици след оплождането). Важно е всички хайверни зърна да се извадят от всеки съд в деня преди събирането на хайвера, за да се гарантира, че всички хайверни зърна, събрани от двойка за размножаване, са от едно хвърляне на хайвер. След хвърляне на хайвера, оризията от женски пол понякога пренася яйцата си в близост до клоачния отвор, докато яйцата могат да бъдат положени върху субстрат. Ако в съда липсва субстрат хайверните зърна могат да бъдат намерени или прикрепени към женската, или на дъното на съда. В зависимост от местоположението им, хайверните зърна биват внимателно отстранявани от женската или се източват от дъното през 4-та седмица на изпитване на F0 и през 18-та седмица на изпитване на F1. Всички хайверни зърна, събрани в рамките на третирането, се групират преди разпределянето им в инкубационните камери.
37. Следва да се отстранят влакната на хайвера, които задържат заедно хвърлените хайверни зърна. Оплодени хайверни зърна (до 20) се събират от всяка двойка за размножаване (1 двойка на повторение), обединяват се за всяко третиране и се разпределят систематично в подходящи инкубационни камери (допълнение 6, 7). С използване на стереомикроскоп с добро качество може да се видят белези на ранно оплождане/развитие като повдигане на мембраната след оплождане (хорион),

протичащо клетъчно делене или образуване на бластула. Инкубационните камери може да се поставят в отделни „инкубационни аквариуми“, приготвени за всяко третиране (в който случай параметрите за качеството на водата и концентрациите на изпитвания химикал трябва да се измерват в тези аквариуми) или в аквариума с повторения, в които ще се съдържат излюпените ларви (напр. свободни ембриони). Ако е необходим втори ден на събиране (ден на изпитване 23), всички хайверни зърна от двата дни следва да бъдат обединени и след това систематично да се преразпределят към всяко от повторенията на третирането.

Отглеждане на хайверни зърна за излюпване

38. Оплодените хайверни зърна се разбъркват непрекъснато, *напр.* в инкубатора на хайверни зърна, с въздушни мехурчета или чрез вертикално люлеене на инкубатора на хайверни зърна. Смъртността при оплодените хайверни зърна (ембриони) се проверява и записва ежедневно. Мъртвите хайверни зърна се отстраняват от инкубаторите (приложение 9). На 7-ия ден след оплождането (dpf) разбъркването се спира или се намалява, така че оплодените хайверни зърна да се установяват на дъното на инкубатора. Това подпомага излюпването, обикновено през следващите един или два дни. За всяко третиране и контрола излюпванията (млади ларви; свободни ембриони) се броят (на основа обединени повторения). Оплодените хайверни зърна, които не са се излюпили в продължение на два пъти от медианния ден на излюпване при контролата (обикновено 16 или 18 dpf) се считат за нежизнеспособни и се отстраняват.
39. Дванадесет новоизлюпени се прехвърлят във всеки съд с повторение. Новоизлюпените от инкубационните камери се обединяват и систематично се разпределят в съдовете с повторения (допълнение 7). Това може да се направи, като на случаен принцип се избира новоизлюпено от обединението за третиране и като последователно се добавя новоизлюпено на случаен принцип в аквариум с повторение. Всеки от съдовете следва да съдържа равен брой ($n = 12$) от излюпените ларви (максимум 20 ларви във всеки). Ако няма достатъчно новоизлюпени, за да се запълнят всички повторения на третирането, се препоръчва да се гарантира възможно най-голям брой повторения да съдържат 12 новоизлюпени. Новоизлюпените могат да бъдат обработвани безопасно със стъклени пипети с широк отвор. Всички допълнителни новоизлюпени се умъртвяват по хуманен начин с анестетик. През няколкото седмици преди образуването на двойки за размножаване, денят, в който се наблюдава първото хвърляне на хайвера във всяко повторение, следва да бъде записван.

Образуване на двойки за размножаване

Изрязване на перка и определяне на генотипния пол

40. Определянето на генотипния пол чрез изрязване на перки се прави на 9-10 wpf (т.е. седмица на изпитването 12 — 13 за поколение F1). Всичките риби в рамките на един съд се анестезират (като се използват одобрени методи, напр. IACUC) и се взема малка проба тъкан от дорзалния или от вентралния връх на опашната перка от всяка риба, за да се определи генотипният пол на индивида (29). Рибите от дадено повторение може да бъдат поставени в малки клетки, ако е възможно, по една в клетка, в съда с повторение. Като алтернатива, две риби могат да се държат във всяка клетка, ако се различават една от друга. Един метод се състои в диференцирано изрязване на опашната перка (напр. дорзален спрямо вентрален връх), когато се взема тъканната проба .
41. Генотипният пол на оризията се определя чрез идентифициран и секвениран ген (*dmy*), разположен на Y хромозомата. Наличието на *dmy* показва XY индивид, независимо от фенотипа, докато липсата на *dmy* показва XX индивид, независимо от фенотипа (30); (31). От всяка изрязана перка се извлича дезоксирибонуклеинова киселина (ДНК) и наличието или отсъствието на *dmy* може да се определи чрез методи на полимеразна верижна реакция (PCR) (вж. допълнение 9 в глава В.4 от настоящото приложение, или допълнения 3 и 4 в (29).

Установяване на двойки за размножаване

42. Информацията за генотипните полове се използва за установяване на XX — XY двойки за размножаване, независимо от външния фенотип, който може да бъде изменен от експозиция на изпитван химикал. В деня след определяне на генотипния пол на всяка риба се избират две XX риби и две XY риби от всяко повторение и се установяват две XX — XY двойки за размножаване. Ако едно повторение не разполага с две XX или с две XY риби, следва да се вземе подходяща риба от други повторения в рамките на третирането. Приоритетът е да се разполага с препоръчвания брой двойки за размножаване в повторения (12) във всяко третиране и в контролите (24). При установяването на двойки за размножаване рибите с очевидни аномалии (проблеми с плавателния мехур, деформации на гръбначния стълб, екстремално вариране в размерите) следва да бъдат изключени. По време на фазата на възпроизводството за F1 всеки съд с повторение следва да съдържа само една двойка за размножаване.

Вземане на проби от субадултни риби и оценка на крайни точки

Пробовземане на риби, различни от двойки за размножаване

43. След образуването на двойки за размножаване рибите, които не са избрани за по-нататъшно отглеждане, се умъртвяват по хуманен начин за измерване на крайни

точки при субадултни риби в седмица на изпитване 12 — 13 (F1). Изключително важно е с рибите да се борави по такъв начин, че генотипният пол, определен за избор на двойки за размножаване, да може да бъде проследен до отделно взет индивид. Всички събрани данни се анализират в контекста на генотипния пол на конкретната риба. Всяка риба се използва за различни измервания на крайните точки, включително: определяне на преживяемост в проценти на ювенилни/субадултни риби (седмици на изпитване 7—12/13 (F1), растеж на дължина (стандартната дължина може да се измери, ако опашната перка е била скъсена поради вземане на проби за анализ на генетичния пол. Общата дължина може да бъде измерена само ако дорзална или вентрална част от опашната перка е пробовзета за *dmu*) и телесна маса (т.е. мокро тегло след попиване на водата), *vtg* иРНК в черния дроб (или VTG) и папили на аналната перка (вж. таблици 1 и 2). Следва да се отбележи, че теглото и дължините на двойките за размножаване също се изискват за изчисляване на средния растеж в дадена третирана група.

Вземане на тъканни проби и измерване на вителогенин

44. Извършва се дисекция на черния дроб и той трябва да се съхранява при ≤ -70 °C до измерванията на *vtg* иРНК (или VTG). Опашката на рибата, включително аналната перка, се съхранява в подходящ фиксатор (например фиксатор на Davidson) или се фотографира така, че папилите на аналната перка да могат да бъдат преброени на по-късна дата. По желание могат да се вземат и консервират други тъкани (т.е. гонада) по това време). Концентрацията на VTG в черния дроб следва да се определи количествено с хомоложна ELISA техника (вж. препоръчаните процедури за оризията в допълнение 6 в глава В.48 от настоящото приложение). Като алтернатива, методите за количествено определяне на *vtg* иРНК, т.е. екстракция на иРНК за *vtg I* гена от проба от черен дроб и количествено определяне на броя копия на *vtg I* гена (в ng обща иРНК) чрез количествена PCR, са установени от ЕРА на САЩ (29). Вместо да се определя броят на копията на *vtg* гена в контролните групи и групите за третиране, по-благоприятният по отношение на ресурсите и технически по-лесен метод е да се определи относителното (кратно) изменение на експресията на *vtg I* от контролните групи и групите за третиране.

Вторични полови белези

45. При нормални обстоятелства само полово зрялата мъжка оризия има папили, които се развиват върху членчетата от някои лъчи на анална перка като вторичен полов белег, като така осигуряват потенциален биомаркер за ефектите на нарушаване на функционирането на ендокринната система . Методът за преброяване на папили на аналната перка (броят на членчетата с папили) е даден в допълнение 8. Също така броят на папилите на аналната перка за индивид се използва за категоризиране на

този индивид като външно фенотипно мъжки или женски за целите на изчисляването на просто съотношение между половете на повторение. Оризия с брой, по-голям от 0, се определя като мъжка; оризия с 0 папили на ананалната перка се определя като женска.

Оценка на плодовитостта и оплождането

46. Плодовитостта и оплождането се оценяват в седмици на изпитване от 1 до 3 при поколение F0 и седмици на изпитване от 15 до 17 в поколение F1. Хайверните зърна се събират ежедневно от всяка двойка за размножаване в продължение на 21 последователни дни. Хайверните зърна се отстраняват внимателно от женските, поставени в мрежа, и /или се източват от дъното на аквариума всяка сутрин. За всяка двойка за размножаване се записват ежедневно както плодовитостта, така и оплождането. Плодовитостта се определя като брой на хвърлените хайверни зърна, а оплождането функционално се определя като брой на оплодените и жизнеспособни хайверни зърна към момента на преброяването. Преброяването следва да се извърши възможно най-скоро след събирането на хайверните зърна.
47. Плодовитостта в повторенията се записва ежедневно като брой на хайверните зърна на двойка за размножаване, който се анализира чрез препоръчаните статистически процедури, като се използват средните от повторение. Оплождането в повторенията е сумата от броя на оплодените хайверни зърна от двойка за размножаване, разделен на сумата от броя хайверни зърна, произведени от същата двойка. Статистически оплождането се анализира като съотношение на повторение. Способността за излюпване в повторенията е броят на новоизлюпените, разделен на броя на заредените ембриони (обикновено 20). Статистически способността за излюпване се анализира като съотношение на повторение.

Вземане на проби от полово зрели организми и оценка на крайни точки

Пробовземане на риби, представляващи двойки за размножаване

48. След седмица 17 от изпитването (т.е. след успешното начало на поколение F2) полово зрелите индивиди от F1 се умъртвяват по хуманен начин и се оценяват различни крайни точки (вж. таблици 1 и 2). Прави се изображение на ананалната перка, за да се оценят папилите по ананалната перка (вж. допълнение 8), и/или опашката, непосредствено зад клоачния отвор, се отстранява и се фиксира за преброяване на папили на по-късен етап. Част от опашната перка може да бъде пробовзета и консервирана по това време за проверка на генетичния пол (*dmy*) по желание. Ако е необходимо, може да се вземе тъканна проба за повторно извършване на анализа на *dmy*, за да се провери генетичният пол на конкретната риба. Телесната кухина се отваря, за да позволи перфузия с подходящи фиксатори (напр. на Davidson) преди

потопяването на цялото тяло във фиксатора. Въпреки това, ако преди фиксирането се извърши подходяща стъпка за повишаване на пропускливостта, не е необходимо да се отваря телесната кухина.

Хистопатология

49. Всяка риба се оценява хистологично за патология в гонадната тъкан (30); (29). Както е посочено в точка 33, други механистични крайни точки, оценявани в това изследване (VTG, SSC и някои хистопатологични ефекти при гонадите) могат да бъдат повлияни от системна или други видове токсичност. Следователно, хистопатологията на черния дроб и бъбреците може също така да бъде оценена в детайли, за да се спомогне за по-доброто разбиране на всякакви отклици при механистични крайни точки. Ако обаче тези подробни оценки не бъдат извършени, макроскопските аномалии, наблюдавани случайно по време на хистопатологичната оценка, следва все пак да се отбелязват и протоколират. Може да се разгледа възможността за „четене надолу“ от групата с най-високото третиране (в сравнение с контролата) до третиране без въздействие, обаче се препоръчва справка с указанията за хистопатологията (29). Обикновено всички проби се обработват/правят се срезове, след което се преглеждат от патолога. Ако се използва подход на „четене надолу“, се отбелязва, че процедурата на модифицирания от Рао-Скот трендов тест на Кокрън-Армитидж със сегментиране (Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices — RSCABS) използва очакването, че с увеличаването на нивата на дозата също ще се увеличи биологичното въздействие (патологията). Следователно ще бъде намалена мощността, ако се разглежда само една висока доза без никакви междинни дози. Ако не е необходимо да се извършва статистически анализ, за да се определи, че високата доза няма въздействие, тогава този подход може да бъде приемлив. Гонадният фенотип също се извежда от тази оценка.

Други наблюдения

50. MEOGRT предоставя данни, които могат да бъдат използвани (напр. при подход, основан на тежестта на доказателствата), за да се направи едновременно оценка най-малко на два основни вида АОР (пътища, водещи до неблагоприятен ефект), които завършват с увреждане на репродуктивни функции: а) ендокринно медираните пътища, включващи прекъсване на хипоталамус-хипофиза-гонадната ендокринна ос; и б) пътища, които водят до намаляване на преживяемостта, растежа (дължина и тегло) и възпроизводството чрез неендокринно медирана токсичност. Крайните точки, които обикновено се измерват при изпитвания за хронична токсичност, като изпитването на целия жизнен цикъл и изпитването на ранен етап от жизнения цикъл, също са включени в това изпитване и могат да се използват за оценка на опасностите, произтичащи както от неендокринно медираните токсични механизми на действие, така и от пътищата на ендокринно медирана токсичност. По време на

изпитването наблюденията на поведението следва да се правят ежедневно, като се отбелязва всяко необичайно поведение. Освен това следва да се запише всяка смъртност и да се изчисли преживяемостта до подбора на рибата (седмица на изпитване 6/7), преживяемостта след подбора до пробовземането на субадултни екземпляри (през 9 — 10 wpf), както и преживяемостта от чифтосването до пробовземането на полово зрели риби.

Таблица 1: Преглед на крайните точки при MEOGRT*

Стадий от жизнения цикъл	Крайна точка	Поколение
Ембрион (2 wpf)	Излюпване (% и време до излюпване)	F1, F2
Ювенилен (4 wpf)	Преживяемост	F1
Субадултен (9 или 10 wpf)	Преживяемост	F1
	Растеж (дължина и тегло)	
	Вителогенин (иРНК или белтък)	
	Вторични полови белези (папили на ананната перка)	
	Външно съотношение между половете	
	Време до 1 ^{то} хвърляне на хайвера	
Полово зрял (12-14 wpf)	Възпроизводство (плодовитост и оплождане)	F0, F1
Полово зрял (15 wpf)	Преживяемост	F1
	Растеж (дължина и тегло)	
	Вторични полови белези (папили на ананната перка)	
	Хистопатология (гонада, черен дроб, бъбрек)	

* Тези крайни точки трябва да се анализират статистически

ГРАФИК

51. В таблица 2 е показан графикът за изпитването MEOGRT. MEOGRT включва 4 седмици експозиция на половозрели индивиди от F0 и 15 седмици експозиция на поколение F1, и период на експозиция за второто поколение (F2) до излюпването (2 wpf). Активността по време на MEOGRT е обобщена в допълнение 9.

Таблица 2: График на експозицията и измерването на крайни точки при MEOGRT.

График за експозицията и крайните точки при MEOGRT																					
F0	1	2	3	4																	
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15			
F2																		1	2		
Седмица на	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
Етап от жизнения цикъл				Ембрион					Ларви					Ювенилен				Субадултен		Полово зрял	
Крайни точки																					
Плодовитост	F ₀														F ₁					• Планът на опита включва 7 групи повторения 5 за третиранията с изпитвания химикал 2 за третирания на контроли (4, ако се използва разтворител) • Вътрешногрупов план 12 повторения за възпроизводство, патология на половозрели индивиди и SSC (седмици от 10 до 18) 6 повторения за излюпване, преживяемост, Vtg; и - субадултни SSC и растеж (седмица от 1 до 9) SSC: вторични полови белези; Седмици: седмици; Vtg: вителогенин	
Оплождане	F ₀														F ₁						
Излюпване					F ₁														F ₂		
Преживяемост						F ₁						F ₁						F ₁			
Растеж				F ₀								F ₁						F ₁			
Вителогенин													F ₁								
Вторичен пол													F ₁					F ₁			
Хистопатология																		F ₁			
Седмица на изпитването	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		

ОТЧИТАНЕ НА ДАННИ

Статистически анализ

52. Тъй като генотипният пол се определя за всички риби за изпитването, данните следва да се анализират за всеки генотипен пол поотделно (т.е. XY мъжки и XX женски). Ако това не бъде направено, значително ще се намали статистическата мощност на всякакъв анализ. Предпочита се статистическите анализи на данните да следват процедурите, описани в документа на ОИСП „Съвременни подходи за статистически анализ на данни за екоотоксичност: ръководство за прилагане“ („Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application“) (32). Допълнение 10 предоставя допълнителни насоки за статистическия анализ.

53. Планирането на изпитването и изборът на статистически тестове следва да позволяват достатъчна мощност за откриване на промени от биологично значение в

крайните точки, за които трябва да се протоколира NOEC (32). Протоколирането на относимите концентрации с определено въздействие и параметри може да зависи от регулаторната рамка. Следва за всяка крайна точка да се идентифицира процентното изменение, за което е важно да бъде открито или оценено. Планът на опита следва да бъде изготвен така, че да се даде възможност за това. Малко вероятно е както едно и също процентно изменение да се прилага за всички крайни точки, така и осъществим опит да може да бъде планиран по такъв начин, че да отговаря на тези критерии за всички крайни точки, поради което при планирането на опита по подходящ начин е важно вниманието да се насочи към крайните точки, които са от значение за съответния опит. В допълнение 10 на разположение са статистическа блокова схема и насоки, за да се подпомогне обработката на данните и изборът на най-подходящия статистически тест или модел, който да се използва. Могат да се използват други статистически подходи, при условие че са научно обосновани.

54. Ще бъде необходимо варирането да се анализира във всеки набор от повторения, като се използват дисперсионен анализ или таблица на спрегнатост, и въз основа на този анализ се използват достатъчни подходящи статистически методи за анализ. За да се направи множество сравнение между резултатите при индивидуалните концентрации и тези при контролите, се препоръчва процедурата със стъпка назад (напр. тест на Йонкхере-Терпстра) за непрекъснат отклик. Когато данните не са в съответствие с монотонна зависимост концентрация-отклик, следва да се използва тестът на Дънет или тестът на Дън (след подходяща трансформация на данни, ако е необходимо).
55. При плодовитостта броенето на хайверни зърна е ежедневно, но може да се анализира като общ брой хайверни зърна или като повтаряща се мярка. В допълнение 10 е дадена подробна информация за начина, по който се анализира тази крайна точка. За хистопатологичните данни, които са под формата на балови оценки на тежестта, бе разработен нов статистически тест — модифициран от Рао-Скот трендов тест на Кокрън-Армитидж със сегментиране (Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices — RSCABS) (33).
56. Всички наблюдавани крайни точки при третиране с химикал, които са значимо различни от подходящите контроли, следва да бъдат протоколирани.

Съображения, свързани с анализа на данните

Използване на изложени на риск нива на третиране

57. При определяне дали дадено повторение или цяло третиране показва ясно изразена токсичност и следва да бъде отстранено от анализа, са взети предвид няколко

фактора. Ясно изразената токсичност се определя като > 4 случая на смъртност във всяко повторение между 3 wpf и 9 wpf, които не могат да бъдат обяснени с техническа грешка. Други признаци на ясно изразена токсичност включват кръвоизлив, необичайно поведение, необичайни начини на плуване, анорексия и други клинични признаци на заболяване. За сублетални признаци на токсичност могат да бъдат необходими качествени оценки, при които винаги трябва да се прави позоваване на контролната група на вода за разреждане (само чиста вода). Ако ясно изразена токсичност е очевидна при най-високото третиране (третирания), се препоръчва тези третирания да бъдат изключени от анализа.

Контроли на разтворител

58. Използването на разтворител следва да се разглежда само като крайна мярка, след като са разгледани всички други възможности за прилагане на химикала. Ако се използва разтворител, тогава съгласувано с това се провежда изпитване на контрола на вода за разреждане. При приключване на изпитването следва да се направи оценка на възможното въздействие на разтворителя. Това се прави чрез статистическо сравнение на контролната група на разтворител с контролната група на вода за разреждане. Най-относимите крайни точки за разглеждане при този анализ са определящите за растежа фактори (тегло), тъй като те могат да бъдат засегнати от общите видове токсичност. Ако в тези крайни точки се открият статистически значими разлики между контролните групи на вода за разреждане и контролните групи на разтворител, за да се определи дали валидността на теста е нарушена, следва да се използва най-добрата професионална преценка. Ако двата вида контроли се различават, третираните с експозиция към химикала трябва да бъдат сравнени с контролата на разтворител, освен ако не е известно, че е за предпочитане сравнение с контролата на вода за разреждане. Ако няма статистически значима разлика между двете контролни групи, се препоръчва третиранията с експозиция на изпитвания химикал да се сравнят с обединенията (контролните групи на разтворител и на вода за разреждане), освен ако не е известно, че е за предпочитане сравнението само с контролната група на вода за разреждане или с тази на разтворител.

Протокол от изпитването

59. Протоколът от изпитването следва да включва следното:

Изпитван химикал: физична природа и, където е относимо, физични и химични свойства;

- данни за химична идентификация;

Вещество с една съставка:

- външен вид, разтворимост във вода и допълнителни относими физични и химични свойства;
- химична идентификация, като например наименование по IUPAC или CAS, CAS номер, код SMILES или InChI, структурна формула, чистота, химична идентичност на онечистванията, доколкото е целесъобразно и практически осъществимо, и т.н. (включително съдържание на органичен въглерод, ако е приложимо).

Вещество с повече съставки, UVCB и смеси:

- определени, доколкото е възможно, с химичната си идентичност (вж. по-горе), количествения състав и относимите физични и химични свойства на съставките.

Изпитван вид:

- научно наименование, порода, при наличие, източник и метод на събиране на оплодените хайверни зърна и последваща обработка.

Условия на изпитването:

- Продължителност(и) на излагане на светлина;
- План на опита (напр. размер на камерата, материал и обем на водата, брой на камерите за изпитване и повторенията, брой на новоизлюпените на повторение);
- метод за приготвяне на изходния разтвор и честота на обновяване (при използване трябва да се посочат разтворителят и неговата концентрация);
- метод на дозиране на изпитвания химикал (напр. помпи, системи за разреждане);
- коефициентът на аналитичния добив на метода и номиналните концентрации на изпитване, границата на количествено определяне, средните на измерените стойности и техните стандартни отклонения в съдовете за изпитване, методът за получаването им и доказателство, че измерванията се отнасят за концентрациите на изпитвания химикал в истински разтвор;
- характеристики на водата за разреждане: рН, твърдост, температура, концентрация на разтворен кислород, нива на остатъци от хлор (ако са измерени), общо органичен въглерод (ако е измерен), суспендирани твърди частици (ако са измерени), соленост на изпитваната среда (ако е измерена) и всички други направени измервания;
- номиналните концентрации на изпитване, средните на измерените стойности и техните стандартни отклонения;
- качество на водата в съдовете за изпитване, рН, температура (ежедневно) и концентрация на разтворен кислород;

- подробна информация за храненето (например вид на храните, източник, дадено количество и честота).

Резултати:

- Доказателство, че контролите съответстват на общите критерии за валидност:
 - данни за контролата (плюс контролата на разтворител, когато се използва) и третираните групи както следва, излюпване (способност за излюпване и време до излюпването) за F1 и F2, преживяемост след излюпване за F1, растеж (дължина и телесно тегло) за F1, генотипен пол за F1 и полова диференциация (напр. вторични полови белези въз основа на папили по анална перка или гонадна хистология), фенотипен пол за F1, вторични полови белези (папили по анална перка) за F1, *vtg* и РНК (или VTG белтък) за F1, хистопатологична оценка (гонада, черен дроб и бъбреци) за F1, и възпроизводство (плодовитост и оплождане) за F0, F1; (вж. таблици 1 и 2).
 - подход за статистическия анализ (регресионен анализ или дисперсионен анализ) и обработката на данните (използвани статистически тестове и модели);
 - концентрация без наблюдавано въздействие (NOEC) за всеки оценен отклик;
 - най-ниска концентрация, при която се наблюдава ефект (LOEC) за всеки оценен отклик (при $p = 0,05$); EC_x за всеки оценен отклик, ако е приложимо, и доверителен интервал (напр. 90 % или 95 %) и графика на изгладения модел, използван за нейното изчисляване, наклон на кривата концентрация-отклик, формула на регресионния модел, очакваните параметри на модела и техните стандартни грешки.
 - Всяко отклонение от настоящия метод за изпитване и отклоненията от критериите за приемливост, както и съображения за възможни последствия върху резултата от изпитването.
60. За резултатите от измерванията на крайните точки — средните стойности и техните стандартни отклонения (на основа както повторения, така и концентрации, ако е възможно).

ЛИТЕРАТУРА

- (1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (1) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K and Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. *Current Protocols in Toxicology* 39: 1-36.
- (2) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disruptors. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (3) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. *Water Research* 16: 457-464.
- (4) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T and Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 1925-1930.
- (5) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T and Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2552-2560.
- (6) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and Honjo T. (2002). Effects of 17 β -Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Chemosphere* 47: 71-80.
- (7) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 1692-1698.
- (8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-Tert-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 1487-1496.
- (9) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 β -Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. *Aquatic Toxicology* 79: 288-295.

- (10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 β -Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. *Aquatic Toxicology* 77: 78-86.
- (11) Nakamura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T and Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Journal of Applied Toxicology* 35:11-23.
- (12) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. На разположение на адрес: <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html>.
- (13) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P and McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. *Chemosphere* 86: 593-599.
- (14) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 23.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (15) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. *Aquatic Toxicology* 76: 69–92.
- (16) Denny JS, Spehar RL, Mead KE and Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.
- (17) Koger CS, Teh SJ and Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Biology of Reproduction* 61: 1287-1293.
- (18) Kinoshita M, Murata K, Naruse K and Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.
- (19) Gormley K and Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 330-338.
- (20) Глава В.15 от настоящото приложение, Риби, Краткосрочно изпитване за токсичност в стадии ембриони и ларви

- (21) Глава В.37 от настоящото приложение, 21-дневно изследване на риби: Краткосрочен скрининг за естрогенна активност, андрогенна активност и потискане на ароматазата.
- (22) Глава В.41 от настоящото приложение, Изпитване за развитие на пола при риби.
- (23) Глава В.48 от настоящото приложение, Краткосрочно изследване на размножаването при риби.
- (24) Глава В.47 от настоящото приложение, Риби, Изпитване за токсичност на ранни етапи от жизнения цикъл.
- (25) Глава В.49 от настоящото приложение, Изпитване за остра токсичност при рибни ембриони (TPE).
- (26) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. *Chemosphere* 92: 1067-1076.
- (27) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50: 301-308.
- (28) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (29) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Scharthl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. *Genetics* 163: 245–251.
- (30) Shinomiya, A, Otake H, Togashi K, Hamaguchi S and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, *Zoological Science* 21: 613-619.
- (31) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.
- (32) Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1108-1116.

Допълнение 1

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Химикал: Вещество или смес.

ELISA: Ензимно-свързан имуносорбентен анализ

Плодовитост = брой на хайверните зърна;

Оплождане = брой на жизнеспособните хайверни зърна/плодовитост;

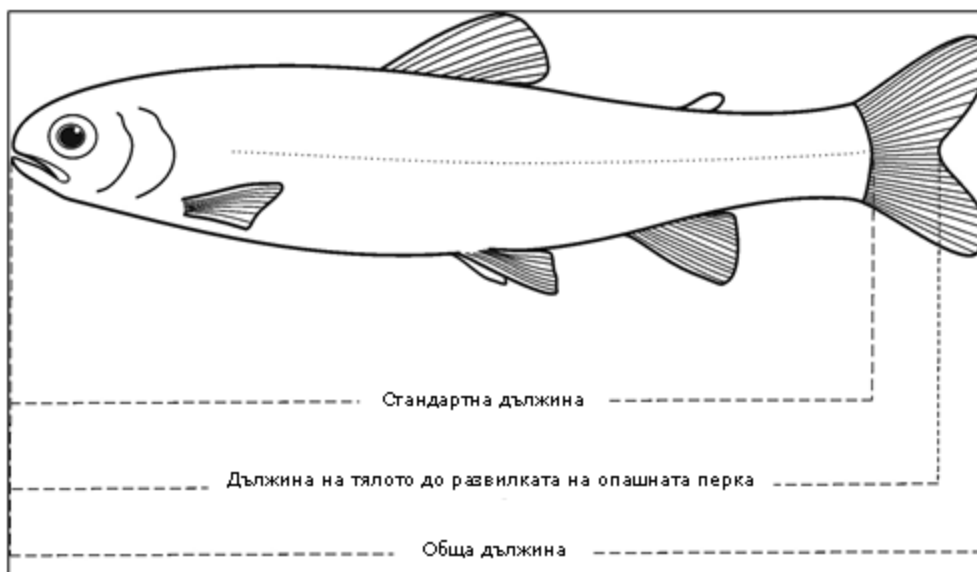
Дължина на тялото до развилката на опашната перка (FL) отнася се за дължина от върха на муцуната до края на средните лъчи на опашната перка и се използва при риби, при които е трудно да се посочи краят на гръбначния стълб www.fishbase.org

Способност за излюпване = новоизлюпени/брой на ембрионите, заредени в даден инкубатор

IACUC: Институционален комитет за грижи за животните и за използването им

Стандартна дължина (SL) отнася се за дължина на рибата, измервана от върха на муцуната до задния край на последния прешлен или до задния край на средно-страничната част на подопашната става. По-просто казано, това измерване изключва дължината на опашната перка. (www.fishbase.org)

Обща дължина (TL) отнася се за дължина от върха на муцуната до върха на подългият дял от опашната перка, обикновено измерван чрез притискане на дяловете по дължината на страничната линия. Това е измерване по права линия, не се измерва по контура на тялото (www.fishbase.org)



Фигура 1: Описание на използваните различни дължини

ЕСх: (концентрация, при която се наблюдава x % от въздействието) е концентрацията, която причинява x % от дадено въздействие върху изпитвани организми в рамките на даден период на експозиция, при сравнение с контрола. Например ЕС50 е концентрация, за която е направена оценка, че предизвиква дадено въздействие върху изпитвана крайна точка в 50 % от експонираната популация в рамките на определен период на експозиция. Изпитван химикал: всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване.

Проточно изпитване е изпитване с постоянен поток на изпитвани разтвори през системата за изпитване по време на периода на експозицията.

ХХГ ос: хипоталамус-хипофиза-гонадна ос

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (Международен съюз по чиста и приложна химия).

Скорост на зареждане: мокрото тегло на рибите на обем вода.

Най-ниска концентрация, при която се наблюдава ефект (LOEC) е най-ниската изпитвана концентрация на изпитван химикал, при която за химикала се наблюдава статистически значимо въздействие (при $p < 0,05$) в сравнение с контролата. При все това, всички изпитвани концентрации над LOEC следва да имат вредно въздействие, равно или по-голямо от наблюдаваното при LOEC. Когато тези две условия не могат да бъдат удовлетворени, следва да се даде пълно обяснение за това как е била избрана LOEC (и следователно NOEC). В допълнения 5 и 6 се предоставят насоки.

Медианна летална концентрация (LC50): е концентрацията на изпитвания

химикал, която се счита за летална при 50 % от изпитваните организми в хода на изпитването.

Концентрация без наблюдавано въздействие (NOEC) е изпитваната концентрация непосредствено под LOEC, която при сравнение с контролата няма статистически значимо въздействие ($p < 0,05$) в рамките на даден период на експозиция.

SMILES: Спецификация за опростено линейно въвеждане на молекули

Гъстота на отглеждане: брой на рибите на обем вода.

Изпитван химикал: Всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване.

UVCB: Вещества с неизвестен или променлив състав, сложни продукти от реакции или биологични материали.

VTG: вителогенинът е фосфолипогликопротеин, който е прекурсор на белтъците в яйчния жълтък и обикновено се среща в полово активните женски индивиди от всички яйценосни видове.

WPF: седмици след оплождането

Допълнение 2**НЯКОИ ХИМИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПРИЕМЛИВА ВОДА ЗА РАЗРЕЖДАНЕ**

Вещество	Гранична концентрация
Твърди частици	5 mg/l
Общ органичен въглерод	2 mg/l
Нейонизиран амоняк	1 µg/l
Остатъчен хлор	10 µg/l
Общо органофосфорни пестициди	50 ng/l
Общо органохлорни пестициди плюс полихлорирани бифенили	50 ng/l
Общ органичен хлор	25 ng/l
Алуминий	1 µg/l
Арсен	1 µg/l
Хром	1 µg/l
Кобалт	1 µg/l
Мед	1 µg/l
Желязо	1 µg/l
Олово	1 µg/l
Никел	1 µg/l
Цинк	1 µg/l
Кадмий	100 ng/l
Живак	100 ng/l
Сребро	100 ng/l

Допълнение 3**УСЛОВИЯ НА ИЗПИТВАНЕ ЗА МЕОГРТ**

1. Препоръчани видове	Японска оризия (<i>Oryzias latipes</i>)
2. Тип изпитване	Непрекъснато проточно
3. Температура на водата	Номиналната температура на изпитване е 25 °C. Средната температура по време на изпитването във всеки съд е 24—26 °C.
4. Качество на осветлението	Флуоресцентни крушки (широк спектър и ~150 лумена/m ²). (~150 lux). 16 h светлина:8 h тъмнина
6. Скорост на зареждане	F0: 2 половозрели индивида/ повторение; F1: започнато с максимум 20 хайверни зърна (ембриони)/повторение, намалени до 12 ембриона/повторение при излюпването, след това 2 половозрели индивида (XX — XY двойка за размножаване) при 9—10 wpf за фазата на възпроизводство
7. Минимален полезен обем на камерата за изпитване	1,8 l (напр. размер на камерата за изпитване: 18 x 9 x15 cm)
8. Обменени обеми на изпитвани разтвори	Минимум 5 обновявания на обем/ден до 16 обновявания на обем/ден (или поток от 20 ml/min)
9. Възраст на изпитваните организми при започване	F0: > 12 wpf, но се препоръчва да не надвишава 16 wpf
10. Брой на организмите за повторение	F0: 2 риби (двойка мъжка и женска); F1: максимум 20 риби (хайверни зърна)/повторение (получени от двойки за размножаване от F0 и F1) .
11. Брой третираня	5 третираня с изпитвания химикал плюс подходяща контрола(и)
12. Броят на повторенията на третиране	Минимум 6 повторения на третиране за изпитвания химикал и минимум 12 повторения за контрола, и за контрола на разтворител, ако се използва такъв (броят на повторенията се удвоява в рамките на фазата на възпроизводство в F1)
13. Брой на организмите на изпитване	Минимум 84 риби в F0 и 504 във F1. (ако се използва контрола на разтворител, тогава 108 риби от F0 и 648 риби в F1). Отчитаната единица е пост-свободен ембрион.
14. Режим на хранене	Рибите се хранят <i>ad libitum</i> с науплии на възраст 24 часа от <i>Artemia</i> spp., които при необходимост могат да бъдат допълнени с налична в търговската мрежа храна във вид на люспи (примерен график на

хранене за осигуряване на достатъчен растеж и развитие за осигуряване на стабилно възпроизводство, може да се намери в допълнение 6).

- | | |
|--|--|
| 15. Аериране | Не се прилага, освен ако се използват подходи с разтворен кислород < 60 % от стойността на насищане при равновесие с атмосферния въздух |
| 16. Вода за разреждане | Вода с чиста повърхност, кладенчова или възстановена вода или дехлорирана чешмяна вода. |
| 17. Продължителност на експозицията: | Предимно 19 седмици (от F0 излюпването на F2) |
| 18. Биологични крайни точки (първични) | Способност за излюпване (F1 и F2); преживяемост (F1, от излюпването до 4 wpf (край на етап ларва/начало на ювенилен организъм), от 4 до 9 (или 10) wpf (начало на ювенилните организми до субадултен организъм) и от 9 до 15 wpf (от субадултен до приключването при полово зрелия организъм)); растеж (F1, дължина и тегло при 9 и 15 wpf); вторични полови белези (F1, папили по анална перка при 9 и 15 wpf); вителогенин (F1, vitg иРНК или VTG белтък при 15 wpf); фенотипен пол (F1, чрез хистология на гонадите при 15 wpf); възпроизводство (F0 и F1, плодовитост и оплождане в продължение на 21 дни); време до хвърляне на хайвер (F1); и хистопатология (F1, гонада, черен дроб и бъбреци при 15 wpf) |
| 19. Критерии за валидност на изпитването | Разтворен кислород $\geq 60\%$ от стойността на насищане при равновесие с атмосферния въздух; Средна температура на водата от 24 — 26°C по време на цялото изпитване; успешно възпроизводство при $\geq 65\%$ от женските в контролата(ите); средна дневна плодовитост от ≥ 20 хайверни зърна в контролата(ите); Способност за излюпване $\geq 80\%$ (средно) при контролите (във всяко от поколенията F1 и F2); преживяемост след излюпването до 3 wpf $\geq 80\%$ (средна стойност) и от 3 wpf до приключването за поколението $\geq 90\%$ (средна стойност) при контролите (F1), концентрациите на изпитвания химикал в разтвор следва да бъдат задоволително поддържани в рамките на $\pm 20\%$ от средните измерени стойности. |

Допълнение 4

УКАЗАНИЯ ЗА ТИПИЧНИТЕ СТОЙНОСТИ ПРИ КОНТРОЛИТЕ

Следва да се отбележи, че тези стойности при контролите се основават на ограничен брой изследвания за валидиране и могат да бъдат изменени с оглед на допълнителния опит.

Растеж

Измерванията на теглото и дължината се правят за всички риби, пробовзети на 9 (или 10) и на 15 седмици след оплождането (wrf). Следването на този протокол ще даде очаквано мокро тегло на 9 wrf от 85—145 mg за мъжките и 95—150 mg за женските. Очакваното тегло на 15 wrf е от 250—330 mg за мъжките и 280—350 mg за женските. Въпреки че може да има съществени отклонения от тези диапазони за отделните риби, когато средните тегла в контролите са съществено извън тези диапазони, особено ако са по-ниски, може да се предположи наличие на проблеми с храненето, контрола на температурата, качеството на водата, заболявания или всяка комбинация от тези фактори.

Излюпване

Степента на излюпване при контролите обикновено е около 90 %, но въпреки това ниски стойности от 80 % не са необичайни. Степен на излюпване под 75 % може да означава недостатъчно разбъркване на развиващите се хайверни зърна или недостатъчно внимание при боравенето с хайверните зърна, като например ненавременното отстраняване на мъртвите хайверни зърна, което води до заразяване с гъбични инфекции.

Преживяемост

Преживяемостта в проценти до 3 wrf от излюпването и след 3 wrf обикновено е 90 % или повече за контролите, но преживяемост в проценти в ранните стадии от живота от едва 80 % за контролите не е причина за безпокойство. Преживяемост в проценти по-малка от 80 % за контролите би била причина за безпокойство и може да означава недостатъчно почистване на аквариумите, което води до загуба на ларви на риби от заболявания или от задушаване поради ниско равнище на разтворения кислород. Смъртност може също да възникне вследствие на нараняване при почистването на съдовете и от загубата на ларви на риби, причинени от дренажната система на съда.

Ген на вителогенина

Въпреки че абсолютните нива на гена на *вителогенина* (*vlg* гена), изразени като копия/ng от общата иРНК, могат да варират значително между лабораториите поради използваните процедури или инструментариум, отношението на *vlg* следва да бъде около 200 пъти по-голямо при женските от контролите, отколкото при мъжките от контролите. Не е необичайно това отношение да бъде с висока стойност от 1000 до

2000, но отношенията под 200 са съмнителни и може да показват проблеми със замърсяване на пробата или проблеми с използваната процедура и/или реагенти.

Вторични полови белези

При мъжките, нормалният диапазон на вторични полови белези, определен като общия брой на сегментите с папили в лъчите на ананалната перка, е 40—80 сегмента при 9—10 wpf. До 15 wpf диапазонът за мъжките в контролите следва да бъде около 80—120 и 0 за женските в контролите. Поради необяснени причини, в редки случаи някои мъжки нямат папили до 9 wpf, но тъй като всички мъжки в контролите развиват папили до 15 wpf, това най-вероятно е причинено от забавено развитие. Наличието на папили в женските в контролите показва наличието на ХХ мъжки в популацията.

ХХ-мъжки индивиди

Нормалната фоновата честота на срещане на ХХ мъжки индивиди в културата изглежда около 4 % или по-малко при 25 °С, като честотата се увеличава при повишена температура. Следва да се вземат мерки, за да се сведе до минимум делът на ХХ мъжките в популацията. Тъй като срещането на ХХ мъжки изглежда е свързано с генетичен компонент и следователно е унаследимо, наблюдаването на запаса от култури и гарантирането, че ХХ мъжки животни не се използват за размножаване на запаса от култури, е ефективно средство за намаляване на срещането на ХХ мъжки в популацията.

Хвърляне на хайвер

Активността по хвърляне на хайвер в контролите с повторения следва да се наблюдава ежедневно преди извършването на оценката на плодовитостта. Двойките от контролите могат визуално да бъдат оценени в качествено отношение за доказване на активност по хвърляне на хайвер. Към 12—14 wpf повечето двойки от контроли следва да хвърлят хайвер. Малкият брой хвърлящи хайвер двойки по това време показва потенциални проблеми, свързани със здравето, зрелостта или физическото състояние на рибите.

Плодовитост

Здравите, добре хранени оризии на възраст 12—14 wpf обикновено хвърлят хайвер всеки ден, като произвеждат в диапазона от 15 до 50 хайверни зърна дневно. Получаването на хайверни зърна от 16 от препоръчителните 24 двойки за размножаване от контролите (> 65 %) следва да е повече от 20 хайверни зърна на ден на двойка и то може да достигне до около 40 хайверни зърна на ден. По-малко от това количество може да е показател за незрели, недохранени или нездрави двойки за размножаване.

Оплождане

Процентът на оплодените хайверни зърна при двойките за размножаване от контролите обикновено е в диапазона на 90 %, като не са необичайни стойности в средата и в горния край на десетката на 90-те %. Коефициентите на плодовитост под 80 % за хайверни зърна от контролите са съмнителни и може да са показателни за нездрави индивиди или за субоптимални условия за отглеждане.

Допълнение 5

ПРИМЕР ЗА ГРАФИК НА ХРАНЕНЕТО

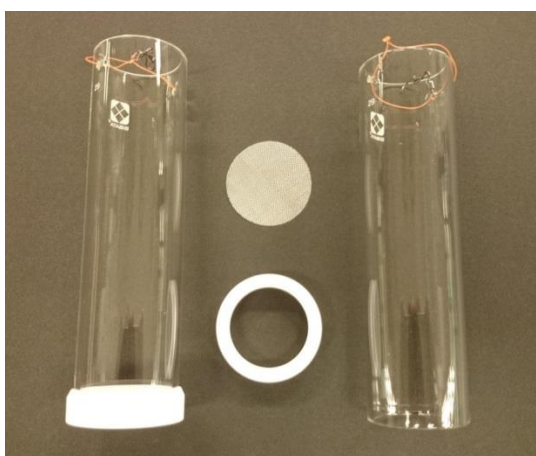
В таблица 1 е показан пример за график за хранене с цел да се гарантира достатъчен растеж и развитие за осигуряване на стабилно възпроизводство. Отклонения от този график на хранене могат да бъдат приемливи, но се препоръчва те да бъдат изпитани, за да се провери дали се наблюдава приемлив растеж и възпроизводство. За да може да се следва предложеният график на хранене, сухото тегло на артемиите за всеки обем каша от артемии трябва да се определи преди започване на изпитването. Това може да се направи чрез претегляне на определен обем каша от артемии, който е бил изсушен в продължение на 24 часа при 60 °C в предварително претеглени блюда. За да се отчете теглото на солите в кашата, същият обем от физиологичен разтвор, използван в кашата, трябва също да се изсуши, претегли и извади от теглото на изсушената каша от артемии. Като алтернатива артемиите могат да се филтрират и да се изплакнат с дестилирана вода преди изсушаването, като по този начин се премахва необходимостта от измерване на теглото на „празната проба с физиологичен разтвор“. Тази информация се използва за преобразуване на информацията в таблицата от сухо тегло на артемии в обем каша от артемии, с който да се хранят рибите. Освен това се препоръчва аликвотни части каша от артемии да се претеглят всяка седмица, за да се провери правилното сухо тегло на артемиите, давани за храна.

Таблица 1: Пример за график на храненето

Време (след излюпване)	Артемии (mg сухо тегло/риба/ден)
Ден 1	0,5
Ден 2	0,5
Ден 3	0,6
Ден 4	0,7
Ден 5	0,8
Ден 6	1,0
Ден 7	1,3
Ден 8	1,7
Ден 9	2,2
Ден 10	2,8
Ден 11	3,5
Ден 12	4,2
Ден 13	4,5
Ден 14	4,8
Ден 15	5,2
Ден 16-21	5,6
Седмица 4	7,7
Седмица 5	9,0
Седмица 6	11,0
Седмица 7	13,5
Седмица 8-умъртвяване	22,5

Допълнение 6**ПРИМЕРИ ЗА ИНКУБАЦИОННИ КАМЕРИ ЗА ХАЙВЕР**Пример А

Този инкубатор се състои от напречно пресечена стъклена центрофужна епруветка, свързана с тубус от неръждаема стомана, която се задържа на място от горната тапа на винт от центрофугата. Малка тръбичка от стъкло или неръждаема стомана преминава през тапата и се разполага близо до закръгленото дъно, като леко подава мехурчета въздух за получаване на суспензия от хайверни зърна и за намаляване на предаването на сапрофитни гъбични инфекции между хайверните зърна, като същевременно се улеснява и обменът на химикала между инкубатора и събирателния съд.

Пример Б

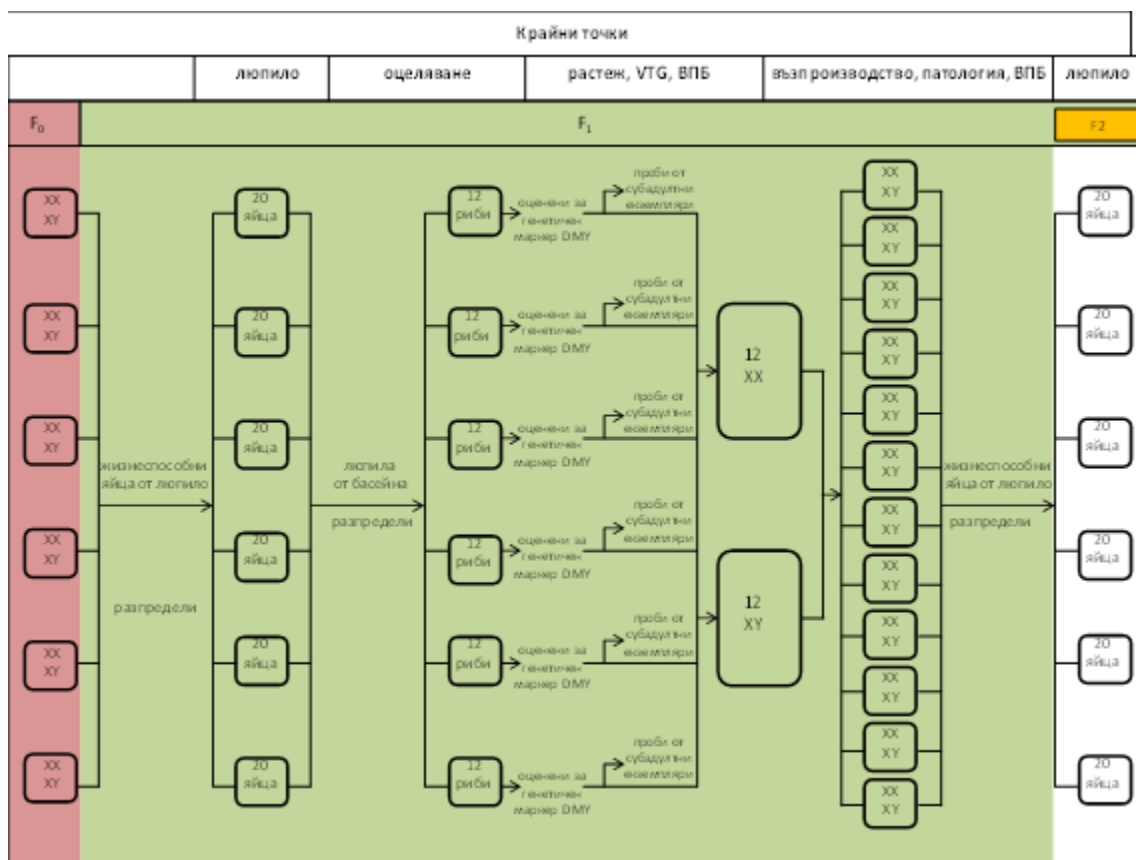


Този инкубатор се състои от тяло, което е стъклен цилиндър (5 cm диаметър и 10 cm височина) и мрежа от неръждаема тел (0.25 ф и 32 размер на отворите), която е прикрепена към дъното на тялото с пръстен от политетрафлуороетилен. Инкубаторите се окачват от повдигащия лост към съдовете и се разклащат вертикално (с приблизително 5 cm амплитуда) в цикъл, подходящ за хайвера на оризията (приблизително веднъж на 4 секунди).

Допълнение 7

СХЕМАТИЧНА ДИАГРАМА ЗА ОБЕДИНЯВАНЕ И ПОСТАВЯНЕ НА ЕКЗЕМПЛЯРИ В ПОВТОРЕНИЯТА ПРИ МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ МЕОGRТ

Фигура 1: Обединяване и поставяне на екземпляри в повторенията по време на МЕОГРТ. Графиката представлява едно третиране или ½ контрола. Поради обединяването идентичността на повторението не е непрекъсната по време на цялото изпитване. Следва да се отбележи, че терминът „хайверни зърна“ се отнася до жизнеспособни и оплодени хайверни зърна (равностойни на ембриони).



Третирания и повторения.

В метода за изпитване се препоръчват пет третирания с изпитван химикал, при които се използва технически чист материал, и отрицателна контрола. Броят на повторенията за едно третиране не остава постоянен в рамките на MEOGRT, а броят на повторенията в третираната контрола е двоен на всяко едно третиране с изпитван химикал. Във F0 всяко третиране с изпитвания химикал има шест повторения, докато третирането на отрицателната контрола се състои от 12 повторения. Използването на разтворители силно се обезкуражава и ако се използват, в протокола от MEOGRT трябва да се включи обосновка както за употребата на разтворител, така и за избора на разтворител. Също така, ако се използва разтворител, са необходими два вида

контроли: а) контрола на разтворител, и б) отрицателна контрола. Всяка от тези две контролни групи следва да се състои от пълно допълнение от повторения във всички точки в рамките на графика на МЕОГРТ. През целия период на развитие на изпитваните организми в поколение F1 (и F2 до момента на излюпване), тази структура на повторенията остава непроменена. На етапа на полово зрелите организми обаче, когато се образуват двойки за размножаване F1, броят на повторенията с двойки за размножаване на третиране се удвоява за оптимален резултат; следователно във всяко третиране с изпитван химикал има до 12 двойки в повторение и 24 двойки в повторение в контролната група (и други 24 двойки в повторение в контролата на разтворител, ако е необходимо). Определянето на излюпването от ембрионите, получени от двойките от F1, се извършва по същата структура на повторенията, както при ембрионите, получени от двойките от F0, което означава първоначално шест повторения на третиране с изпитван химикал и 12 повторения в контролната(ите) група(и).

Допълнение 8

БРОЕНЕ НА ПАПИЛИ НА АНАЛНАТА ПЕРКА

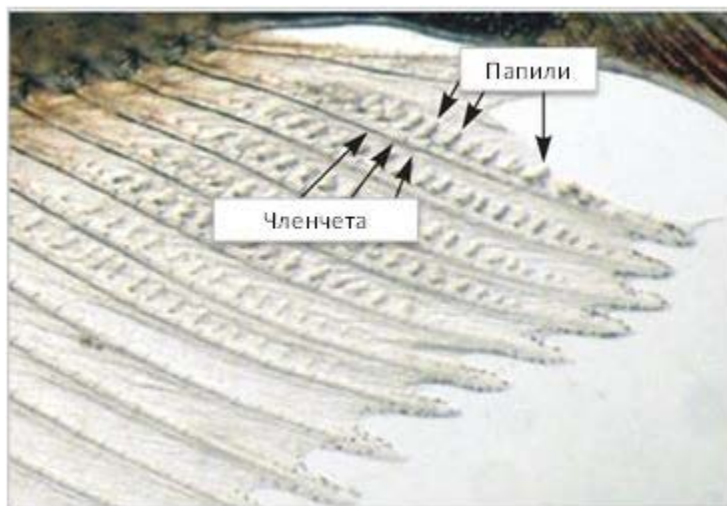
Основни материали и реактиви

- Стереомикроскоп (с прикрепена към него незадължителна камера)
- Фиксатор (напр. на Davidson, не се препоръчва този на Bouin), ако няма да се извършва преброяване от изображение

Процедури

След аутопсията, на аналната перка следва да се направи изображение, за да се даде възможност за удобно преброяване на папилите по аналната перка. Създаването на изображение е препоръчителният метод, но аналната перка може и да се фиксира с фиксатор на Davidson или с друг подходящ фиксатор за около 1 минута. Важно е да се запази аналната перка плоска по време на фиксирането, за да се даде възможност за по-лесно преброяване на папилите. Трупът с аналната перка може да се съхранява във фиксатор на Davidson или в друг подходящ фиксатор, до анализирането му. Преброяват се членчетата (виж **фигура 1**) с папили, които са издадени от задната част на членчето.

Фигура 1: (папили на аналната перка)



Допълнение 9

ПОДРОБЕН ГРАФИК НА ПРОЕКТИ ЗА МЕОGRT

Седмици 1—3 от изпитването (F0)

Хвърлящите хайвер риби от поколение F0, които отговарят на критериите за подбор (вж. точки 16—20), се подлагат на експозиция в продължение на три седмици, за да се даде възможност за образуване на гамети и гонадни тъкани, които да се подложат на експозиция на изпитвания химикал. Всеки съд с повторение съдържа една двойка за размножаване (двойка за размножаване от XX женска — XY мъжка). В продължение на 21 последователни дни, като се започне от ден на изпитване 1, хвърленият хайвер се събира, хайверните зърна се преброяват и оценяват за оплождане.

Седмица 4 от изпитването (F0 и F1)

За предпочитане е оплодените и жизнеспособни хайверни зърна (ембриони) да се събират в рамките на един ден; ако обаче няма достатъчно ембриони, ембрионите могат да се събират в рамките на два дни. Ако са събрани в продължение на два дни, всички ембриони в рамките на третиранията, които са били събрани през първия ден, се обединяват с тези, събрани на втория ден. След това общият брой ембриони, обединени за всяко третиране, се разпределя на случаен принцип към всеки един от инкубаторите за повторения, по 20 ембриона на инкубатор. Смъртността при оплодените хайверни зърна (ембриони) се проверява и записва ежедневно. Мъртвите хайверни зърна се отстраняват от инкубаторите (смъртта в оплодените хайверни зърна може да бъде установена, особено на ранните етапи, по видимата загуба на прозрачност и промяната в оцветяването, причинени от коагулация и/или утаяване на белтъци, което води до бял непрозрачен изглед; ОИСП 210).

Забележка: Ако за единствено третиране е необходим втори ден на събиране, всички третирания (включително контролите) трябва да следват тази процедура. Ако след втория ден от събирането има недостатъчен брой ембриони в рамките на третиране за зареждане на 20 ембриона на инкубатор, тогава се намалява броят на ембрионите, зареждани в рамките на това специфично третиране на 15 ембриона на инкубатор. Ако няма достатъчно ембриони за зареждане на 15 на инкубатор, тогава се намалява броят на инкубаторите с повторения, докато се получат достатъчно ембриони за 15 на инкубатор. Освен това в F0 могат да се добавят повече двойки за размножаване на третиране и контроли, за да се получат повече хайверни зърна за достигане на препоръчаните 20 на повторение.

На ден 24 от изпитването двойките за размножаване от F0 се умъртвяват по хуманен начин и се записват теглото и дължината. Ако е необходимо, двойките за размножаване от F0 може да бъдат държани още 1—2 дни, за да се рестартира F1.

Седмици 5—6 от изпитването (F1)

Един до два дни преди предвиденото начало на излюпването се спира или намалява разбъркването на инкубираните хайверни зърна с цел да се ускори излюпването. При ежедневното излюпване на ембриони новоизлюпените се обединяват по третиране и се разпределят систематично към всеки съд с ларви от повторение в рамките на специфично третиране, с не повече от 12 новоизлюпени. Това се прави, като на случаен принцип се избират новоизлюпени и се поставя само по едно новоизлюпено в последователни повторения на случаен принцип, преминавайки последователно през повторенията от отделното третиране, докато всички повторения в рамките на третирането имат по 12 новоизлюпени. Ако няма достатъчно новоизлюпени за попълване на всички повторения, тогава се гарантира колкото е възможно повече повторения да имат 12 новоизлюпени, за да започне етапът на F1.

Хайверните зърна, които не са се излюпили в продължение на два пъти от медианния ден на излюпване при контролата, се считат за нежизнеспособни и се отстраняват. Броят на новоизлюпените се записва и степента на излюпване (способност за излюпване) се изчислява във всяко повторение.

Седмици 7—11 от изпитването (F1)

Преживяемостта на ларви на риби се проверява и записва ежедневно във всички повторения. В ден на изпитване 43 се записва броят на преживелите риби във всяко повторение, както и първоначалният брой на новоизлюпените, поставени в повторението (номинално дванадесет). Това дава възможност за изчисляване на преживяемостта в проценти от излюпването до субадултния организъм.

Седмици 12-13 от изпитването (F1)

В дни 78—85 на изпитването се взема малка проба от опашната перка на всяка риба, за да се определи генотипният пол на индивида (напр. подрязване на перка) за всички риби. Тази информация се използва за установяване на двойки за размножаване.

В рамките на три дни след определянето на генотипния пол на всяка риба на случаен принцип се определят 12 двойки за размножаване на третиране и 24 двойки на контрола. Две XX и XY риби от всяко повторение се избират на случаен принцип и след това се обединяват по пол, и след това се избират на случаен принцип, за да се образува двойка за размножаване (т.е. двойка XX — XY). Установяват се минимум 12 повторения на третиране с химикал и минимум 24 повторения за контролата с по една двойка за размножаване на повторение. Ако едно повторение не разполага с две XX или с две XY риби налични за обединяване, следва да се вземе риба с подходящ генотипен пол от други повторения в рамките на третирането.

Останалите риби (максимум 8 риби на повторение) се умъртвяват по хуманен начин и от тях се вземат проби за различните крайни точки за субадултни индивиди. Данните от *dmy* (XX или XY) за всички проби от субадултни индивиди се съхраняват, за да се гарантира, че всички данни за крайни точки могат да бъдат отнесени към генетичния пол на всяка отделна риба.

Седмици 13—14 от изпитването (F1)

Експозицията продължава като субадултните двойки за размножаване се развиват до полово зрели. В ден на изпитване 98 (т.е. денят преди началото на събирането на хайверните зърна) хайверните зърна се отстраняват както от аквариума, така и от женските.

Седмици 15—17 от изпитването (F1)

Хвърленият хайвер се събира ежедневно в продължение на 21 последователни дни във всяко повторение и се оценява за плодовитост и оплождане.

Седмица 18 от изпитването (повторение на седмица 4 от изпитването) (F1 и F2)

Сутринта на ден 120 на изпитването се извършва събиране на хайверни зърна във всяка камера с повторение. Събраните хайверни зърна се подлагат на оценка и оплодените хайверни зърна (с отстранени влакна) от всяка една от двойките за размножаване се обединяват на база третиране и систематично се разпределят в инкубационните камери с 20 оплодени яйца на инкубатор. Инкубаторите могат да се поставят в отделни „инкубационни съдове“, приготвени за всяко третиране, или в съда с повторения, който при излюпването ще съдържа излюпените ларви. За предпочитане е ембрионите да се събират в рамките на един ден; ако обаче няма достатъчно ембриони, ембрионите могат да се събират в продължение на два дни. Ако са събрани в продължение на два дни, всички ембриони в рамките на третиранията, които са били събрани през първия ден, се обединяват с тези, събрани на втория ден. След това общият брой ембриони, обединени за всяко третиране, се разпределя на случаен принцип към всеки един от инкубаторите за повторения, по 20 ембриона на инкубатор. Забележка: Ако за единствено третиране е необходим втори ден на събиране, всички третираня (включително контролите) трябва да следват тази процедура. Ако след втория ден от събирането има недостатъчен брой ембриони в рамките на дадено третиране за зареждане на 20 ембриона на инкубатор, тогава се намалява броят на ембрионите, зареждани в рамките на това специфично третиране на 15 ембриона на инкубатор. Ако няма достатъчно ембриони за зареждане на 15 на инкубатор, се намалява броят на инкубаторите с повторения, докато се получат достатъчно ембриони за 15 на инкубатор.

На ден 121 от изпитването (или ден 122 от изпитването, за да се гарантира, че F2 е започнало добре), двойките за размножаване от F1 се умъртвяват по хуманен начин и се анализират за крайните точки за полово зрели организми. Ако е необходимо, двойките за размножаване от F1 може да бъдат държани още 1—2 дни, за да се рестартира F2.

Седмици 19—20 от изпитването (F2)

Един до два дни преди предвиденото начало на излюпването се спира или намалява разбъркването на инкубираните хайверни зърна с цел да се ускори излюпването. Ако

изпитването се прекратява чрез завършване на излюпването на F2, всеки ден новоизлюпените се преброяват и се отстраняват. (ембриони, които не са се излюпили след продължително инкубационно време, определено като два пъти от медианния ден на излюпване при контролата, се считат за нежизнеспособни).

Допълнение 10

СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ

Типовете биологични данни, получени в рамките на MEOGRT, не са уникални за него и, с изключение на данните от патологията, са разработени множество подходящи статистически методологии, за да се анализират правилно подобни данни в зависимост от характеристиките на данните, включително нормалността, хомогенността на дисперсията, дали планът на изследването се поддава на тестване на хипотези или регресионен анализ, на параметрични в сравнение с непараметрични тестове и т.н. По принцип предложените статистически анализи следват препоръките на ОИСП за данни за екотоксичност (OECD 2006) и блокова схема за вземане на решения за анализа на данните от MEOGRT може да бъде намерена на фигура 2.

Приема се, че най-често наборите от данни ще показват монотонни отклици. Освен това следва да се разгледа въпросът за използването на едностранен статистически тест, спрямо двустранен статистически тест. Освен ако не съществува биологична обосновка, която да направи едностранния тест неподходящ, се предлага да се използват едностранни тестове. Въпреки че в следващия раздел се препоръчват някои статистически тестове, ако са разработени по-подходящи и/или по-мощни статистически методи за прилагане спрямо специфичните данни, генерирани в MEOGRT, тези статистически тестове следва бъдат използвани с оглед възползване от тези предимства.

Данните от MEOGRT следва да се анализират поотделно за всеки генотипен пол. Съществуват две стратегии за анализ на данните от риби с обърнат пол (XX-мъжки или XY-женски). 1) Изключване на всички данни от риби с обърнат пол по време на цялото изпитване, с изключение на честотата на срещане на обърнат пол във всяко повторение. 2) Оставяне на данните от всички риби с обърнат пол в набора от данни и анализ въз основа на генотипа.

Хистопатологични данни

Данните за хистопатологията се отчитат като балови оценки на тежестта, които се оценяват с помощта на разработен нов статистически тест — модифициран от Рао-Скот трендов тест на Кокрън-Армитидж със сегментиране (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices — RSCABS), (Green et al., 2014). Корекцията на *Rao-Scott* запазва информацията за повторенията в изпитването; процедурата „със сегментиране“ („by slices“) включва биологичните очаквания, че баловите оценки на тежестта като тенденция се увеличават с увеличаване на концентрациите на третирането. За всяка диагноза резултатът от RSCABS посочва кои третираня имат по-голяма честота на срещане на патологията в сравнение с контролите и съответното ниво на тежест.

Данни за плодовитостта

Анализите по отношение на данните за плодовитостта се състоят от тест на Йонкхере-

Терпстра със стъпка назад или тест на Уйлямс за определяне на ефектите от третирането, при условие че данните съответстват на монотонна концентрация-отклик. При тест със стъпка назад всички сравнения се правят при 0,05 ниво на значимост и не се правят корекции за броя на направените сравнения. Очаква се данните да са в съответствие с монотонна концентрация-отклик, но това може да се провери чрез визуална инспекция на данните или чрез съставяне на линейни и квадратични контрасти на средните от третиране след трансформиране на данните чрез подреждане по рангова скала. Освен ако квадратичният контраст е значим, а линейният контраст не е значим, се прави трендов тест. В противен случай се използва тестът на Дънет за определяне на ефектите от третирането, ако данните са с нормално разпределение с хомогенни дисперсии. Ако тези изисквания не са изпълнени, се използва тестът на Дън с корекция на Бонферони-Холм. Всички посочени тестове се извършват независимо от който и да е общ F-тест или тест на Кръскал-Уолис. Повече подробности са дадени в OECD 2006.

Могат да се използват алтернативни методи, като например обобщен линеен модел с Поасоново разпределение на грешките за преброяване на хайверните зърна (без трансформиране), ако са обосновани от статистическа гледна точка (Cameron and Trividi, 2013). Препоръчва се консултация със статистик, ако се използва алтернативен подход.

Дневен брой хайверни зърна в рамките на едно поколение

Моделът ANOVA се дава от $\text{Време} \times \text{Време} + \text{Третиране} + * \text{Третиране} + \text{Време} \times \text{Третиране} + * \text{Време} \times \text{Третиране}$, със случайни ефекти от Повторение($\text{Поколение} \times \text{Третиране}$), и $\text{Време} \times \text{Повторение}(\text{Третиране})$, даващи възможност за компоненти с нееднакви дисперсии и от двата типа между поколенията. В този случай Време се отнася за честотата на броенето на хайверните зърна (напр. Ден или Седмица). Това е анализ на повтарящи се мерки, като корелациите между наблюденията върху същите повторения представляват естеството на повтарящи се мерки на данните.

Основните ефекти от третирането се изпитват, като се използва тестът на Дънет (или на Дънет-Хсу), който прави корекция за броя на сравненията. Корекции за основните ефекти от поколение или време са необходими, защото при тези два фактора не съществува ниво „контрола“ и всяка двойка нива е сравнение от възможен интерес. За тези два основни ефекта, ако F-тестът за основния ефект е значим на нивото от 0,05, тогава сравненията по двойки през нивата при този фактор могат да бъдат тествани на ниво от 0,05 без да се правят допълнителни корекции.

Моделът включва дву- и трифакторни взаимодействия, така че основният ефект, напр. по отношение на времето, може да не е значим дори и времето да оказва значимо въздействие върху резултатите. По този начин, ако дву- или трифакторно взаимодействие, включващо времето, е значимо на ниво от 0,05, тогава може да се приеме сравнение между нива на време при 0,05 ниво на значимост без допълнителна корекция.

Следват F-тестове за значимост на третирането в рамките на времето, така наречените „сегменти“ („slices“) в ANOVA таблицата. Ако, например, сегментът за третиране в рамките на F1 и време 12 е значим при 0,05 ниво на значимост, тогава сравненията по двойки за третиране в рамките на F1 и време 12 могат да бъдат приети при 0,05 ниво на значимост без допълнителна корекция. Подобни твърдения се прилагат за тестовите за време в рамките на F1 и третиране, и за поколение в рамките на време и третиране.

На последно място, за сравнения, които не попадат в никоя от горепосочените категории, сравненията следва да бъдат коригирани, като се използва корекцията на Бонферони-Холм на р-стойностите. Допълнителна информация за анализи на такива модели може да бъде намерена в Hocking (1985) и Hochberg and Tamhane (1987).

Като алтернатива, необработените данни се записват и представят в протокола от изследването като плодовитост (брой на хайверните зърна) на повторение за всеки ден. Следва да се изчисли средната стойност за повторението на необработените данни, след което да се приложи трансформация корен квадратен. Следва да бъде изчислен еднофакторен ANOVA върху трансформиранията средни от повторения, последван от контрасти на Дънет. Също така може да бъде от полза да се направи визуална проверка на данните за плодовитостта на всяко третиране и/или повторение с диаграма на разсейване, която показва данните в течение на времето. Това ще даде възможност за неформална оценка на потенциалните въздействия с течение на времето.

Всички други биологични данни

Статистическите анализи се основават на изходното допускане, че при подходящ подбор на дозата данните ще бъдат монотонни. По този начин се допуска, че данните са монотонни и че формално се оценяват за монотонност с използване на линейни и квадратични контрасти. Ако данните са монотонни, се препоръчва трендов тест на Йонкхере-Терпстра за медианите в повторенията (както е препоръчано в OECD 2006). Ако квадратичният контраст е значим, а линейният контраст не е значим, се смята, че данните не са монотонни.

Ако данните не са монотонни, по-специално поради редуцирания отклик на най-високите едно или две третираня, следва да се обърне внимание на цензуриране на набора от данни, така че анализът да се извърши без тези третираня. Това решение трябва да се вземе с професионална преценка и с всички налични данни, особено данните, които показват ясно изразена токсичност при тези нива на третиране.

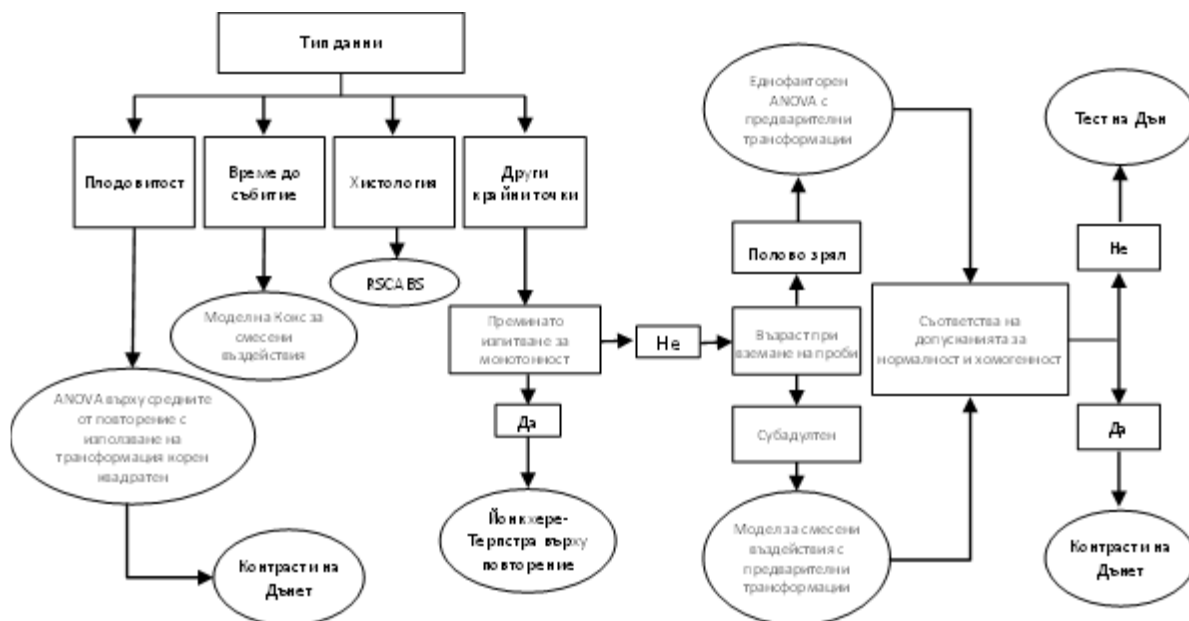
По отношение на теглото и дължината не се препоръчват трансформации, въпреки че от време на време те могат да бъдат необходими. Препоръчва се обаче лог-трансформация за данните за вителогенина; препоръчва се трансформация корен квадратен за данните за SSC (папили от анални перки); препоръчва се трансформация аркуссинус-корен квадратен за данните за дела на излюпване, преживяемостта в проценти, отношението на половете и оплодените хайверни зърна в проценти.

Времето до излюпване и времето до първото хвърляне на хайвера следва да се третира като данни за време до определено събитие, при които отделните ембриони, които не са се излюпили в определения период или повторенията, в които никога не е настъпило хвърляне на хайвер, се третира като цензурирани откъсно данни. Времето до излюпване следва да се изчисли от медианния ден на излюпване на всяко повторение. Тези крайни точки следва да се анализират, като се използва модел на Кокс за пропорционалния риск за смесени въздействия (mixed-effects Cox proportional hazard model).

Биологичните данни от проби от полово зрели индивиди са с едно измерване на повторение, т.е. има една XX риба и една XY риба на аквариум с повторение. Поради това се препоръчва да се направи еднофакторен ANOVA върху средните от повторения. Ако допусканията на ANOVA (нормалност и хомогенност на дисперсията, изчислени въз основа на остатъците в рамките на ANOVA съответно с теста на Шапиро-Уилкс и с теста на Левин) са изпълнени, следва да се използват контрасти на Дънет, за да се определят третиранията, които са били различни от контролата. От друга страна, ако допусканията на ANOVA не са изпълнени, тогава трябва да се направи тест на Дън, за да се определи кои третирания са били различни от контролата. Подобна процедура се препоръчва за данни, които са под формата на проценти (оплождане, излюпване и преживяемост).

Биологичните данни от пробите със субадултни индивиди са с 1 до 8 измервания на повторение, т.е. може да има променлив брой индивиди, които допринасят за средната стойност на повторение за всеки генотипен пол. Поради това се препоръчва да се използва модел ANOVA за смесени въздействия, следван от контрасти на Дънет, ако са били изпълнени допусканията за нормалност и хомогенност на дисперсията (при остатъците в рамките на ANOVA за смесени въздействия). Ако не са изпълнени, тогава трябва да се направи тест на Дън, за да се определи кои третирания са били различни от контролата.

Фигура 2: Схема за препоръчаните статистически процедури за анализ на данните от MEOGRT.



Литература

- (1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.
- (2) Cameron AC and Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.
- (3) Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.
- (4) Hochberg Y and Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

В.53 ИЗСЛЕДВАНЕ НА РАСТЕЖА И РАЗВИТИЕТО НА ЛАРВИ НА ЗЕМНОВОДНИ (LAGDA)

ВЪВЕДЕНИЕ

1. Този метод за изпитване съответства на насоките за изпитване № 241 на ОИСП (2015 г.). Необходимостта от разработване и валидиране на изследване, което може да идентифицира и характеризира неблагоприятните последици от експозиция на токсични химикали при земноводни, произлиза от опасения, че нивата на химикалите в околната среда могат да окажат неблагоприятно въздействие както върху хората, така и върху дивата флора и фауна. Насоките на ОИСП за изследване на растежа и развитието на ларви на земноводни (LAGDA) описват изпитване за токсичност с вид земноводно, при което изпитване се разглеждат растежът и развитието от оплождането през ранния ювенилен период. Това е изследване (обикновено 16 седмици), с което се оценяват ранното развитие, метаморфозата, преживяемостта, растежа и частичното полово съзряване. То също така дава възможност за измерване на набор от други крайни точки, които дават възможност за диагностична оценка на химикали, за които се подозира, че нарушават функционирането на ендокринната система, или други типове химикали, които са токсични за развиващия се организъм и за възпроизводството. Методът, описан в настоящия метод за изпитване, е резултат от работата по валидиране по отношение на гладката ноктеста жаба (*Xenopus laevis*), извършена от Агенцията на САЩ за защита на околната среда (U.S. EPA) с подкрепяща работа от Япония (1). Въпреки че други земноводни видове могат да бъдат адаптирани към протокол за изпитване на растежа и развитието, при който възможността за определяне на генетичния пол да е важен компонент, конкретните методи и наблюдаваните крайни точки, описани подробно в настоящия метод за изпитване, са приложими само за *Xenopus laevis*.
2. LAGDA служи като изпитване на по-високо стъпало със земноводно за събиране на по-подробна свързана с концентрация-отклик информация относно нежеланите ефекти, подходяща за употреба при идентифицирането и характеризирането на опасности, както и при оценката на екологичния риск. Изследването съответства на ниво 4 от концептуалната рамка на ОИСП за изпитване и оценка на веществата, нарушаващи функционирането на ендокринната система, при което изследванията *in vivo* предоставят и данни за вредните въздействия върху крайните точки, относими към ендокринната система (2). Общият план за опита включва експониране на ембриони от *X. laevis* на етап 8—10 по Nieuwkoop и Faber (NF) (3) най-малко на четири различни концентрации на изпитван химикал (обикновено разположени на интервали, кратни на не по-малко от 10 на степен 1/2) и контрола(и) до 10 седмици

след медианното време до етап 62 по NF в контролата, с една междинна подпроба на етап 62 по NF (≤ 45 след оплождането; обикновено около 45 дни (dpf)). Във всяка изпитвана концентрация има четири повторения с осем повторения за контролата. Крайните точки, оценени по време на експозицията (в междинната подпроба и в крайната проба при приключване на изпитването), включват тези, които показват обща токсичност: смъртност, анормално поведение и определяне на растежа (дължина и тегло), както и крайни точки, предназначени за характеризиране на специфични механизми на действие, свързани с токсичност за ендокринната система, насочени към физиологични процеси, медириани от естрогени, андрогени или щитовидната жлеза. Основен акцент при метода са потенциалните въздействия, относими към популацията (а именно неблагоприятно въздействие върху преживяемостта, развитието, растежа и репродуктивното развитие) за изчисляване на концентрация без наблюдавано въздействие (NOEC) или концентрация, при която се наблюдава въздействие, причиняващо x % изменение (EC_x) в измерената крайна точка. Въпреки че следва да се отбележи, че EC_x-подходите рядко са подходящи за големи проучвания от този тип, при който увеличаването на броя на изпитваните концентрации, за да се даде възможност за определяне на желаната EC_x, може да не е практично. Следва също така да се отбележи, че методът не обхваща самата фаза на възпроизводството. Определенията, използвани за този метод за изпитване, са дадени в допълнение 1.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

3. Поради ограничения брой изпитвани химикали и лаборатории, участващи във валидирането на това доста сложно изследване, особено предвид на това, че междулабораторната възпроизводимост все още не е документирана с експериментални данни, се очаква, че когато има достатъчно изследвания, за да се установи въздействието на този нов модел на изследване, насоките за изпитване № 241 на ОИСП ще бъдат преразгледани и, ако е необходимо, преработени с оглед на придобития опит. LAGDA е важно изследване за справяне с потенциалните фактори, допринасящи за намаляване на популацията на земноводните, чрез оценка на въздействието от експозицията на химикали по време на чувствителния ларвен стадий, когато въздействието върху преживяемостта и развитието, включително нормалното развитие на репродуктивните органи, може да окаже неблагоприятно въздействие върху популацията.
4. Изпитването е разработено с оглед откриване на апикален ефект (ефекти), произтичащ както от ендокринни, така и от различни от ендокринните механизми, и включва диагностични крайни точки, които са отчасти специфични за основни ендокринни механизми. Следва да се отбележи, че до разработването на LAGDA не

съществуваше валидирано изследване, което да обслужва тази функция при земноводните.

5. Преди започване на изследването е важно да се разполага с информация за физичните и химичните свойства на изпитвания химикал, по-специално за да се позволи приготвянето на стабилни разтвори на химикала. Необходимо е също така да се разполага с достатъчно чувствителен метод за анализ за проверката на концентрациите на изпитвания химикал. За период от приблизително 16 седмици при изследването е необходимо да има общо 480 животни, т.е. ембриони на *X. laevis* (или 640 ембриона, ако се използва контрола на разтворител), за да се осигури достатъчна мощност на теста за оценка на крайните точки, относими към популацията, като растежа, развитието и половото съзряване.
6. Преди използването на метода за изпитване на смес с регулаторна цел следва да се обмисли дали той ще предостави приемливи за планираната регулаторна цел резултати. Освен това при това изследване не се прави пряка оценка на плодовитостта, поради което е възможно той да не е приложим за използване на по-напреднал етап от ниво 4 на концептуалната рамка на ОИСП за изпитване и оценка на веществата, нарушаващи функционирането на ендокринната система.

НАУЧНА ОСНОВА НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

7. Голяма част от настоящото ни разбиране за биологията на земноводните е получено, като за лабораторен модел е използван видът *X. laevis*. Този вид може да се отглежда рутинно в лаборатория, овулацията може да се предизвиква, като се използва човешки хорионен гонадотропин (hCG), и изходни екземпляри от животните са лесно достъпни от лица, развъждащи и търгуващи с животни.
8. Подобно на всички гръбначни животни, възпроизводството при земноводните се намира под контрола на хипоталамус-хипофиза-гонадата ос (HPG) (4). Естрогените и андрогените са медиатори на тази ендокринна система, насочващи развитието и физиологията на полово диморфните тъкани. Съществуват три отделни фази в жизнения цикъл на земноводните, през които тази ос е особено активна: 1) разграничаване на гонадите по време на развитието на ларвите, 2) развитие на вторични полови белези и узряване на гонадите по време на ювенилната фаза и 3) функционално възпроизводство на полово зрели индивиди. Всеки от тези три етапа от развитието е вероятно податлив на ендокринни смущения от някои химикали, като например естрогени и андрогени, което в крайна сметка води до загуба на репродуктивното здраве от организмите.

9. Гонадите започват да се развиват на етап 43 по NF, когато най-напред се развива бипотенциалният полов гребен. Диференциацията на гонадите започва на етап 52 по NF, когато примордиалните зародишни клетки или мигрират в медуларната тъкан (мъжки), или остават в кортикалната област (женски) на развиващите се гонади (3). За този процес на полова диференциация на гонадите за първи път бе докладвано, че е чувствителен към химическа промяна при *Xenopus* през 50-те години на 20 век (5) (6). В резултат от експозицията на попови лъжички на естрадиол през този период на диференциране на гонадите се получава обръщане на половете на мъжките, които, когато бъдат отгледани до полова зрялост, са напълно функционални женски индивиди (7) (8). Функционално обръщане на пола от женски в мъжки също е възможно и е докладвано след имплантиране на тъкан от тестиси в полови лъжички (9). При все това, въпреки че експозиция на инхибитор на ароматазата причинява също така функционална промяна на пола при *X. tropicalis* (10), не е доказано, че това се наблюдава при *X. laevis*. От историческа гледна точка въздействието на токсичните химикали върху диференциацията на гонадите се е оценявало чрез хистологично изучаване на гонадите при метаморфозата, а обръщането на пола е можело да се определи само чрез анализ на съотношения между половете. До неотдавна не е имало средства за пряко определяне на генетичния пол на *Xenopus*. Неотдавнашното установяване на свързани с пола маркери в *X. laevis* обаче прави възможно определянето на генетичния пол и дава възможност за пряка идентификация на животните с обърнат пол (11).
10. При мъжките развитието на ювенилните индивиди започва с увеличаване на нивото на тестостерон в кръвта, което съответства на развитието на вторични полови белези, както и на развитието на тестисите. При женските естрадиолът се получава от яйчниците, което води до появата на вителогенин (VTG) в плазмата, вителогенинови ооцити в яйчника и развитието на яйцепроводи (12). Яйцепроводите са женски вторични полови белези, които функционират при съзряване на ооцитите по време на възпроизводството. Желатиноподобни пластове се прилагат към външната част на ооцитите, когато те преминават през яйцепровода и се събират във външния слой на графовия фоликул, готови за оплождане. Развитието на яйцепровода изглежда се регулира от естрогени, тъй като развитието е в корелация с нивата на естрадиол в кръвта при *X. laevis* (13) и *X. tropicalis* (12). Докладвано е развитието на яйцепроводи при мъжките след експозиция на полихлорирани бифенили (14) и 4-трет-октилфенол (15).

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

11. Планът за изпитването включва експониране на ембриони от *X. laevis* на етап 8—10 по NF по воден път най-малко на четири различни концентрации на изпитван

химикал, както и контрола(и) до 10 седмици след медианното време до етап 62 по NF в контролата, с една междинна подпроба на етап 62 по NF. Въпреки че може също така да е възможно да се дозират силно хидрофобни химикали чрез храната, към днешна дата има малко опит при използването на този път на експозиция. Във всяка изпитвана концентрация има четири повторения с осем повторения за всяка използвана контрола. Крайните точки, оценени по време на експозицията, включват тези, които показват обща токсичност (т.е. смъртност, необичайно поведение и определяне на растежа (дължина и тегло)) , както и крайни точки, предназначени за характеризирание на специфични механизми на действие на ендокринна токсичност, насочени към физиологични процеси, медиирани от естрогени, андрогени или от щитовидната жлеза (т.е. хистопатология на щитовидната жлеза, хистопатология на гонадите и гонадните канали, необичайно развитие, вителогенин (по избор) и отношения на генотипен/фенотипен пол).

КРИТЕРИИ ЗА ВАЛИДНОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО

12. Прилагат се следните критерии за валидност на изпитването:

- концентрацията на разтворен кислород трябва да бъде ≥ 40 % от стойността на насищане при равновесие с атмосферния въздух (ASV) по време на изпитването;
- Температурата на водата трябва да бъде в интервала от 21 ± 1 °C, като разликите между повторенията не трябва да надвишават $1,0$ °C;
- рН на разтвора за изпитване трябва да се поддържа между 6,5 и 8,5, а разликите между повторенията и между третиранията не трябва да надвишават 0,5;
- следва да бъдат на разположение доказателства, че концентрацията на изпитвания химикал в разтвора е била задоволително поддържана в рамките на ± 20 % от усреднените измерени стойности;
- Смъртността през периода на експозиция следва да бъде ≤ 20 % във всяко повторение от контролите;
- ≥ 70 % жизнеспособност при хвърления хайвер, избран за започване на изследването;
- Медианното време до етап 62 по NF при контролите следва да бъде ≤ 45 дни.
- Средното тегло на изпитваните организми на етап 62 по NF и при прекратяването на изследването при контролите и контролите на разтворител (ако се използват такива) следва да достигне съответно $1,0 \pm 0,2$ и $11,5 \pm 3$ g.

13. Въпреки че не е критерий за валидност, се препоръчва за анализ да са на разположение поне три нива на третиране с три неизложени на риск повторения.

Прекомерната смъртност, която излага на риск третирането, се определя като > 4 случая на смъртност ($> 20 \%$) в 2 или повече повторения, които не могат да бъдат обяснени с техническа грешка. Най-малко три равнища на третиране без ясно изразена токсичност следва да са налични за анализ. Признаците на ясно изразена токсичност могат да включват плуване на повърхността, лежане на дъното на съда, обърнато или неправилно плуване, липса на активност на повърхността и неоткликване на дразнителите, морфологични аномалии (напр. деформации на задните крайници), хеморагични увреждания и абдоминален оток, но не се ограничават до това.

14. Ако се наблюдава отклонение от критериите за валидност на изпитването, последиците следва да се съобразят с надеждността на резултатите от изпитването и тези отклонения и съображения следва да бъдат включени в протокола от изпитването.

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДИТЕ

Апаратура

15. Обикновено лабораторно оборудване и специално следното:

- а) апарати за контролиране на температурата (напр. от нагреватели или охладители, регулируеми до 21 ± 1 °C);
- б) термометър;
- в) Бинокулярен стереомикроскоп и инструменти за дисекция
- г) цифров фотоапарат с разделителна способност най-малко 4 мегапиксела и функция за микрофотография (ако е необходимо);
- д) аналитична везна, с възможност за измерване до 0,001 mg или 1 µg;
- е) устройство за измерване на разтворен кислород и рН-метър
- ж) измервателен уред за интензитет на светлината с възможности за измерване в lux;

Вода

Източник и качество

16. Може да се използва всякаква вода за разреждане, която е налична на място (напр. изворна вода или филтрувана с активен въглен чешмяна вода) и позволява нормален растеж и развитие на *X. laevis* и следва да са на разположение доказателства за нормален растеж в тази вода. Тъй като качеството на водата на местно равнище може да се различава значително от едно място на друго, следва да се извърши анализ на

качеството на водата, по-специално ако няма на разположение данни за предходни периоди относно полезността на водата за отглеждане на ларви на земноводни. Правят се измервания на тежки метали (например Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), основни аниони и катиони (например Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), пестициди, общ органичен въглерод и суспендирани твърди частици, преди започването на изпитването и/или например на всеки шест месеца, когато се знае, че водата за разреждане има относително постоянно качество. Някои от химичните характеристики на приемливата вода за разреждане са изброени в допълнение 2.

Концентрация на йодид във водата за изпитване

17. С цел щитовидната жлеза да синтезира тиреоидни хормони за поддържане на нормалната метаморфоза, следва да има достатъчно количество йодид, който да е на разположение на ларвите в комбинация от водни и хранителни източници. Понастоящем липсват емпирично изведени насоки за минимални концентрации на йодид или в храните, или във водата, за да се осигури подходящо развитие. Независимо от това наличността на йодид може да засегне способността на тиреоидната система да реагира на средства, активни по отношение на щитовидната жлеза, и за тази наличност е известно, че променя основната дейност на щитовидната жлеза, което заслужава внимание при тълкуване на резултатите от тиреоидната хистопатология. Въз основа на предишна работа е доказано успешно провеждане на изследването, когато концентрацията на йодид във вода за разреждане (I^-) варира между 0,5 и 10 $\mu\text{g/l}$. В идеалния случай минималната концентрация на йодид във водата за разреждане по време на изпитването трябва да бъде 0,5 $\mu\text{g/l}$ (добавя се като натриева или калиева сол). Ако водата за изпитване е възстановена от дейонизирана вода, йодът следва да се добави при минимална концентрация от 0,5 $\mu\text{g/l}$. Измерените концентрации на йодид от водата за изпитване (т.е. вода за разреждане) и добавянето на йод във водата за изпитване с йод или други соли (ако се използват) следва да се протоколират. Йодното съдържание може също да се измерва в храната(ите), в допълнение към водата за изпитване.

Система на експозиция

18. Изпитването е разработено с помощта на система с устройство за проточно разреждане. Компонентите на системата трябва да имат компоненти, предназначени за контакт с водата, направени от стъкло, неръждаема стомана и/или други химически инертни материали. Съдовете за експозиция следва да представляват аквариуми от стъкло или неръждаема стомана, а полезният обем на съда, следва да бъде между 4,0 и 10,0 l (минимална дълбочина на водата от 10 до 15 cm). Системата трябва да може да поддържа всички концентрации на експозиция, контрола и контрола на разтворител, ако е необходимо, с четири повторения на третиране и

осем в контролите. Дебитът на потока към всеки съд трябва да бъде постоянен по отношение както на поддържането на биологичните условия, така и на експозицията на химикала. Препоръчва се да се използват подходящи скорости на потока (напр. най-малко 5 оборота на ден в даден съд), за да се избегне намаляване на концентрацията на химикала, дължащо се на метаболизма както в изпитваните организми, така и във водните микроорганизми, които се намират в аквариумите или в абиотичните пътища на разграждане (хидролиза, фотолиза) или разсейване (изпарение, сорбция). Съдовете за третиране следва да бъдат поставени на случаен принцип в дадена позиция в системата за експозиция, за да се намалят потенциалните ефекти от позиционирането, включително незначителни промени в температурата, интензитета на светлината и други. Допълнителна информация за изграждането на проточни системи за експозиция може да се получи от стандартното ръководство на ASTM за извършване на изпитвания за остра токсичност за материали с риби, макробезгръбначни и земноводни (16).

Доставка на химикал: приготвяне на изпитвани разтвори

19. За да се приготвят разтвори за изпитване в системата за експозицията, изходният разтвор на изпитвания химикал следва да бъде дозиран в системата за експозиция с подходяща помпа или друга апаратура. Дебитът на изходния разтвор следва да се калибрира в съответствие с аналитичното потвърждаване на изпитваните разтвори преди иницирирането на експозицията, и обемът да се проверява периодично по време на изпитването. Разтворът за изпитване във всяка камера трябва да бъде обновяван поне с 5 обновявания на обема на ден .
20. Методът, използван за въвеждане на изпитвания химикал в системата, може да варира в зависимост от неговите физични и химични свойства. Поради това преди изпитването следва да бъде получена основна информация за химикала, която е относима към определяне на неговата стабилност. Полезна информация за специфичните за изпитвания химикал свойства включва структурната формула, молекулното тегло, чистотата, стабилността във вода и на светлина, pK_a и K_{ow} , разтворимостта във вода (за предпочитане в средата на изпитване) и парното налягане, както и резултатите от изпитването за пълна биоразградимост (метод за изпитване B.4 (17) или B.29 (18)). Разтворимостта и парното налягане може да се използват за изчисляване на константата по закона на Хенри, която ще покаже дали се очакват загуби на изпитвания химикал поради изпарение. Провеждането на това изпитване без информацията, посочена по-горе, следва да се разглежда внимателно, тъй като планът на изследването ще зависи от физичните и химичните свойства на изпитвания химикал и без тези данни може да е трудно резултатите от изпитването да бъдат тълкувани или може те да са лишени от смисъл. Следва да е на разположение и надежден метод за анализ за количествено определяне на

изпитвания химикал в изпитваните разтвори, с известна и протоколирана точност и граница на откриване. Разтворимите във вода изпитвани химикали могат да бъдат разтворени в аликвотни части вода за разреждане при концентрация, която позволява доставка при целевата концентрация на изпитване при проточна система. Химикалите, които са течни или твърди при стайна температура и са умерено разтворими във вода, могат да се нуждаят от сатуратори течност-течност или течност-твърдо тяло (напр. с колона от стъклена вата) (19). Въпреки че може също така да е възможно да се дозират силно хидрофобни изпитвани химикали чрез храната, има малко опит при използването на този път на експозиция в това изследване.

21. Разтворите за изпитване при избраните концентрации се приготвят чрез разреждане на изходен разтвор. Изходният разтвор се приготвя за предпочитане чрез просто смесване и разбъркване на изпитвания химикал във водата за разреждане с помощта на механични средства (например разклащане и/или ултрасонификация). За постигане на подходящо концентриран изходен разтвор могат да се използват колони/системи за насищане или методи за пасивно дозиране (20). За предпочитане е да се използва система за изпитване без съразтворител; различните изпитвани химикали обаче ще притежават различни физични и химични свойства, които вероятно ще изискват различни подходи за приготвяне на водата за експозиция на химикали. Следва да се положат всички усилия за избягване на използването на разтворители или носители, защото: 1) някои разтворители сами по себе си могат да доведат до токсичност и/или нежелани или неочаквани отклици, 2) изпитването на химикали над водоразтворимостта им (както често може да се случи при използването на разтворители) може да доведе до неточно определяне на ефективните концентрации, 3) използването на разтворители в по-дългосрочни изпитвания може да доведе до значителна степен на „образуване на биофилм“, свързано с микробна активност, което може да повлияе на условията на околната среда, както и на способността да се поддържат концентрации на експозиция, и 4) липса на данни от предходни периоди, които показват, че разтворителят не оказва влияние върху резултата от изследването, употребата на разтворители изисква третиране на контроли на разтворител, което има последици за хуманното отношение към животните, като се изискват допълнителни животни за провеждане на изпитването. За трудни за изпитване химикали могат да се използват разтворители в краен случай, и за определяне на най-добрия метод следва да бъде консултиран документът на ОИСП с насоки за изпитване за токсичност във водна среда на трудни вещества и смеси (21). Изборът на разтворител се определя чрез химичните свойства на изпитвания химикал и наличието на данни за контроли от предходни периоди относно разтворителя. При липса на данни от предходни периоди пригодността на даден разтворител следва да бъде определена преди

провеждането на крайното изследване. В случай, че употребата на даден разтворител е неизбежна и се извършва микробна активност (образуване на биофилм), препоръчва се записване/отчитане на образуването на биофилм на съд (поне веднъж седмично) по време на цялото изпитване. В идеалния случай концентрацията на разтворителя следва да се поддържа постоянна в контролата на разтворител и всички третирания по изпитването. Ако концентрацията на разтворителя не се поддържа постоянна, в контролата на разтворител следва да се използва най-високата концентрация на разтворителя в третиране при изпитването. В случаите, когато се използва носител на разтворител, максималните концентрации на разтворителя не трябва да надвишават 100 µl/l или 100 mg/l (21) и се препоръчва да се поддържа концентрацията на разтворителя възможно най-ниско (напр. ≤ 20 µl/l), за да се избегне потенциалното въздействие на разтворителя върху измерените крайни точки (22).

Изпитвани животни

Животински вид за изпитването

22. Животинският вид за изпитването е *X. laevis*, тъй като: 1) той се отглежда рутинно в лаборатории по целия свят, 2) лесно може да се получи чрез доставчици от търговската мрежа и 3) може да бъде определен генетичният му пол.

Грижи за полово зрелите индивиди и за размножаването

23. Подходящите грижи за полово зрелите индивиди и за размножаването за *X. laevis* се описват в стандартизирано указание (23). Отглеждането и грижите за *X. laevis* се описват и от Read (24). За предизвикване на размножаването, от три до пет двойки полово зрели женски и мъжки се инжектират интраперитонеално с човешки хорионен гонадотропин (hCG). Женските и мъжките екземпляри се инжектират напр. с приблизително 800—1000 IU и 500 — 800 IU, съответно hCG, разтворен в 0,6 — 0,9 % физиологичен разтвор (или разтвор на Рингер за жаби, изотоничен физиологичен разтвор за използване при земноводни; www.hermes.mbl.edu/biologicalbulletin/compendium/comp-RGR.html). Инжектираните обеми трябва да бъдат около 10 µl/g телесно тегло (~ 1000 µl). След това индуцираните двойки за размножаване се държат в големи съдове, без външно въздействие и при статични условия, за да се насърчи репродуктивното поведение. На дъното на всеки съд за размножаване следва да има лъжливо дъно от мрежа от неръждаема стомана (напр. отвори от 1,25 cm), което да позволява на яйцата да изпаднат на дъното на съда. Жаби, инжектирани с hCG в късния следобед, обикновено полагат повечето от яйцата си до средата на сутринта на следващия ден. След получаването и оплождането на достатъчно количество яйца, полово зрелите индивиди следва да бъдат отстранени от съдовете за размножаване. След това яйцата

се събират, а желатиноподобните пластове се отстраняват с обработка с L-цистеин (23). Трябва да се приготви 2 %-ен разтвор на L-цистеин и рН да се коригира до 8,1 с 1 M NaOH. Този разтвор с температура 21 °C се добавя в ерленмайерова колба от 500 ml, съдържаща яйца от едно снасяне, и се разклаща леко в продължение на една до две минути, след което внимателно се изплаква от 6 до 8 пъти с вода за отглеждане с температура 21 °C. След това яйцата се прехвърлят в блюдото кристализатор и се определя дали са > 70 % жизнеспособни с минимални аномалии в ембрионите с делене на клетките.

ПЛАНИРАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО

Концентрации на изпитване

24. Препоръчва се да се използват най-малко четири концентрации на химикал и подходящи контроли (включително контроли на разтворител, ако е необходимо). Обикновено се препоръчва разделяне на концентрациите (кратност на разделяне), което да не превишава 3,2.
25. За целите на това изпитване, резултатите от съществуващите проучвания на земноводни следва да се използват, доколкото е възможно, при определяне на най-високата концентрация на изпитване, така че да се избегнат концентрации, които са с ясно изразено токсично действие. Информация например от количествени връзки структура-активност, „read across“, данни от съществуващи изследвания за земноводни, като например изследване за метаморфоза на земноводни, метод за изпитване B.38 (25) и изследване на тератогенезата при жабешки ембрион - *Xenopus* (23) и/или изпитвания на риби, като методи за изпитване B.48 , B.41 и B.49 (26) (27) (28), може да допринесе за определянето на тази концентрация. Преди провеждането на LAGDA може да се проведе експеримент за определяне на обхвата. Препоръчва се експозицията при определяне на обхвата да започне в рамките на 24 часа от оплождането и да продължи 7—14 дни (или повече, ако е необходимо), като концентрациите на изпитване се определят така, че интервалите между концентрациите на изпитване да не са по-големи от кратност 10. Резултатите от експеримента за определяне на обхвата следва да служат за определяне на най-високата концентрация на изпитване в LAGDA. Следва да се отбележи, че ако трябва да се използва разтворител, тогава пригодността на разтворителя (т.е. дали може да окаже въздействие върху резултата от изследването) може да се определи като част от изследването за определяне на обхвата.

Повторения в рамките на третираните групи и контролите

26. Следва да се използват най-малко четири съда за повторение за всяка изпитвана концентрация и минимум осем повторения за контролите (и контролата на

разтворител, ако е необходимо) (т.е. броят на повторенията в контролата и всяка контрола на разтворител трябва да бъде два пъти по-голям от броя на повторенията на всяка третирана група, за да се гарантира подходяща статистическа мощност). Всяко повторение следва да съдържа не повече от 20 животни. Минималният брой използвани животни би бил 15 (5 за подпробата от етап 62 от NF и 10 ювенилни екземпляра). Към всяко повторение обаче се добавят допълнителни животни, за да се вземе предвид вероятността от смъртност, като същевременно се запази критичният брой от 15.

ПРОЦЕДУРА

Обобщение на изследването

27. Изследването започва с новоизлюпени ембриони (етап 8—10 по NF) и продължава с развитието на ювенилни екземпляри. Животните се изследват ежедневно за смъртност и признаци за аномално поведение. На етап 62 по NF се събира подпроба от ларви (до 5 животни на повторение) и се изследват различни крайни точки (таблица 1). След като всички животни са достигнали етап 66 по NF, т.е. завършване на метаморфозата (или след 70 дни от започване на изследването, в зависимост от това кое от двете събития настъпи първо), се извършва бракуване на случаен принцип (но без вземане на подпроби), за да се намали броят на животните (10 на съд) (вж. точка 43), а върху останалите животни продължава експозицията до 10 седмици след медианното време до етап 62 по NF в контролата. При приключване на изпитването (пробовземане на ювенилни екземпляри) се извършват допълнителни измервания (таблица 1).

Условия на експозиция

28. В допълнение 3 може да се намери пълно обобщение на условията за изпитванията. По време на периода на експозиция температурата, разтвореният кислород и рН на изпитваните разтвори трябва да се измерват ежедневно. Проводимостта, алкалността и твърдостта се измерват веднъж месечно. По отношение на температурата на водата на изпитвателните разтвори, разликите между повторенията и разликите между третиранията (в рамките на един ден) не трябва да надвишават 1,0 °C. Също така, при рН на разтворите за изпитване разликите между повторенията и между третиранията не трябва да надвишават 0,5.
29. Съдовете за експозиция могат ежедневно да се източват за отстраняване на неконсумираната храна и отпадъчни продукти, като се внимава да се избегне кръстосаното замърсяване на съдовете. Следва да бъдат положени грижи за свеждане до минимум на стреса и травмирането на животните, особено по време на движение, почистване на аквариумите и манипулации. Следва да се избягват стресиращи

условия/дейности, като например силен и/или непрекъснат шум, почукване по аквариумите, вибрации в съда.

Продължителност на експозицията на изпитвания химикал:

30. Експозицията започва с новоизлюпени ембриони (етап 8—10 по NF) и продължава до десет седмици след медианното време до етап 62 по NF (≤ 45 дни след започването на изследването) в контролната група. По принцип продължителността на LAGDA е 16 седмици (максимум 17 седмици) .

Започване на изследването

31. Родителските животни, използвани за започване на изследването, трябва преди това да са показали, че произвеждат поколение, чийто генетичен пол може да бъде определен (допълнение 5). След снасянето на яйцата при полово зрелите индивиди, ембрионите се събират, обработват се с цистеин за отстраняване на желатиноподобното покритие и им се прави скрининг за жизнеспособност (23). Обработването с цистеин позволява боравенето с ембриони по време на скрининга без залепване към повърхности. Скринингът се провежда под стереомикроскоп с дисекция, като се използва капкомер с подходящ размер за отстраняване на нежизнеспособни ембриони. За изпитването се предпочита едно единствено снасяне на яйца, от което да е получена над 70 % жизнеспособност. Ембрионите при етап 8—10 по NF се разпределят на случаен принцип в съдове за третиране чрез експозиция, които съдържат подходящ обем вода за разреждане, като всеки съд съдържа 20 ембриона. По време на това прехвърляне с ембрионите трябва да се борави внимателно, за да се сведе до минимум стресът от боравенето, както и да се избегне каквото и да е увреждане. При 96 часа след оплождането поповите лъжички следва да са се придвижили нагоре във водната колона и да са започнали да се прилепват към стените на съда.

Режим на хранене

32. Промяната на храната и на скоростта на хранене през различните етапи от жизнения цикъл на *X. laevis* е много важен аспект на протокола LAGDA. Прекомерното хранене по време на етапа на ларвите обикновено води до увеличаване на честотата и тежестта на сколиозата (допълнение 8) и следва да се избягва. За разлика от това недостатъчното хранене по време на етапа на ларвите води до значително вариращи темпове на развитие между контролите, което може да изложи на риск статистическата мощност или да доведе до невъзможност за разграничаване на резултатите от изпитването. В допълнение 4 са дадени препоръчителни храни и режими за хранене на ларви и ювенилни екземпляри за *X. laevis* в проточни условия, но са допустими алтернативи, при условие че изпитваните организми растат и се

развиват задоволително. Важно е да се отбележи, че ако се измерват крайни точки, специфични за ендокринната система, храната следва да бъде свободна от ендокринно активни вещества, като например соево брашно.

Хранене на ларви

33. Препоръчаният хранителен режим се състои от стартови храни за пъстърва, дискове от водорасли *Spirulina* и храна за златни рибки (напр. TetraFin[®] люспи, Tetra, Германия), смесени с вода за отглеждане (или за разреждане). Тази смес се дава три пъти дневно в работни дни и веднъж на ден през събота и неделя. Поповите лъжички биват хранени също и с живи науплии от *Artemia* spp. на възраст 24 часа, два пъти дневно в работни дни и веднъж дневно в събота и неделя, като се започне в ден 8 след оплождането. Храненето на ларвите, което следва да бъде последователно във всеки съд за изпитване, следва да дава възможност за подходящ растеж и развитие на изпитваните животни, за да се осигури възпроизводимост и прехвърляемост на резултатите от изследването: 1) медианното време до етап 62 по NF в контролите следва да бъде ≤ 45 дни, и 2) препоръчва се средно тегло в рамките на $1,0 \pm 0,2$ g на етап 62 по NF в контролите.

Хранене на ювенилни екземпляри

34. След приключване на метаморфозата режимът на хранене се състои от първокачествена потъваща храна за жаби, напр. Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, FL, САЩ) (допълнение 4). За млади ювенилни екземпляри пелетите се обработват за кратко в кафемелачка или хомогенизатор, или се натрошават с хаванче и пестик, за да се намали техният размер. След като ювенилните екземпляри са с достатъчно големи размери, за да консумират цели пелети, вече не е необходимо те да се смилат или натрошават. Животните следва да бъдат хранени веднъж дневно. Храненето на ювенилните екземпляри следва да позволява подходящ растеж и развитие на организмите: препоръчва се средно тегло на ювенилните екземпляри в контролите в рамките на $11,5 \pm 3$ g при прекратяване на изпитването.

Аналитична химия

35. Преди започване на изследването следва да се установи стабилността на изпитвания химикал (напр. разтворимост, разградимост и летливост), и всички необходими методи за анализ трябва да се установят, напр. като се използват съществуващата информация или знания. Когато се дозира посредством водата за разреждане, се препоръчва, за да се проверят параметрите на функциониране на системата, преди започване на изпитването да бъдат анализирани разтвори за изпитване от всяка концентрация в съд с повторение. По време на експозицията концентрациите на изпитвания химикал се определят на подходящи интервали, за предпочитане всяка седмица най-малко в едно повторение във всяка третирана група, с ротация всяка

седмица между повторенията от една и съща третирана група. Препоръчва се резултатите да се основават на измерени концентрации. Обаче ако концентрацията на изпитвания химикал в разтвора е поддържана на задоволително ниво в рамките на $\pm 20\%$ от номиналната концентрация по време на изпитването, тогава резултатите могат да се основават или на номиналната, или на измерената стойност. Също така, коефициентът на вариация (CV) на измерените концентрации на изпитвания през целия период на изпитване в рамките на едно третиране трябва да бъде поддържан в рамките на 20 % или по-малко във всяка концентрация. Когато измерените концентрации не остават в рамките на 80 — 120 % от номиналната концентрация (например при изпитване на много биоразградими или силно адсорбиращи се химикали), следва да бъдат определени концентрациите с определено въздействие и те следва да бъдат изразени по отношение на средноаритметичната концентрация за проточни изпитвания.

36. Дебитите на водата за разреждане и на изходния разтвор следва да се проверяват на интервали (напр. три пъти седмично) по време на периода на експозицията. В случай на химикали, които не могат да бъдат открити при някои или всички номинални концентрации (напр. поради бързо разграждане или адсорбция в съдовете за изпитване, или чрез значително натрупване на химикала в телата на подложените на експозиция животни), се препоръчва честотата на обновяване на разтвора за изпитване във всяка камера да бъде адаптирана, така че концентрациите на изпитване да се поддържат възможно най-постоянни.

Наблюдения и измервания на крайни точки

37. Крайните точки, оценявани по време на експозицията, са тези, които са показателни за токсичността, включително смъртност, анормално поведение, като например клинични признаци на заболяване и/или обща токсичност, и определяне на растежа (дължина и тегло), както и крайни точки, свързани с патология, които могат да отговарят както на обща токсичност, така и на ендокринни механизми на действие, насочени към пътища, медиранни от естрогени, андрогени или от щитовидната жлеза. В допълнение, плазмената концентрация на VTG може да се измерва по избор при прекратяване на изследването. Измерването на VTG може да бъде полезно при разбирането на резултатите от изследването в контекста на ендокринните механизми за подозираните химикали, нарушаващи функционирането на ендокринната система. Крайните точки и графикът на измерванията са обобщени в таблица 1 .

Таблица 1: Преглед на крайните точки на LAGDA

Крайни точки*	Дневно	Междинно	Прекратяване на
---------------	--------	----------	-----------------

		пробовземане (Вземане на проби от ларви)	изпитването (Вземане на проби от ювенилни екземпляри)
Смъртност и аномалии	X		
Време до етап 62 по NF		X	
Хисто(пато)логия (щитовидна жлеза)		X	
Морфометрия (увеличение на теглото и дължината)		X	X
Хепато-соматичен индекс (LSI)			X
Отношения генетичен/фенотипен пол			X
Хистопатология (гонади, репродуктивни канали, бъбреци и черен дроб)			X
Вителогенин (VTG) (по избор)			X

* Всички крайни точки се анализират статистически.

Смъртност и ежедневни наблюдения

38. Всички съдове за изпитване следва да се проверяват ежедневно за мъртви животни и смъртността се записва за всеки съд. Мъртвите екземпляри следва да се отстраняват от съда за изпитването незабавно след забелязването им. Етапът на развитие на мъртвите животни следва да се класифицира или като етап преди 58 по NF (преди появата на предните крайници), етап 58 по NF-етап 62 по NF, етап 63 по NF-етап 66 по NF (между етап 62 по NF и пълна резорбция на опашката), или след етап 66 по NF (след етап на ларва). Смъртност, превишаваща 20 %, може да показва неподходящи условия на изпитването или ясно изразени токсични въздействия, предизвикани от изпитвания химикал. По принцип животните са най-чувствителни към събития, свързани със смъртност, различна от тази от химикали, през първите няколко дни от развитието след снасянето на яйца, и по време на метаморфическия климакс. Такава смъртност може да е очевидна от данните от контролите.
39. Освен това следва да се записват всякакви наблюдения на аномално поведение, макроскопски видими малформации (напр. сколиоза) или увреждания. Наблюденията на сколиоза следва да се преброят (честота) и да се степенуват по отношение на тежестта (напр. незабележимо — NR, минимално — 1, умерено — 2, тежко — 3; Допълнение 8). Следва да се положат усилия, за да се гарантира, че честотата на срещане на умерена и тежка сколиоза е ограничена (напр. под 10 % при

контролите) през цялото време на изследването, въпреки че по-голямата честота на срещане на аномалии в контролите не е непременно причина за спиране на изпитването. Нормалното поведение при ларвите се характеризира със суспендиране във водната колона, с опашка, повдигната над главата, редовни ритмични движения на опашния плавник, периодично излизане на повърхността, подвижен оперкулум и реагиране на стимули. Необичайно поведение може да включва например плаване на повърхността, лежане на дъното на съда, обърнато или неправилно плуване, липса на активност по излизане на повърхността и нереагиране на стимули. За животните след метаморфозата, в допълнение към горното аномално поведение, следва да се отчитат макроскопски видимите разлики в консумацията на храна между третираните. Макроскопските малформации и увреждания могат да включват морфологични аномалии (напр. деформации на крайници), хеморагични увреждания, абдоминален оток и бактериални или гъбични инфекции, както и много други. Появата на увреждания по главата на ювенилните екземпляри, непосредствено зад ноздрите, може да указва недостатъчни нива на влажност. Тези определяния са качествени и следва да се считат за близки до клиничните признаци за заболяване/стрес и да се правят в сравнение с индивидите в контролите. Ако честотата на поява е по-голяма в експонираните съдове, отколкото в контролите, тогава те следва да се разглеждат като доказателство за ясно изразена токсичност.

Вземане на подпроби от ларви

Кратко описание на вземането на подпроби от ларви

40. Поповите лъжички, които са достигнали етап 62 по NF, се отстраняват от съдовете и се пробовземат или се преместват към следващата част от експозицията в нов съд, или физически се отделят с разделител от останалите попови лъжички в същия съд. Поповите лъжички се проверяват ежедневно, а денят от изследването, в който отделната попова лъжичка достига ниво 62 по NF, се записва. Определящата характеристика, която се използва при тази оценка, е формата на главата. След като главата е намалела по размер, така че да е визуално приблизително с ширината на трупа на поповите лъжички и на предните крайници на нивото на средата на сърцето, тогава този индивид се отчита като достигнал етап 62 по NF.
41. Целта е да се вземат проби от общо пет попови лъжички на етап 62 по NF на съд с повторение. Това следва да се извършва изцяло на случаен принцип, но да се определя *a priori*. На **фигура 1** е представен хипотетичен пример за съд с повторение. В случай на 20 преживели попови лъжички в конкретен съд, когато първият индивид достигне до етап 62 по NF, от 1 до 20 следва да бъдат избрани пет произволни числа. Попова лъжичка № 1 е първият индивид, достигнал до етап 62 по NF, а попова лъжичка № 20 е последният индивид в даден съд, достигащ до етап 62

по NF. По подобен начин, ако има 18 преживели ларви в даден съд, се избират пет случайни числа от 1 до 18. Това следва да се извърши за всеки съд с повторение, когато първият индивид от изпитването достигне до етап 62 по NF. Ако има смъртност по време на вземането на проби от етап 62 по NF, останалите проби трябва да бъдат повторно рандомизирани въз основа на това колко ларви са останали < етап 62 по NF и още колко проби са необходими, за да се достигне до общо пет проби от това повторение. В деня, когато дадена попова лъжичка достигне до етап 62 по NF, се прави позоваване на изготвената схема за вземане на проби, за да се определи дали този индивид ще се пробовзема или се отделя физически от останалите попови лъжички за продължаваща експозиция. В предоставения пример (фигура 1) първият индивид, който достига етап 62 по NF (т.е. поле № 1), физически се отделя от другите ларви, продължава експозицията, а денят на изследването, на който индивидът е достигнал етап 62 по NF, се записва. Впоследствие индивидите №№ 2 и 3 се обработват по същия начин, както № 1, а след това индивид № 4 се пробовзема за растеж и хистология на щитовидната жлеза (съгласно този пример). Тази процедура продължава до присъединяването на 20-ия индивид към останалата част от индивидите след етап 62 по NF, или до пробовземането му. Използваната процедура с избор на случаен принцип трябва да предоставя равна вероятност за избиране на всеки изпитван организъм. Това може да се постигне чрез използване на произволен метод за случаен подбор, но също така се изисква всяка попова лъжичка да бъде поставена в мрежа в някакъв момент по време на вземането на подпроба от етап 62 по NF.

Фигура 1: Хипотетичен пример за режим за вземане на проби от етап 62 по NF, за един отделен съд с повторение.



42. За вземане на проби на ларви, получените крайни точки са: 1) време до етап 62 по NF (т.е. брой дни между оплождането и етап 62 по NF), 2) външни аномалии, 3) морфометрия (напр. тегло и дължина), и 4) хистология на щитовидната жлеза.

Умъртвяване на попови лъжички по хуманен начин

43. Подпробата от попови лъжички на етап 62 по NF (5 екземпляра на повторение) следва да бъде умъртвена чрез потапяне в продължение на 30 минути в подходящи количества (напр. 500 ml) разтвор за подлагане на анестезия (напр. 0,3 % разтвор от MS-222, трикаинов метансулфонат, CAS 886-86-2). MS-222 разтворът следва да бъде буфериран с натриев бикарбонат до рН приблизително 7,0, тъй като небуферираният MS-222 разтвор е кисел и дразнещ за кожата на жабите, което води до недобра абсорбция и ненужен допълнителен стрес за организмите.
44. Поповата лъжичка се отстранява от опитната камера с използване на мрежесто кепче и се транспортира (поставя се) в разтвора за евтаназия. Животното се умъртвява по правилен начин и е готово за аутопсия, когато не реагира на външни стимули, като прищипване на задния крайник с чифт пинцети.

Морфометрия (тегло и дължина)

45. Измерванията на мокрото тегло (до най-близкия mg) и дължината от върха на муцуната до клоачния отвор (SVL) (с точност до най-близкия 0,1 mm) за всяка попова лъжичка трябва да бъдат направени веднага след като престане да реагира след анестезия (фигура 2а). Може да се използва софтуер за анализ на изображения, за да се измери SVL от снимка. Водата от поповите лъжички трябва да се попие, преди да бъдат претегляни, за да се отстрани излишната полепнала вода. След като се установят мерките на тялото (тегло и SVL), следва да се запишат или отбележат всякакви макроскопски морфологични аномалии и/или клинични признаци на токсичност, като сколиоза (вж. допълнение 8), петехии и кръвоизливи, и се препоръчва документация в цифров вид. Следва да се има предвид, че петехиите са малки червени или лилави кръвоизливи в капилярите на кожата.

Събиране и обработка на тъкани

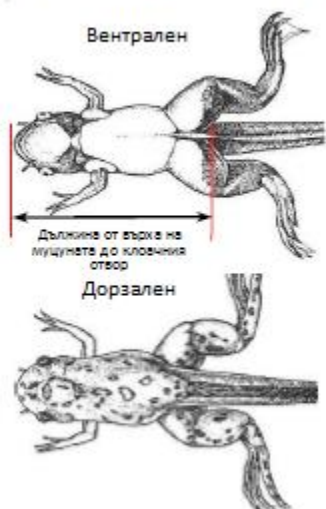
46. За подпробата от ларви щитовидните жлези се оценяват за хистология. Долната част на туловището зад предните крайници се отстранява и се изхвърля. Разрязаният труп се фиксира във фиксатор на Davidson. Обемът на фиксатора в контейнера следва да бъде поне 10 пъти по-голям от приблизителния обем на тъканите. Следва да се извърши подходящо разбъркване или циркулация на фиксатора, за да се фиксират в достатъчна степен представляващите интерес тъкани. Всички тъкани престояват във фиксатор на Davidson в продължение на най-малко 48 часа, но не по-дълго от 96 часа, когато те се изплакват в дейонизирана вода и се съхраняват в 10 % неутрален буфериран формалин (1) (29).

Тиреоидна хистология

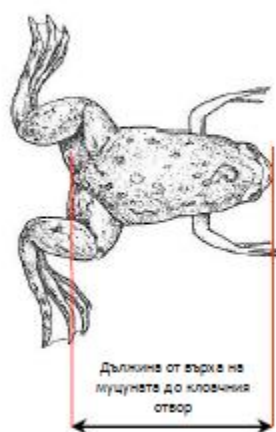
47. Всяка подпробата от ларви (фиксираны тъкани) се подлага на хистологично оценяване за щитовидни жлези, т.е. диагностика и степенуване на тежестта (29) (30).

Фигура 2: Ориентири за измерване на дължина от върха на муцуната до клоачния отвор за LAGDA в етап 62 по NF а) и ювенилни жаби б). Определящите характеристики на етап 62 по NF а): главата е със същата ширина като тази на туловището, както трупа, дължината на обонятелния нерв е по-малка от диаметъра на обонятелната луковица (дорзален изглед), а предните крайници са на нивото на сърцето (вентрален изглед). Изображения, адаптирани от Nieuwkoop and Faber (1994).

а. Вземане на подпроби от ларви (етап 62 по NF)



б. Вземане на проби от ювенилни екземпляри



Край на експозицията на ларвите

48. Като се има предвид първоначалният брой попови лъжички, се очаква, че вероятно ще има малък процент индивиди, които не се развиват нормално и не завършват метаморфозата (етап 66 по NF) в рамките на разумен период от време. Ларвната част на експозицията не трябва да надвишава 70 дни. Всички попови лъжички, оставащи в края на този период, следва да бъдат умъртвени (вж. точка 43), тяхното мокро тегло и SVL следва да бъдат измерени, етапите следва да бъдат определени по Nieuwkoop and Faber, 1994, и всички аномалии в развитието следва да бъдат отбелязани.

Бракуване след етап 66 по NF

49. Десет екземпляра от съд следва да продължат от етап 66 по NF (пълна резорбция на опашката) до прекратяване на експозицията. Поради това, след като всички животни са достигнали етап 66 по NF или след 70 дни (в зависимост от това кое събитие настъпи първо), следва да се извърши бракуване. Животните след етап 66 по NF, които няма да продължат експозицията, следва да се подбират на случаен принцип.

50. Животните, които не са избрани за продължаване на експозицията, се умъртвяват (вж. точка 43). Измерванията на етапа на развитие, мокрото тегло и SVL (фигура 2б) и макроскопската аутопсия се провеждат за всяко животно. Фенотипният пол (въз

основа на гонадната морфология) се отбелязва като женски, мъжки, или неопределен.

Вземане на проби от ювенилни екземпляри

Кратко описание на вземането на проби от ювенилни екземпляри

51. Останалите животни продължават до достигане на 10 седмици след медианното време до етап 62 по NF в контролата на вода за разреждане (и/или контрола на разтворител, ако е приложимо). В края на периода на експозиция останалите животни (максимум 10 жаби на повторение) се умъртвяват и различните крайни точки се измерват/оценяват и записват: 1) морфометрия (тегло и дължина), 2) отношения на генотипен/фенотипен пол, 3) тегло на черния дроб (хепато-соматичен индекс), 4) хистопатология (гонади, репродуктивни канали, черен дроб и бъбреци), и, по избор, 5) плазмен VTG.

Умъртвяване на жаби по хуманен начин

52. Пробите от ювенилни екземпляри, жаби след метаморфозата, се подлагат на евтаназия чрез интраперитонеално инжектиране на разтвор за подлагане на анестезия, напр. 10 % MS-222 в подходящ фосфатно буфериран разтвор. Може да се вземат проби от жаби, след като престанат да реагират (обикновено около 2 min след инжектиране, ако се използва 10% MS-222 с доза от 0,01 ml на g жаба). Въпреки че ювенилните жаби могат да бъдат потапяни в по-висока концентрация на анестетик (MS-222), опитът показва, че за тях е необходимо повече време за да бъдат анестезирани по този метод и продължителността може да не е достатъчна, за да се даде възможност за вземане на проби. Инжекцията осигурява ефикасна и бърза евтаназия преди вземането на проби. Вземането на проби не трябва да започва, докато не бъде потвърдено, че жабите не реагират, за да се гарантира, че животните са умъртвени. Ако жабите показват признаци на значително страдание (много силна болка и смърт може да се предвиди по надежден начин) и се считат за умиращи, животните следва да бъдат подложени на анестезия и умъртвени, и при анализа на данните да бъдат третираны като смъртност. Когато дадена жаба е умъртвена поради заболяемост, това следва да бъде отбелязано и протоколирано. В зависимост от момента, в който жабата се умъртвява по време на изследването, може да се съхрани жабата за хистопатологичен анализ (фиксиране на жабата за възможна хистопатология).

Морфометрия (тегло и дължина)

53. Измерванията на мокрото тегло и SVL (фигура 2б) са идентични с посочените за подпробите на ларви.

Плазмен VTG (по избор)

54. VTG е широко приет биомаркер, който е резултат от експозиция на естрогенни химикали. За LAGDA плазменият VTG може по избор да се измерва в проби от ювенилни екземпляри (това може да е от особено значение, ако се подозира, че изпитваният химикал е естроген).
55. Задните краници на подложените на евтаназия ювенилни екземпляри се изрязват и кръвта се събира с хепаринизирана капилярка (въпреки че могат да бъдат подходящи алтернативни методи за вземане на кръв, като сърдечна пункция). Кръвта се изтласква в микроцентрофужна епруветка (напр. с обем 1,5 ml) и се центрофугира, за да се получи плазма. Пробите от плазма следва да се съхраняват до определяне на VTG при температура -70°C или по-ниска. Концентрацията на VTG в плазмата може да се измерва чрез ензимно-свързан имуносорбентен анализ (метод ELISA) (допълнение 6) или чрез алтернативен метод като маспектрометрия (31). Предпочитат се специфични за вида антитела поради по-голямата чувствителност.

Определяне на генетичния пол

56. Генетичният пол на всяка ювенилна жаба се оценява въз основа на маркерите, разработени от Yoshimoto *et al.* (11). За определяне на генетичния пол една част от (или цял) заден крайник (или друга тъкан), отстранена по време на дисекцията, се събира и съхранява в микроцентрофужна епруветка (тъканни проби от жаби могат да се получават от всички тъкани). Тъканта може да се съхранява при -20°C или по-ниска стойност до изолиране на дезоксирибонуклеинова киселина (ДНК). Изолирането на ДНК от тъканите може да се извършва с налични в търговската мрежа комплекти и анализът за наличие или отсъствие на маркер се извършва чрез полимеразна верижна реакция (PCR метод) (допълнение 5). По принцип съответствието между хистологичния пол и генотипа между животните в контролите във времето на пробовземане на ювенилни екземпляри в контролните групи е повече от 95 % .

Събиране на тъкани и фиксиране за хистопатология

57. Гонадите, репродуктивните канали, бъбреците и черният дроб се събират за хистологичен анализ по време на крайното вземане на проби. Коремната кухина се отваря и се извършва дисекция на черния дроб и той се претегля. След това храносмилателните органи (напр. стомах, черва) внимателно се отстраняват от долната част на корема, за да се разкрият гонадите, бъбреците и репродуктивните канали. Следва да се отбележат всички макроскопски морфологични аномалии в гонадите. И накрая, задните крайници могат да бъдат отстранени, ако преди това не са били отстранени за вземане на кръв. Събраният черен дроб и трупът с гонадите, останали *in situ*, следва незабавно да бъдат поставени във фиксатор на Davidson.

Обемът на фиксатора в контейнера следва да бъде поне 10 пъти по-голям от приблизителния обем на тъканите. Всички тъкани престояват във фиксатор на Davidson в продължение на най-малко 48 часа, но не по-дълго от 96 часа, когато те се изплакват в дейонизирана вода и се съхраняват в 10 % неутрален буфериран формалин (1) (29).

Хистопатология

58. Всяка проба от ювенилни екземпляри се оценява хистологично за патология при гонадите, репродуктивните канали, бъбреците и чернодробната тъкан, т.е. диагностика и степенуване на тежестта (32). Гонадният фенотип също така се получава от тази оценка (напр. яйчници, тестиси, междинен пол), и, заедно с измерванията на индивидуалния генетичен пол, тези наблюдения могат да се използват за изчисляване на отношения на генотипен/фенотипен пол.

ОТЧИТАНЕ НА ДАННИ

Статистически анализ

59. В LAGDA се генерират три типа данни, които трябва да бъдат анализирани от статистическа гледна точка: 1) количествени непрекъснати данни (тегло, SVL, LSI, VTG), 2) данни за време до дадено събитие, свързани със скорости на развитие (т.е. дни до етап 62 по NF от започването на изследването), и 3) ординални данни под формата на степени на тежестта или етапи на развитие от оценките на хистопатологията.
60. Препоръчва се планът на изпитването и изборът на статистически тест да позволяват достатъчна мощност за откриване на промени от биологично значение в крайните точки, за които трябва да се протоколира NOEC или EC₅₀. Предпочита се статистическите анализи на данните (като цяло, на база средни стойности в повторенията) да следват процедурите, описани в документа „Съвременни подходи за статистически анализ на данни за екотоксичност: ръководство за прилагане“ („Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application“) (33). В допълнение 7 към този метод за изпитване се предоставя препоръчителният алгоритъм за вземане на решение за статистически анализ и насоки за обработването на данни и при избора на най-подходящия статистически тест или модел, който да се използва в LAGDA.
61. Данните от вземането на проби от ювенилни животни (напр. растеж, LSI) трябва да се анализират за всеки генотипен пол поотделно, тъй като генотипният пол се определя за всички жаби.

Съображения, свързани с анализа на данните

Използване на изложени на риск повторения и третираня

62. Повторенията и третиранята могат да бъдат изложени на риск поради прекомерна смъртност вследствие на ясно изразена токсичност, заболяване или техническа грешка. Ако дадено третиране е изложено на риск поради заболяване или техническа грешка, следва да са на разположение за анализ три неизложени на риск третираня с три неизложени на риск повторения. Ако се наблюдава ясно изразена токсичност при третирането(ията) с висока доза, за предпочитане е за анализа да са на разположение поне три нива на третиране с три неизложени на риск повторения (в съответствие с подхода за максимална поносима концентрация за насоките за изпитване на ОИСП (34)). В допълнение към смъртността признаците на ясно изразена токсичност могат да включват поведенчески ефекти (плаване на повърхността, лежане на дъното на съда, обърнато или неправилно плуване, липса на активност по излизане на повърхността), морфологични увреждания (напр. хеморагични увреждания, абдоминален оток) или инхибиране на нормални реакции на хранене при сравнение в качествено отношение с животни в контролите.

Контрола на разтворител

63. При приключване на изпитването следва да се направи оценка на възможното въздействие на разтворителя (ако се използва такъв). Това се прави чрез статистическо сравнение на контролната група на разтворител с контролната група на вода за разреждане. Най-относимите крайни точки за разглеждане при този анализ са определящите за растежа фактори (тегло и дължина), тъй като те могат да бъдат засегнати от общите видове токсичност. Ако в тези крайни точки се открият статистически значими разлики между контролните групи на вода за разреждане и контролните групи на разтворител, за да се определи дали валидността на теста е нарушена, следва да се използва най-добрата професионална преценка. Ако двата вида контроли се различават, третираните с експозиция към химикала трябва да бъдат сравнени с контролата на разтворител, освен ако не е известно, че е за предпочитане сравнение с контролата на вода за разреждане. Ако няма статистически значима разлика между двете контролни групи, се препоръчва третиранята с експозиция на изпитвания химикал да се сравнят с обединенията (контролните групи на разтворител и на вода за разреждане), освен ако не е известно, че е за предпочитане сравнението само с контролната група на вода за разреждане или с тази разтворител.

Протокол от изпитването

64. Протоколът от изпитването следва да включва следното:

Изпитван химикал:

- физична природа и, където е относимо, физични и химични свойства;
- Вещество с една съставка:
 - външен вид, разтворимост във вода и допълнителни относими физични и химични свойства;
 - химична идентификация, като например наименование по IUPAC или CAS, CAS номер, код SMILES или InChI, структурна формула, чистота, химична идентичност на онечистванията, доколкото е целесъобразно и практически осъществимо, и т.н. (включително съдържание на органичен въглерод, ако е приложимо).
- Вещество с повече съставки, UVCB и смеси:
 - определени, доколкото е възможно, с химичната си идентичност (вж. по-горе), количествения състав и относимите физични и химични свойства на съставките.

Изпитван вид:

- научно наименование, порода, при наличие, източник и метод на събиране на оплодените яйца и последваща обработка.
- Срещане на сколиоза в контролите от предходни периоди за използваната изходна култура.

Условия на изпитването:

- Продължителност(и) на излагане на светлина;
- План на опита (напр. размер на камерата, материал и обем на водата, брой на камерите за изпитване и повторенията, брой на изпитваните организми на повторение);
- метод за приготвяне на изходния разтвор и честота на обновяване (при използване трябва да се посочат разтворителят и неговата концентрация);
- метод на дозиране на изпитвания химикал (напр. помпи, системи за разреждане);
- коефициентът на аналитичния добив на метода и номиналните концентрации на изпитване, границата на количествено определяне, средните на измерените стойности и техните стандартни отклонения в съдовете за изпитване, методът за получаването им и доказателство, че измерванията се отнасят за концентрациите на изпитвания химикал в истински разтвор;
- характеристики на водата за разреждане: рН, твърдост, температура, концентрация на разтворен кислород, нива на остатъци от хлор (ако са измерени), общо йод, общо

органичен въглерод (ако е измерен), суспендирани твърди частици (ако са измерени), соленост на изпитваната среда (ако е измерена) и всички други направени измервания;

- номиналните концентрации на изпитване, средните на измерените стойности и техните стандартни отклонения;
- качество на водата в съдовете за изпитване, рН, температура (ежедневно) и концентрация на разтворен кислород;
- подробна информация за храненето (например вид на храните, източник, дадено количество и честота).

Резултати:

- Доказателство, че контролите съответстват на критериите за валидност;
 - Данни за контролните (плюс контролата на разтворител, когато се използва) и третираните групи, както следва: наблюдавани смъртност и аномалии, време до етап 62 по NF, оценка на тиреоидната хистология (само проба на ларви), растеж (тегло и дължина), LSI (само за проба с ювенилни екземпляри), отношения генетичен/фенотипен пол (само за проба с ювенилни екземпляри), резултати от хистопатологичната оценка на гонадите, репродуктивните канали, бъбреците и черния дроб (само за проба с ювенилни екземпляри) и плазмен VTG (само за проба с ювенилни екземпляри, ако е правен);
 - Подход за статистическия анализ и обработката на данните (използван статистически тест или модел);
 - концентрация без наблюдавано въздействие (NOEC) за всеки оценен отклик;
 - Най-ниска концентрация, при която се наблюдава ефект (LOEC) за всеки оценен отклик (при $\alpha = 0,05$); ЕСх за всеки оценен отклик, ако е приложимо, и доверителен интервал (напр. 95 %) и графика на изгладения модел, използван за нейното изчисляване, наклон на кривата концентрация-отклик, формула на регресионния модел, очакваните параметри на модела и техните стандартни грешки.
 - Всяко отклонение от метода за изпитване и отклоненията от критериите за приемливост, както и съображения за възможни последствия върху резултата от изпитването.
65. За резултатите от измерванията на крайните точки — средните стойности и техните стандартни отклонения (на основа както повторения, така и концентрации, ако е възможно).

66. Медианното време до етап 62 по NF в контролите следва да се изчисли и представи като средна стойност от медианите в повторенията и тяхното стандартно отклонение. При третиранията, по подобен начин, медианата от третиране следва да се изчисли и представи като средна стойност от медианите в повторенията и тяхното стандартно отклонение.

ЛІТЕРАТУРА

- (1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.
- (2) OECD (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 150) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (3) Nieuwkoop PD and Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.
- (4) Kloas W and Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1130: 16-27.
- (5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. Journal of the Royal Society of Medicine 93: 140-144.
- (6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 237: 1565.
- (7) Villalpando I and Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. International Journal of Developmental Biology 34: 281-285.
- (8) Miyata S, Koike S and Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335-340.
- (9) Mikamo K and Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.
- (10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K and Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143-150.
- (11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T and Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

- (12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S and Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.
- (13) Tobias ML, Tomasson J and Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: 441-448.
- (14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR and Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321-327.
- (15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A and Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159-169.
- (16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, USA.
- (17) Глава В.4 от настоящото приложение, Изпитване за пряка биологична разградимост.
- (18) Глава В.29 от настоящото приложение, Лесна биоразградимост — CO₂ в запечатани съдове (изпитване в свободното пространство над течността).
- (19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL and Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539-551.
- (20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593-9.
- (21) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 23), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

- (23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, USA.
- (24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84 pp.
- (25) Глава В.38 от настоящото приложение, Изследване за метаморфоза на земноводни:
- (26) Глава В.48 от настоящото приложение, Краткосрочно изследване на размножаването при риби.
- (27) Глава В.41 от настоящото приложение, Изпитване за развитие на пола при риби.
- (28) Глава В.49 от настоящото приложение, Изпитване за остра токсичност при рибни ембриони (TPE).
- (29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.
- (31) Luna LG and Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.
- (32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

- (34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. *Aquatic Toxicology* 91(3): 197-202.

Допълнение 1

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Апикална крайна точка: Причиняване на въздействие на равнище популация.

Химикал: Вещество или смес

ELISA: Ензимно-свързан имуносорбентен анализ

ЕСх: (концентрация, при която се наблюдава x % от въздействието) е концентрацията, която причинява x % от дадено въздействие върху изпитвани организми в рамките на даден период на експозиция, при сравнение с контрола. Например ЕС50 е концентрация, за която е направена оценка, че предизвиква дадено въздействие върху изпитвана крайна точка в 50 % от експонираната популация в рамките на определен период на експозиция. Изпитван химикал: всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване.

dpf: Дни след оплождането

Проточно изпитване: Изпитване с постоянен поток на изпитвани разтвори през системата за изпитване по време на периода на експозицията.

XXГ ос: хипоталамус-хипофиза-гонадна ос

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (Международен съюз по чиста и приложна химия).

Най-ниска концентрация, при която се наблюдава ефект (LOEC) е най-ниската изпитвана концентрация на изпитван химикал, при която за химикала се наблюдава статистически значимо въздействие (при $p < 0,05$) в сравнение с контролата. При все това, всички изпитвани концентрации над LOEC следва да имат вредно въздействие, равно или по-голямо от наблюдаваното при LOEC. Когато тези две условия не могат да бъдат удовлетворени, следва да се даде пълно обяснение за това как е била избрана LOEC (и следователно NOEC). В допълнение 7 се предоставят насоки.

Медианна летална концентрация (LC50): е концентрацията на изпитвания химикал, която се счита за летална при 50 % от изпитваните организми в хода на изпитването.

Концентрация без наблюдавано въздействие (NOEC) е изпитваната концентрация непосредствено под LOEC, която при сравнение с контролата няма статистически значимо въздействие (при $p < 0,05$) в рамките на даден период на експозиция.

SMILES: Спецификация за опростено линейно въвеждане на молекули

Изпитван химикал: всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване.

UVCB: Вещества с неизвестен или променлив състав, сложни продукти от реакции или биологични материали.

VTG: вителогенинът е фосфолипогликопротеин, който е прекурсор на белтъците в яйчния жълтък и обикновено се среща в полово активните женски индивиди от всички яйценосни видове.

Допълнение 2**НЯКОИ ХИМИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПРИЕМЛИВА ВОДА ЗА РАЗРЕЖДАНЕ**

Вещество	Гранична концентрация
Твърди частици	5 mg/l
Общ органичен въглерод	2 mg/l
Нейонизиран амоняк	1 µg/l
Остатъчен хлор	10 µg/l
Общо органофосфорни пестициди	50 ng/l
Общо органохлорни пестициди плюс полихлорирани бифенили	50 ng/l
Общ органичен хлор	25 ng/l
Алуминий	1 µg/l
Арсен	1 µg/l
Хром	1 µg/l
Кобалт	1 µg/l
Мед	1 µg/l
Желязо	1 µg/l
Олово	1 µg/l
Никел	1 µg/l
Цинк	1 µg/l
Кадмий	100 ng/l
Живак	100 ng/l
Сребро	100 ng/l

Допълнение 3**УСЛОВИЯ НА ИЗПИТВАНЕ ЗА LAGDA**

1. Животински вид за изпитването	<i>Xenopus laevis</i>
2. Тип изпитване	Непрекъснато проточно,
3. Температура на водата	Номиналната температура е 21 °C. Средната температура по време на изпитването е 21 ± 1 °C (разликите между повторенията и разликите между третиранията не трябва да надвишават 1,0 °C)
4. Качество на осветлението	Флуоресцентни крушки (широк спектър) 600 — 2000 lux (лумени/m ²) на повърхността на водата
5. Период на осветеност:	12 h светлина: 12 h тъмнина
6. Обем на изпитвания разтвор и съд за изпитване	4 — 10 l (минимум 10 — 15 cm дълбочина на водата) съд от стъкло или неръждаема стомана
7. Обменени обеми на изпитвани разтвори	постоянни, като се вземат предвид както поддържането на биологичните условия, така и експозицията на химикала (напр. обновяване на 5 обема на съда на ден);
8. Възраст на изпитваните организми при започване	етап 8 — 10 по Nieuwkoop and Faber (NF)
9. Брой на организмите на повторение	20 животни (ембриони)/съд (повторение) при започване на експозицията и 10 животни (ювенилни екземпляри)/съд (повторение) след етап 66 по NF до прекратяване на експозицията
10. Брой третирания	Най-малко 4 третирания с изпитвания химикал плюс подходяща(и) контрола(и)
11. Броят на повторенията на третиране	4 повторения на третиране за изпитвания химикал и 8 повторения за контрола(и)
12. Брой на организмите на изпитвана концентрация	Най-малко 80 животни на третиране за изпитвания химикал и най-малко 160 повторения за контрола(и)
13. Вода за разреждане	Всяка вода, която позволява нормалния растеж и развитие на <i>X. laevis</i> (напр. изворна вода или филтрувана с активен въглен чешмяна вода)
14. Аериране	Не се изисква, но аериране на съдовете може да се окаже необходимо, ако нивата на разтворения кислород спаднат под препоръчителните граници и увеличаването на потока на

	изпитвания разтвор е до максимална степен.
15. Разтворен кислород в изпитвания разтвор	Разтворен кислород: ≥ 40 % от стойността на насищане при равновесие с атмосферния въздух, или $\geq 3,5$ mg/l
16. pH на изпитвания разтвор	6,5—8,5 (разликите между повторенията и разликите между третиранията не трябва да надвишават 0,5)
17. Твърдост и алкалност на разтвора за изпитване	10-250 mg CaCO ₃ /l
18. Режим на хранене	(виж допълнение 4)
19. Продължителност на експозицията:	От етап 8—10 по NF до десет седмици след медианното време до етап 62 по NF в контролата на вода и/или контролата на разтворител (максимум 17 седмици)
20. Биологични крайни точки	Смъртност (и аномалии във външния вид), време до етап 62 по NF (проба на ларви), оценка на тиреоидната хистология (проба на ларви), растеж (тегло и дължина), хепато-соматичен индекс (проба с ювенилни екземпляри), отношения генетичен/фенотипен пол (проба с ювенилни екземпляри), хистопатология на гонадите, репродуктивните канали, бъбреците и черния дроб (проба с ювенилни екземпляри) и плазмен вителогенин (проба с ювенилни екземпляри, по избор);
21. Критерии за валидност на изпитването	Разтвореният кислород следва да е > 40 % от стойността на насищане при равновесие с атмосферния въздух; Средната температура на водата трябва да бъде в интервала от 21 ± 1 °C, като разликите между повторенията и разликите между третиранията следва да са $< 1,0$ °C; диапазонът на pH на разтвора за изпитване трябва да бъде между 6,5 и 8,5; смъртността при контролите следва да бъде ≤ 20 % във всяко повторение, а средното време до етап 62 на NF при контролите следва да бъде ≤ 45 дни; средното тегло на изпитваните организми на етап 62 по NF и при прекратяването на изследването при контролите и контролите на разтворител (ако се използват такива) следва да достигне съответно $1,0 \pm 0,2$ и $11,5 \pm 3$ g. следва да бъдат на разположение доказателства, че концентрацията на изпитвания химикал в разтвора е била задоволително поддържана в рамките на ± 20 % от усреднените измерени стойности.

Допълнение 4

РЕЖИМ НА ХРАНЕНЕ

Следва да се отбележи, че въпреки че този режим на хранене се препоръчва, допустими са алтернативи, ако изпитваните организми са с подходящи скорости на растеж и на развитие.

Хранене на ларви

Подготовка на хранителен режим за ларви

- А. 1:1 (v/v) стартова храна за пълтърва: водорасли/TetraFin® (или еквивалентен);
1. Стартова храна за пълтърва: смесват се 50 g стартова храна за пълтърва (фини гранули или прах) и 300 ml подходяща филтрувана вода в хомогенизатор за 20 секунди на настройка с висока стойност
 2. смес водорасли/TetraFin® (или еквивалентна): смесват се 12 g дискове от водорасли Spirulina и 500 ml филтрувана вода в хомогенизатор за 40 секунди на настройка с висока стойност, смесват се 12 g Tetrafin® (или еквивалент) с 500 ml филтрувана вода и след това двете се комбинират, за да се получи 1 L от 12 g/l водорасли Spirulina и 12 g/l Tetrafin® (или еквивалент).
 3. Комбинират се равни обеми от смесената стартова храна за пълтърва и сместа водорасли/TetraFin® (или еквивалентна)

Б. Артемии:

15 ml яйца от артемии се излюпват в 1 L солена вода (приготвена чрез добавяне на 20 ml NaCl към 1 L дейонизирана вода). След аериране в продължение на 24 часа при стайна температура и постоянно осветление артемиите се събират. Артемиите се оставят за кратко време за установяване, в продължение на 30 минути, като се спира аерирането. Цистите, които плуват по повърхността на контейнера, се изливат и изхвърлят, и артемиите се изливат през подходящи филтри и се допълват до 30 ml с филтрувана вода.

Протокол за храненето на животните

В таблица 1 се съдържа позоваване на типа и количеството на храната, използвана по време на ларвните стадии на експозицията. Животните следва да бъдат хранени три пъти на ден в дните от понеделник до петък и веднъж на ден през почивните дни.

Таблица 1: Режим на хранене за ларвите на *X. laevis* в проточни условия

Време*	Стартова храна за пълтърва: водорасли/TetraFin® (или еквивалент);	Артемии
--------	--	---------

(след оплождането)	Ден от седмицата (3 пъти на ден)	Почивни дни (веднъж на ден)	Ден от седмицата (два пъти на ден)	Почивни дни (веднъж на ден)
Дни 4-14 (през Седмици 0-1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (от ден 8 до 15)	0,5 ml (от ден 8 до 15)
Седмица 2	0,67 ml	2,4 ml	1 ml (от ден 16)	1 ml (от ден 16)
Седмица 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Седмица 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Седмица 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
Седмица 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Седмица 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Седмици 8-10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

* Ден 0 се определя като денят, в който се извършва инжектирането на hCG.

Преход от хранителен режим на ларви към такъв на ювенилни индивиди

Когато ларвите завършват метаморфозата, те правят преход към формулировка на хранителен режим за ювенилни екземпляри, обяснена по-долу. Докато се извършва този преход, хранителният режим на ларвите следва да се намали, наред с увеличаването на храната за ювенилни екземпляри. Това може да се постигне чрез пропорционално намаляване на храната на ларвите, като същевременно пропорционално се увеличава храната за ювенилни екземпляри когато всяка група от пет попови лъжички прехвърля етап 62 по NF и се доближава до завършването на метаморфозата в етап 66 по NF.

Хранене на ювенилни екземпляри

Хранителен режим за ювенилни екземпляри

След като метаморфозата е приключила (етап 66), режимът на хранене се променя само на 3/32 инча първокачествена потъваща храна за жаби (Xenopus Express™, FL, САЩ), или еквивалентна.

Приготвяне на натрошени пелети за прехода от ларви към ювенилни индивиди

Пелетите потъваща храна за жаби се обработват за кратко в кафемелачка, хомогенизатор, или хаванче и пестик, за да се намали размерът на пелетите с приблизително 1/3. Твърде дългото обработване води до образуване на прах и не се насърчава.

Протокол за храненето на животните

В таблица 2 се съдържа позоваване на типа и количеството на храната, използвана по време на етапите на ювенилни и на полово зрели животни. Животните следва да бъдат хранени веднъж дневно. Следва да се отбележи, че докато животните преминават през метаморфоза, те продължават да получават част от артемиите докато > 95 % от животните завършат метаморфозата.

Животните не трябва да бъдат хранени в деня на приключване на изпитването, за да може храната да не води до объркване при измерването на теглото.

Таблица 2: Режим на хранене за ювенилни индивиди от *X. laevis* в проточни условия. Следва да се отбележи, че животните, които не са завършили метаморфозата, включително тези, чиято метаморфоза е била забавена от третирането с химикал, не могат да консумират несмлени пелети.

Време (Седмици след медианната дата на метаморфозата)	Обем на смлените пелети (mg на жаба)	Обем на целите пелети (mg на жаба)
Докато животните преминават през метаморфозата	25	0
Седмици 0-1	25	28
Седмици 2-3	0	110
Седмици 4-5	0	165
Седмици 6-9	0	220

* Първият ден от седмица 0 е медианната дата на метаморфозата при животните в контролите.

Допълнение 5

ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ГЕНЕТИЧНИЯ ПОЛ

Методът за определяне на генетичния пол на *Xenopus laevis* се основава на Yoshimoto *et al.*, 2008. Подробни процедури по определянето на генотипа могат да бъдат получени от посочената публикация, ако е необходимо. Могат да се използват алтернативни методи (напр. високопроизводителна количествена полимеразна верижна реакция), ако се считат за подходящи.

Праймери при *X. laevis*

DM-W маркер

прав: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

обратен: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Положителна контрола

прав: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

обратен: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Пречистване на ДНК

Пречиства се ДНК от мускулна или кожна тъкан, напр. с комплект Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (cat # 69506) или подобен продукт, в съответствие с инструкциите към комплекта. ДНК може да се елуира от спин колонките, като се използва по-малко буфер за получаване на по-концентрирани проби, ако се счита за необходимо за PCR. Следва да се отбележи, че ДНК е доста стабилна, така че трябва да се вземат мерки за избягване на кръстосано замърсяване, което би могло да доведе до погрешно характеризиране на мъжките като женски животни или обратното.

Полимеразна верижна реакция (PCR)

В таблица 1 е дадено кратко описание на примерен протокол с използване на JumpStart™ *Taq* от Sigma.

Таблица 1: Примерен протокол с използване на JumpStart™ *Taq* от Sigma.

Мастер микс	1x (μl)	[Крайна]
-------------	---------	----------

Вода без нуклеази	11	-
10X буфер	2,0	-
MgCl ₂ (25mM)	2,0	2,5 mM
Дезоксинуклеотидтрифосфати (dNTP) (10mM всеки)	0,4	200 µM
Маркер пр. праймер (8 µM)	0,8	0,3 µM
Маркер обр. праймер (8 µM)	0,8	0,3 µM
Контрола пр. праймер (8 µM)	0,8	0,3 µM
Контрола обр. праймер (8 µM)	0,8	0,3 µM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 единици/µl
ДНК матрица	1,0	~200 pg/µl

Забележка: Забележка: при приготвянето на мастер миксовете пригответе в повече, за да се вземат предвид всякакви загуби, които могат да настъпят при пипетиране (например: 25x следва да се използва само за 24 реакции).

Реакция:

Мастер микс 19,0 µl

Матрица 1,0 µl

Общо 20,0 µl

Профил на амплификатор:

Стъпка 1. 94 °C 1 min

Стъпка 2. 94 °C 30 сек

Стъпка 3. 60 °C 30 сек

Стъпка 4. 72 °C 1 min

Стъпка 5. Преминете към стъпка 2. 35 цикъла

Стъпка 6. 72 °C 1 min

Стъпка 7. 4 °C поддържане

Продуктите от PCR могат да бъдат стартирани незабавно в гел или съхранявани при температура 4 °C.

Електрофореза в агарозен гел (3 %) (примерен протокол)

50X TAE

Трис 24,2 g
 Ледена оцетна киселина 5,71 ml
 Na₂ (EDTA)·2H₂O 3,72 g
 Добавя се вода до 100 ml

1X TAE

H₂O 392 ml
 50X TAE 8 ml

3:1 Агароза

3 части NuSieve™ GTG™ агароза
 1 част агароза на Фишер с ниска електроендоосмоза (ЕЕО)

Метод

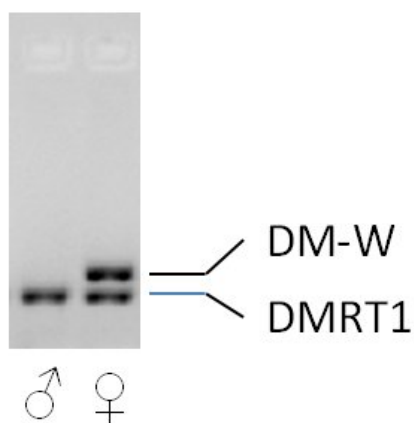
1. Приготвя се 3 % гел, като се добавят 1,2 g агарозен микс до 43 ml 1X TAE. Разклаща се, за да се разделят големи бучки.
2. Агарозната смес се поставя в микровълнова фурна до пълно разтваряне (като се избягва изкипяване). Остава се леко да се охлади.
3. Добавя се 1,0 µL етидиев бромид (10 mg/ml). Колбата се разклаща. Следва да се отбележи, че етидиевият бромид е мутагенен, така че следва, доколкото това е технически възможно, да бъдат използвани алтернативни химикали за тази стъпка, за да се сведат до минимум рисковете за здравето на работниците¹.
4. Сипва се гел във ваничка с гребен. Охлажда се изцяло.
5. Добавя се гел към апарата. Гелът се покрива с 1X TAE.
6. Добавят се 1 µl от 6 x оцветител за разграничаване към всеки 10 µl продукт от PCR.
7. Пробите се поставят с пипета в ямките.

¹ В съответствие с член 4, параграф 1 от Директива 2004/37/ЕО на Европейския парламент и на Съвета от 29 април 2004 г. относно защитата на работниците от рискове, свързани с експозицията на канцерогени или мутагени по време на работа (шеста специална директива по смисъла на член 16, параграф 1 от Директива 89/391/ЕО на Съвета) (ОВ L 158, 30.4.2004 г., стр. 50).

8. Провежда се при 160 волта постоянно напрежение за ~ 20 минути.

На **фигура 1** е показано изображение в агарозен гел, показващо моделите на ивиците, указващи мъжки и женски индивиди .

Фигура 1: Изображение в агарозен гел, показващо модел на ивица, указваща мъжки (♂) индивид (единична ивица ~ 203 bp: DMRT1) и женски (♀) индивид (две ивици при ~ 259 bp: DM-W и 203 bp:DMRT1).



ЛИТЕРАТУРА

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

Допълнение 6

ИЗМЕРВАНЕ НА ВИТЕЛОГЕНИН

Измерването на вителогенин (VTG) се извършва посредством ензимно-свързан имуносорбентен анализ (метод ELISA), който е разработен първоначално за VTG в *Pimephales promelas* (Parks *et al.*, 1999). Понастоящем не съществуват налични в търговската мрежа антитела за *X. laevis*. Въпреки това, като се има предвид изобилието от информация за този белтък, както и наличието на икономически ефективни услуги за производство на антитела за търговски цели, е разумно лабораториите лесно да разработят ELISA за това измерване (Olmstead *et al.*, 2009). Също така, Olmstead *et al.* (2009) дава описание на изследването, изменено за VTG в *X. tropicalis*, както е показано по-долу. Методът използва антитяло срещу VTG от *X. tropicalis*, но е известно, че то е приложимо и за VTG от *X. laevis*. Следва да се отбележи, че могат да се използват и неконкурентни ELISA и че те могат да имат по-ниски граници на откриване в сравнение с метода, описан по-долу.

Материали и реагенти

- Серум с предварително адсорбирано 1-во антитяло (Ab)

Смесва се 1 част серум с анти-*X. tropicalis* VTG 1-во Ab с 2 части плазма от мъжки индивид от контрола и се оставя при СТ за ~ 75 минути, поставя се върху лед за 30 мин, центрофугира се при $> 20 \times G$ за 1 h при 4 °C, отстранява се супернатантът, разделя се на аликвотни части, съхранява се при -20 °C.

- 2-ро антитяло

кози антизаешки IgG, HRP конюгат (напр. Bio-Rad 172-1019)

- VTG стандарт

Пречистен *X. laevis* VTG, 3,3 mg/ml.

- TMB (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) (напр. KPL 50-76-00; или Sigma T0440)
- Нормален кози серум (NGS) (напр. Chemicon® S26-100 ml)
- 96-ямкови EIA полистиренови микротитърни плаки (напр. ICN: 76-381-04, Costar:53590, Fisher:07-200-35)
- фурна за хибридизация на 37 °C (или въздушен инкубатор с бързо еквилибриране) за плаки, водна баня за епруветки
- Друго общо лабораторно оборудване, химикали и консумативи.

Рецепти

Свързващ буфер (50 mM карбонатен буфер, pH 9,6):

NaHCO ₃	1,26 g
Na ₂ CO ₃	0,68 g
вода	428 ml

10x PBS (0,1 M фосфат, 1,5 M NaCl):

NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,83 g
Na ₂ HPO ₄ ·7 H ₂ O	20,1 g
NaCl	71 g
вода	810 ml

Буфер за промиване (PBST):

10X PBS	100 ml
вода	900 ml

Регулира се pH до 7,3 с 1 M HCl, след това се добавят 0,5 ml Tween-20

Буфер за анализ:

Нормален кози серум (NGS)	3,75 ml
Буфер за промиване	146,25 ml

Събиране на проби

Кръвта се събира с хепаринизирана микрокапилярка за хематокрит и се поставя върху лед. След центрофугиране в продължение на 3 минути капилярката се маркира, отваря се, а плазмата се изтласква в 0,6 ml микроцентрофужни епруветки, които съдържат 0,13 единици лиофилизиран апротинин. (тези капилярки се приготвят предварително, като се добавя подходящо количество апротинин, замразява се и се лиофилизира в SpeedVac на ниска стойност за топлината до изсушаване.) Плазмата се съхранява при –80 °C до нейното анализиране.

Процедура за една плака

Покриване на плаката

Смесват се 20 µl пречистен VTG с 22 ml карбонатен буфер (крайна 3 µg/ml). Добавят се 200 µl към всяка ямка от 96-ямковата плака. Плаката се покрива със слепващо фолио и се дава възможност за инкубиране при 37 °C в продължение на 2 часа (или

4 °C за една нощ).

Блокиране на плаката

Блокиращият разтвор се приготвя чрез добавяне на 2 ml нормален кози серум (NGS) към 38 ml карбонатен буфер. Отстранява се свързващият разтвор и се изсушава чрез разклащане. Добавят се към всяка ямка 350 µl от блокиращия разтвор. Покрива се със слепващо фолио и се инкубира при 37 °C в продължение на 2 часа (или при 4 °C за една нощ).

Приготвяне на стандарти

5,8 µl от пречистен VTG стандарт се смесват с 1,5 ml буфер за анализ, в 12 x 75 mm епруветка за еднократна употреба от боросиликатно стъкло. Така се получават 12 760 ng/ml. След това се извършва серийно разреждане, като се добавят 750 µl от предходното разреждане към 750 µl от буфер за анализ за получаване на крайни концентрации 12 760, 6380, 3190, 1595, 798, 399, 199, 100, и 50 ng/ml.

Приготвяне на пробите

Започва се с разреждане 1:300 (напр. комбиниране на 1 µl плазма с 299 µl буфер за анализ) или 1:30 на плазма в буфер за анализ. Ако се очаква значително количество VTG, може да са необходими допълнителни или по-големи разреждания. Опитайте се да запазите B/B₀ в рамките на обхвата на стандартите. За проби без значителен VTG, напр. мъжки и женски от контроли (всички те не са полово зрели), се използва разреждането 1:30. Пробите, разредени до получаване на по-ниска концентрация, могат да покажат нежелани матрични ефекти.

Освен това се препоръчва пускане на проба с положителна контрола на всяка плака. Тя произхожда от обединение на плазма, съдържащо високи нива на VTG. Обединението първоначално се разрежда в NGS, разделя се на аликвотни части и се съхранява при температура –80 C. За всяка плака се размразява една аликвотна част, разрежда се по-нататък в буфер за анализ и се провежда подобно на проба за изпитване.

Инкубиране с 1-во антитяло

Първото Ab се приготвя, като се прави разреждане 1:2000 на серум с предварително адсорбирано 1-во антитяло в буфер за анализ (напр. 8 µl до 16 ml буфер за анализ). Комбинират се 300 µl от разтвор на 1-во Ab с 300 µl проба/стандарт в стъклена епруветка. Епруветката с B₀ се приготвя по сходен начин с 300 µl буфер за анализ и 300 µl антитела. Също така, трябва да бъде приготвена епруветка за определяне на неспецифично свързване (NSB), като се използват само 600 µl буфер за анализ, т.е. без Ab. Епруветките се покриват с Parafilm и се завихрят леко за смесване. Инкубира се на водна баня при 37 °C за 1 час.

Промиване на плаката

Непосредствено преди завършване на инкубирането на 1-то Ab, плаката се промива. Това се извършва чрез отстраняване на съдържанието и избърсване с абсорбираща хартия. След това ямките се запълват с 350 μ l разтвор за промиване, изпразват се и се избърсват. Тук е от полза многоканална пипета „Repeater“ или устройство за промиване на плаки. Стъпката на промиването се повтаря още два пъти за общо три промивания.

Зареждане на плаките

След като плаката е промита, епруветките се отстраняват от водната баня и се завихрят леко. Добавят се 200 μ l от всяка проба, стандарт, V_0 и епруетка за NSB, за да се дублират ямките на плаката. Плаката се покрива със слепващо фолио и се дава възможност за инкубиране при 37 °C в продължение на 1 час.

Инкубиране с 2-то анти тяло

След края на инкубирането от предишната стъпка, плаката трябва отново да се промие три пъти, както по-горе. Разреденото 2-ро Ab се приготвя чрез смесване на 2,5 μ l от 2-то Ab с 50 ml буфер за анализ. Добавят 200 μ l разрежено 2-ро Ab към всяка ямка, запечатва се както по-горе и се инкубира за 1 час при 37 °C.

Добавяне на субстрат

След като инкубирането с 2-рото Ab е завършило, плаката се промива три пъти, както е описано по-горе. След това към всяка ямка се добавят 100 μ l TMB субстрат. Остава се реакцията да протече в продължение на 10 минути, за предпочитане без достъп до ярка светлина. Реакцията се преустановява чрез добавяне на 100 μ l от 1 M фосфорна киселина. Това ще промени цвета от синьо на наситено жълто. Измерва се абсорбцията при 450 nm, като се използва четец на плаки.

Изчислява се B/ V_0

Изважда се средната стойност за NSB от всички измервания. B/ V_0 за всяка проба и стандарт се изчислява, като се раздели стойността на абсорбцията (B) на средната абсорбция на V_0 пробата.

Получане на стандартна крива и определяне на неизвестни стойности

Генерира се стандартна крива с помощта на компютърен софтуер за графики (напр. Slidewrite™ или Sigma Plot®), която ще екстраполира величината от B/ V_0 на пробата въз основа на B/ V_0 на стандартите. Обикновено стойността се нанася върху логаритмична скала и кривата има сигмоидна форма. Въпреки това, тя може да се окаже линейна при използване на ограничен обхват от стандарти. Стойностите на пробите се коригират с коефициент на разреждане и се протоколират като mg VTG/ml

плазма.

Определяне на минимални граници на откриване (МГО)

Често, особено при нормалните мъжки индивиди, няма да е ясно как да се протоколират резултатите от ниски стойности. В тези случаи следва да се използват „доверителните граници“ от 95 %, за да се определи дали стойността трябва да се отчете като нулева или като някаква друга стойност. Ако резултатът от пробата е в рамките на доверителния интервал на нулевия стандарт (B_0), резултатът следва да се протоколира като нула. Минималното ниво на откриване ще е най-ниският стандарт, който последователно се различава от нулевия стандарт; това означава, че двата доверителни интервала не се припокриват. За всеки резултат от проба, който е в рамките на доверителната граница на минималното ниво на откриване или е над него, се протоколира изчислената стойност. Ако пробата попада между нулевия стандарт и минималните нива на откриване, следва половината от минималното ниво на откриване да се протоколира като стойност за тази проба.

ЛИТЕРАТУРА

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 123: 113-125.

Допълнение 7

СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ

В LAGDA се генерират три типа данни, които трябва да бъдат анализирани от статистическа гледна точка: 1) количествени непрекъснати данни, 2) данни за време до дадено събитие, свързани със скорости на развитие (време до етап 62 по NF), и 3) ординални данни под формата на степени на тежестта или етапи на развитие от оценките на хистопатологията. На фигура 1 е показан алгоритъм за вземане на решение за статистически анализ по отношение на LAGDA. Също така по-долу са посочени някои анотации, които може да са необходими за извършване на статистически анализ за измерванията от LAGDA. За алгоритъма за вземане на решение за статистически анализ, резултатите от измерването на смъртността, растежа (тегло и дължина) и хепато-соматичния индекс (LSI) следва да се анализират в съответствие с разклонението „Други крайни точки“.

Непрекъснати данни

Данните за непрекъснати крайни точки трябва първо да се проверяват за монотонност чрез рангова трансформация на данните, изглаждане с ANOVA модел и сравняване на линейни и квадратични контрасти. Ако данните са монотонни, следва да се приложи трендов тест на Йонкхере-Терпстра със стъпка назад върху медианите от повторения и не следва да се прилагат последващи анализи. Алтернатива за данните, които са нормално разпределени с хомогенни дисперсии, е тестът на Уйлямс със стъпка назад. Ако данните не са монотонни (квадратичният контраст е значим, а линейният не е значим), те следва да се анализират чрез модел ANOVA за смесени въздействия. След това данните трябва да бъдат оценени за нормалност (за предпочитане с използване на теста на Шапиро-Уилк или Андерсън-Дарлинг) и за хомогенност на дисперсията (за предпочитане с използване на теста на Левин). И двата теста се извършват върху остатъците от модела ANOVA за смесени въздействия. Вместо тези формализирани тестове за нормалност и хомогенност на дисперсията може да се използва експертна преценка, въпреки че формализираните тестове са за предпочитане. Ако данните са нормално разпределени с хомогенна дисперсия, тогава допусканията от модела ANOVA за смесени въздействия са изпълнени и значимо въздействие от третирането се определя с теста на Дънет. Когато се установи, че липсва нормалност или че има хетерогенност на дисперсията, тогава допусканията при теста на Дънет са нарушени и се търси преобразуване, с което да се постигне нормалност, стабилизиране на дисперсията. Ако не бъде намерено такова преобразуване, тогава значимо въздействие от третирането се определя с тест на Дън. Винаги, когато това е възможно, следва да се извършва едностранен тест, за разлика от двустранен тест, но се изисква експертна преценка, за да се определи кой е подходящ за дадена крайна точка.

Смъртност

Данните за смъртността следва да се анализират за периода от време, обхващащ пълното изпитване, и следва да бъдат изразени като частта, при която е настъпила смърт във всеки отделен съд. Поповите лъжички, които не завършат метаморфозата в дадения период от време, онези попови лъжички, които се намират в кохортата от подпроби от ларви, бракуваните ювенилни жаби и всяко животно, при което смъртта настъпва в резултат от грешка на извършващия опита, следва да се третира като цензурирани данни и да не се включва в знаменателя на процентното изчисление. Преди всички статистически анализи с данните за пропорциите на смъртността следва да се извършва трансформация аркуссинус-корен квадратен. Алтернатива е да се използва тестът на Кокрън-Армитидж със стъпка назад, евентуално с корекция на Рао-Скот в присъствието на свръхдисперсия.

Тегло и дължина (данни за растежа)

Мъжките и женските животни не са с полов диморфизъм по време на метаморфозата, поради което данните за растежа в подпробите с ларви трябва да се анализират независимо от пола. Независимо от това данните за растежа на ювенилните индивиди следва да се анализират отделно въз основа на генетичния пол. За тези крайни точки може да бъде необходима лог-трансформация, тъй като лог-нормалността при данните за размера не е необичайна.

Хепато-соматичен индекс (LSI)

Тегловните стойности на черния дроб следва да бъдат нормализирани като съотношения от цялото телесно тегло (т.е. LSI) и да се анализират отделно въз основа на генетичния пол.

Време до етап 62 по NF

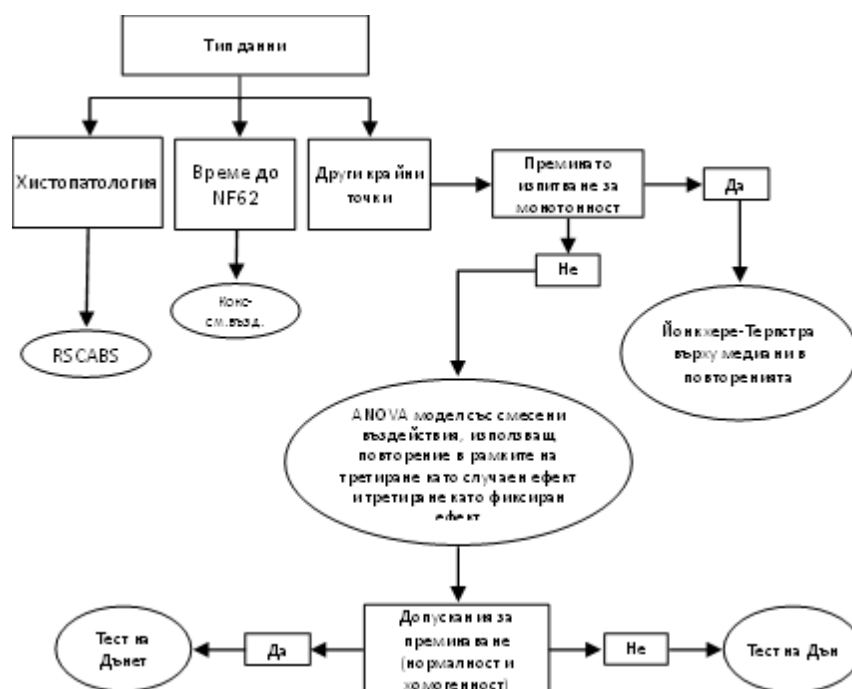
Данните за времето до метаморфозата следва да се обработват като данни за време до дадено събитие, като всяка смъртност или индивиди, които не достигат етап 62 по NF в рамките на 70 дни, се обработват като цензурирани отдясно данни (т.е. истинската стойност е по-голяма от 70 дни, но изследването приключва преди животните да са достигнали етап 62 по NF в рамките на 70 дни). За определяне на датата на прекратяване на изпитването следва да се използва медианното време до етап 62 по NF, приключване на метаморфозата в контролите на вода за разреждане. Медианното време до завършване на метаморфозата може да се определи с методи за оценка на Каплан-Майер. Тази крайна точка следва да се анализира, като се използва модел на Кокс за пропорционалния риск за смесени въздействия, при който се взема предвид структурата на повторенията при изследването.

Хистопатологични данни (балови оценки на степента на тежест и етапи на развитие)

Хистопатологичните данни са под формата на балови оценки на тежестта или етапи на развитие. При теста, наречен „модифициран от Рао-Скот трендов тест на Кокрън-Армитидж със сегментиране“ (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices — RSCABS),

се използва трендовият тест на Кокрѝн-Армитидж със стъпка назад, модифициран от Рао-Скот, по отношение на всяка степен на тежест на хистопатологичния отклик (Green *et al.*, 2014). Корекцията на Рао-Скот включва в теста експерименталната конструкция на съда с повторение. Процедурата „със сегментиране“ („by slices“) включва биологичните очаквания, че тежестта като тенденция се увеличава с увеличаване на дозите или концентрациите, като същевременно запазва индивидуалните балови оценки и разкрива тежестта на всички констатирани въздействия. Процедурата RSCABS не само определя кои третираня са статистически различни от контролите (т.е. имат по-тежка патология, отколкото контролите), но също така определя при каква балова оценка на тежестта се получава разликата, като по този начин се осигурява много необходим контекст за анализа. В случая на определяне на етапа на развитие на гонадите и репродуктивните канали, към данните следва да се приложи допълнителна обработка, тъй като допускането на RSCABS е, че тежестта на въздействието се увеличава с увеличаване на дозата. Наблюдаваното въздействие би могло да бъде забавяне или ускоряване на развитието. Следователно, данните за етапа на развитие следва да се анализират, както са протоколирани, за откриване на ускоряване в развитието, и след това да се обърнат ръчно, преди втория анализ за откриване на забавяне в развитието.

Фигура 1: Алгоритъм за вземане на решение за статистически анализ по отношение на данните от LAGDA.



ЛИТЕРАТУРА

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33, 1108-1116.

Допълнение 8

СЪОБРАЖЕНИЯ ЗА ПРОСЛЕДЯВАНЕ И СВЕЖДАНЕ ДО МИНИМУМ НА ПОЯВАТА НА СКОЛИОЗА

Идиопатичната сколиоза, която обикновено се изразява като „извита опашка“ при попови лъжички *Xenopus laevis*, може да усложни морфологичните и поведенческите наблюдения в изпитваните популации. Следва да се положат усилия, за да се сведат до минимум или да се елиминират случаите на сколиоза както при запасите, така и при условията на изпитване. По време на крайното изпитване се препоръчва честота на срещане на умерена и тежка сколиоза да бъде по-малка от 10 %, за да се повиши доверието, че изпитването може да установи свързани с третирането въздействия върху развитието при иначе здрави ларви на земноводни.

Ежедневните наблюдения по време на крайното изпитване следва да отчитат както срещането (брой индивиди), така и тежестта на сколиозата, когато има такава. Естеството на аномалията следва да бъде описвано по отношение на местоположението (напр. зад или пред клоачния отвор) и посоката на изкривяването (напр. латерално или от дорзалната към вентралната страна). Тежестта може да се оцени със следните балови оценки:

(NR) Не е забележимо: няма налично изкривяване.

(1) Минимално: леко, латерално изкривяване зад клоачния отвор; видимо само в покой

(2) Умерено: латерално изкривяване зад клоачния отвор; видимо по всяко време, но не забавящо движението

(3) Тежко: латерално изкривяване пред клоачния отвор; ИЛИ всяко изкривяване, което забавя движението; ИЛИ всяко изкривяване от дорзалната към вентралната страна

Научна консултативна група към АООС на САЩ по FIFRA (FIFRA SAP 2013) преразглежда обобщените данни за сколиоза в петнадесет изследвания за метаморфоза на земноводни с *X. laevis* (етап 51 до 60+ по NF) и предостави общи препоръки за намаляване на честотата на срещане на тази аномалия в изпитваните популации. Препоръките са относими към LAGDA, въпреки че това изпитване обхваща по-дълъг период за развитие.

Предходни параметри при снасянето на яйца

Като цяло за двойки за размножаване трябва да се използват висококачествени, здрави полово зрели индивиди; елиминирането на двойки за размножение, които

произвеждат потомство със сколиоза, може да сведе до минимум нейното срещане с течение на времето. По-специално, свеждането до минимум на използването на заловени в дивата природа животни за размножаване може да бъде от полза. Периодът на експозиция при LAGDA започва с ембриони в етап 8 до 10 по NF и не е възможно да се определи при самото начало на изпитването дали дадени индивиди ще проявят сколиоза. Поради това следва да се документират, в допълнение към срещането на сколиоза при животните, поставени за изпитване, и параметрите при люпилата за предходни периоди (включително честотата на срещане на сколиоза във всички ларви, които следва да се развиват). Може да е полезно да се проследи допълнително частта от всяко люпило, която не е използвана в дадено проучване, и да се протоколират тези наблюдения (FIFRA SAP 2013).

Качество на водата

Важно е да се осигури достатъчно качество на водата както при лабораторните запаси, така и по време на изпитването. В допълнение към критериите за качество на водата, които рутинно се оценяват при изпитвания за токсичност във водна среда, може да е от полза да се следи и коригира всеки недостиг на хранителни вещества (напр. недостиг на витамин С, калций, фосфор) или прекомерни нива на селен и мед, за които се съобщава, че предизвикват сколиоза в различна степен при лабораторно отглеждани *Rana* sp. и *Xenopus* sp. (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; във вида, в който е протоколирано във FIFRA SAP 2013). Използването на подходящ режим на хранене (вж. допълнение 4) и редовното почистване на съдовете като цяло ще подобри качеството на водата и здравето на изпитваните индивиди.

Хранителен режим

Конкретни препоръки за режим на хранене, за които е установено, че са успешни в LAGDA, са описани подробно в допълнение 4 . Препоръчва се източниците на храна да се изследват за биологични токсини, хербициди и други пестициди, за които е известно, че причиняват сколиоза в *X. laevis* или други водни животни (Schlenk and Jenkins 2013). Например е направена връзка между експозицията на определени инхибитори на холинестеразата и сколиозата при риби (Schultz *et al.* 1985) и жаби (Bacchetta *et al.* 2008).

ЛИТЕРАТУРА

- Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, and G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. *Science of the Total Environment* 392: 110 – 118.
- Schultz, T.W., J.N. Dumont, and R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. *Toxicology* 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley, and J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. Journal of the World Aquaculture Society 13: 322-328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski, and D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. Journal of the World Aquaculture Society 11: 445-453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraiez, and P. Herraiez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. Anatomical Records 233(2): 314-320.

Schlenk, D., and Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. May 21-23, 2013. Washington, DC. “