

Brüssel, 25. veebruar 2019
(OR. en)

6800/19
ADD 2

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

SAATEMÄRKUSED

Saatja:	Euroopa Komisjon
Kättesaamise kuupäev:	22. veebruar 2019
Saaja:	Nõukogu peasekretariaat
Komisjoni dok nr:	Annex to D060575/02
Teema:	LISA järgmise dokumendi juurde: KOMISJONI MÄÄRUS (EL) .../..., XXX, millega muudetakse tehnika arenguga kohandamise eesmärgil määruse (EÜ) nr 440/2008 (millega kehtestatakse katsemeetodid vastavalt Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrusele (EÜ) nr 1907/2006, mis käsitleb kemikaalide registreerimist, hindamist, autoriseerimist ja piiramist (REACH)) lisa

Käesolevaga edastatakse delegatsioonidele dokument Annex to D060575/02.

Lisatud: Annex to D060575/02

B.71. NAHA SENSIBILISEERIMISE *IN VITRO* KATSED, MILLEGA UURITAKSE DENDRIITRAKKUDE AKTIVEERIMISEGA SEOTUD OLULIST ETAPPI NAHA SENSIBILISEERIMISES SEISNEVA KAHJULIKU TOIME RAJAS

ÜLDINE SISSEJUHATUS

Dendriitrakkude aktiveerimisega seotud olulisel etapil põhinev katsemeetod

1. Naha sensibilisaator on aine, mis põhjustab nahaga kokkupuutel allergilise reaktsiooni, nagu on määratletud ÜRO ühtses ülemaailmses kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteemis (ÜRO GHS) (1) ja Euroopa Liidu määruses (EL) 1272/2008, milles käsitletakse ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist (CLP-määrus)¹. Naha sensibiliseerimise oluliste bioloogiliste etappide suhtes on olemas ühisarusaam. Praegused teadmised naha sensibiliseerimisega seotud keemiliste ja bioloogiliste mehhanismide kohta on kokku võetud kahjuliku toime radu käsitleva OECD programmiga hõlmatud asjaomase kahjuliku toime raja käsitluses (2), milles kirjeldatakse nii protsessi käivitavat molekulaarset sündmust, järgnevaid vaheetappe kui ka kahjuliku toime, st allergilise kontaktdermatiidi avaldumist. Kõnealusel juhul on käivitav molekulaarne sündmus (st esimene oluline etapp) elektrofiilsete ainete kovalentne seondumine naha valkude nukleofiilsete tsentritega. Kahjuliku toime raja teine oluline etapp toimub keratinotsüütides ning hõlmab nii põletikureaktsioone kui ka geeniekspressiooni muutusi, mis on seotud selliste konkreetsete signaaliülekanderadadega nagu antioksidatiivse/elekrofiilseoselise reaktsiooni elemendist (ARE) sõltuvad rajad. Kolmas oluline etapp on dendriitrakkude aktiveerimine, mida hinnatakse tavaliselt spetsiifiliste raku pinnamarkerite, kemokiinide ja tsütokiinide ekspressiooni alusel. Neljas oluline etapp on T-rakkude aktiveerimine ja paljunemine, mida hinnatakse kaudselt hiire lokaalsete lümfisõlmede katses (LLNA) (3).
2. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 442E (2017). Selles kirjeldatakse *in vitro* katseid, millega uuritakse naha sensibiliseerimises seisneva kahjuliku toime rajas dendriitrakkude aktiveerimisega seotud olulise etapi puhul kirjeldatud

¹ Euroopa Parlamendi ja nõukogu 16. detsembri 2008. aasta määrus (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006 (ELT L 353/1, 31.12.2008).

mehhanisme (2). Katsemeetodit kasutatakse selleks, et aidata kooskõlas ÜRO GHSi ja CLP-määrusega eristada naha sensibilisaatoreid kemikaalidest, mis nahka ei sensibiliseeri.

Käesolevas katsemeetodis kirjeldatakse järgmisi katseid:

- inimese rakuliini aktiveerimise katse (h-CLAT);
 - rakuliini U937 aktiveerimise katse (U-SENSTM);
 - interleukiin 8 reportergeeni katse (IL-8 lutsiferaasikatse).
3. Käesolev katsemeetod ja OECD vastav katsejuhend võivad erineda andmete ja mõõdetavate näitajate saamiseks kasutatavate menetluste poolest, kuid OECD otsuse kohase andmete vastastikuse tunnustamise raames võib kasutada ükskõik kumba meetodit, et saada asjaomases riigis kehtivate nõuete kohaseid katsetulemusi naha sensibiliseerimises seisneva kahjuliku toime rajas dendriitrakkude aktiveerimisega seotud olulise etapi kohta.

Olulisel etapil põhineva katsemeetodi kohaste katsete taust ja põhimõtted

4. Nahka sensibiliseeriva toime hindamiseks on tavaliselt kasutatud laboriloomi. Merisigade kasutamisel põhinevate klassikaliste meetoditega – merisigadega tehtava Magnussoni ja Kligmani maksimeerimiskatse ja Buehleri katsega (katsemeetod B.6) (4) – uuritakse nii naha sensibiliseerimise induksiooni- kui ka esilekutsumisfaasi. Hiirtega läbi viidavate katsetega – LLNA (katsemeetod B.42) (3) ja selle kahe radioaktiivsest märgisest loobumist võimaldava modifikatsiooniga (LLNA: DA (katsemeetod B.50) (5) ja LLNA: BrdU-ELISA (katsemeetod B.51) (6)) – hinnatakse ainult indutseerivat toimet ja need on samuti heaks kiidetud, sest need on merisigadega tehtavate katsetega võrreldes eelistatud nii loomade heaolu seisukohast kui ka seepärast, et nendega saab naha sensibiliseerimise induksioonifaasi objektiivselt mõõta.
5. Viimasel ajal on kemikaalidest tingitud naha sensibiliseerimise ohu hindamiseks kasutusele võetud mehhanistlikul käsitlusel põhinevad *in chemico* ja *in vitro* katsemeetodid, millega uuritakse naha sensibiliseerimises seisneva kahjuliku toime raja esimest olulist etappi (katsemeetod B.59: otsene reaktsioonivõime katse peptiididega (7)) ja teist olulist etappi (katsemeetod B.60: ARE-Nrf2 lutsiferaasikatse (8)).
6. Käesoleva meetodi kohaste katsetega tehakse kvantitatiivselt kindlaks raku pinnamarkeri(te) (nt CD54, CD86) ekspressiooni muutus monotsüütide ja dendriitrakkude aktiveerimisel pärast kokkupuudet sensibilisaatoritega või dendriitrakkude aktiveerimisega seotud tsütokiini IL-8 ekspressiooni muutus. Naha sensibilisaatorite kohta on teatatud, et need indutseerivad selliste rakumembraani markerite nagu CD40, CD54, CD80, CD83 ja CD86 ekspressiooni, lisaks kutsuvad need esile dendriitrakkude aktiveerimisega seotud

(2), põletikku soodustavate tsütokiinide, näiteks IL-1 β ja TNF- α , ning mitme kemokiini, näiteks IL-8 (CXCL8) ja CCL3 ekspressiooni (9, 10, 11, 12).

7. Ent kuna dendriitrakkude aktiveerimine on ainult üks oluline etapp naha sensibiliseerimises seisneva kahjuliku toime rajas (2, 13), ei pruugi üksnes dendriitrakkude aktiveerimise markerite mõõtmisel põhinevate katsetega kogutud teave olla piisav, et teha järeldusi kemikaali naha sensibiliseeriva toime olemasolu või puudumise kohta. Seepärast ollakse seisukohal, et käesoleva meetodiga saadud andmed võimaldavad toetada naha sensibilisaatorite (st ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt 1. kategooria kemikaalide) eristamist naha mitte sensibiliseerivatest kemikaalidest, kui neid andmeid kasutatakse katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi (edaspidi „ühtne lähenemisviis“) raames koos asjakohase täiendava teabega, näiteks teabega, mis on saadud naha sensibiliseerimises seisneva kahjuliku toime raja teisi olulisi etappe hõlmavate *in vitro* katsetega ning muude mittekatseliste meetoditega, sealhulgas võrdlemisel kemikaali analoogidega (13). On avaldatud näiteid kõnealuste katsetega saadud andmete kasutamisest vastavalt kindlaksmääratud metoodikale, mille puhul on standarditud nii kasutatavate teabeallikate kogum kui ka andmete töötlemise viis prognooside tegemiseks (13), ning neid saab rakendada ühtse lähenemisviisi kasulike osadena.
8. Käesoleva katsemeetodi kohaseid katseid ei saa kasutada eraldiseisvana selleks, et liigitada naha sensibilisaatoreid ÜRO GHSis / CLP-määruses määratletud alamkategooriatesse 1A või 1B ametiasutuste jaoks, kes neid mittekohustuslikke alamkategooriaid kasutavad, ega ka selleks, et prognoosida toime tugevust ohutushindamisega seotud otsuste tegemiseks. Sõltuvalt õigusraamistikust võib kõnealuste meetoditega saadud positiivseid tulemusi siiski kasutada eraldiseisvana kemikaali klassifitseerimiseks ÜRO GHSi / CLP-määruse kohasesse 1. kategooriasse.
9. Käesolevas katsemeetodis kasutatakse mõistet „uuritav kemikaal“ uurimisobjektile viitava mõistena¹ ning see ei ole seotud meetodi sobivusega ühest või mitmest koostisosast koosnevate ainete ja/või segude uurimiseks. Praegu on vähe andmeid meetodi kohaldatavuse kohta mitmest koostisosast koosnevate ainete ja segude puhul (14, 15). Kõnealuste katsete kasutamine mitmest koostisosast koosnevate ainete ja segude uurimiseks on tehniliselt võimalik. Enne katsemeetodi kasutamist selleks, et saada kavandatud regulatiivsel eesmärgil andmeid segu kohta, tuleks siiski kaaluda, kas ja kuidas

¹ 2013. aasta juunis lepidi OECD ühisistungil kokku, et võimalusel korral kasutatakse OECD uutes ja ajakohastatud katsejuhendites mõistet „uuritav kemikaal“ järjekindlamalt uurimisobjektile viitava mõistena.

see meetod võimaldab saada taotletava eesmärgi jaoks vastuvõetavaid tulemusi.¹ Seda ei ole vaja kaaluda, kui asjaomase segu hindamine on regulatiivse nõudega ette nähtud. Peale selle tuleks mitmest koostisosast koosnevate ainete ja segude uurimisel võtta arvesse tsütotoksiliste koostisosade võimalikku segavat mõju vaadeldavatele toimetele.

¹ Selle lause lisamise kohta tehti ettepanek ja selles lepiti kokku katsejuhendite programmi riiklike koordinaatorite töörühma koosolekul 2014. a aprillis.

KIRJANDUS

- (1) Ühinenud Rahvaste Organisatsioon (ÜRO) (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Kuues, täiendatud väljaanne. New York ja Genf: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Kättesaadav aadressil 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. Kättesaadav aadressil [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) Käesoleva lisa peatükk B.42 „Naha sensibiliseerimine: lokaalsete lümfisõlmede katse“. Käesoleva lisa peatükk B.6 „Naha sensibiliseerimine“.
- (4) Käesoleva lisa peatükk B.50 „Naha sensibiliseerimine: lokaalsete lümfisõlmede katse: DA“.
- (5) Käesoleva lisa peatükk B.51 „Naha sensibiliseerimine: lokaalsete lümfisõlmede katse: BrdU-ELISA“.
- (6) Käesoleva lisa peatükk B.59 „Naha sensibiliseerimine *in chemico*: otsene reaktsioonivõime katse peptiididega (*direct peptide reactivity assay*, DPRA)“.
- (7) Käesoleva lisa peatükk B.60 „Naha sensibiliseerimine *in vitro*: ARE-Nrf2 lutsiferaasi katsemeetod“.
- (8) Steinman, R. M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9: 271–296.
- (9) Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Azuma, M., Okumura, K., Lanier, L. L., ja 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: 1841–1847.
- (10) Aiba, S., Terunuma, A., Manome, H., ja 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: 3031–3038.
- (11) Aiba, S., Manome, H., Nakagawa, S., Mollah, Z. U., Mizuashi, M., Ohtani, T., Yoshino, Y., ja 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: 390–398.

- (12) OECD (2016). Series on Testing and 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](#). Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis. Kättesaadav aadressil <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., ja 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., ja 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.

1. liide

NAHA SENSIBILISEERIMINE *IN VITRO*: INIMESE RAKULIINI AKTIVEERIMISE KATSE (H-CLAT)

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

1. Inimese rakuliini aktiveerimise katses tehakse inimese monotsüütse leukeemia rakuliinis THP-1 kindlaks monotsüütide ja dendriitrakkude aktiveerimisega seotud raku pinnamarkerite (CD86 ja CD54) ekspressiooni kvantitatiivsed muutused pärast kokkupuudet sensibilisaatoriga (1, 2). Seejärel kasutatakse raku pinnamarkerite CD86 ja CD54 ekspressiooni mõõdetud taset toetava teabena, mis aitab eristada naha sensibilisaatoreid kemikaalidest, mis nahka ei sensibiliseeri.
2. h-CLATd on hinnatud loomkatsete alternatiivide Euroopa Liidu referentlabori (EURL ECVAM) koordineeritud valideerimisuuringus ning seejärel on selle sõltumatult läbi vaadanud EURL ECVAMi teaduslik nõuandekomitee. Võttes arvesse kõiki kättesaadavaid andmeid ning reguleerivate asutuste ja sidusrühmade seisukohti, soovitas EURL ECVAM kasutada h-CLATd (3) ühtse lähenemisviisi osana, et aidata ohu alusel klassifitseerimise ja märgistamise eesmärgil eristada naha sensibilisaatoreid kemikaalidest, mis nahka ei sensibiliseeri. Näited h-CLATga saadud andmete kasutamisest muu teabega kombineerituna on avaldatud kirjanduses (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11).
3. h-CLAT on osutunud rakendatavaks laborites, kus on olemas rakukultuurimeetodite kasutamise ja läbivoolutsütomeetrilise analüüsi kogemus. Selle meetodi puhul eeldatav prognooside reprodutseeritavuse määr on nii laborisisese kui ka laboritevahelise reprodutseeritavuse puhul ligikaudu 80 % (3, 12). Valideerimisuuringust (13) ja muudest avaldatud uuringutulemustest (14) nähtub üldiselt, et LLNA tulemustega võrreldes on selles katses naha sensibilisaatorite (st ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt 1. kategooria kemikaalide) mittesensibiliseerivatest kemikaalidest eristamise täpsus 85 % (N = 142), tundlikkus 93 % (94/101) ja spetsiifilisus 66 % (27/41) (vastavalt EURL ECVAMi kordusanalüüsile (12), milles võeti arvesse kõiki olemasolevaid andmeid ning vastavalt punktis 4 esitatud kirjeldusele jäeti arvestamata negatiivsed tulemused selliste kemikaalide puhul, mille log K_{ow} on suurem kui 3,5). h-CLAT kohaste valenegatiivsete prognooside tõenäosus on suurem vähesel määral kuni mõõdukalt nahka sensibiliseerivate (st ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt alamkategooria 1B) kemikaalide puhul ja väiksem siis, kui tegemist on tugevalt nahka sensibiliseeriva (st ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt alamkategooria 1A) kemikaaliga (4, 13, 15). Kokkuvõttes nähtub sellest teabest, et h-CLAT on kasulik meetod, mis aitab kindlaks teha naha sensibiliseerimise ohtu. Ainsa meetodina kasutatava h-CLATga saavutatav eespool nimetatud täpsus on siiski üksnes

orienteeriv, sest katseandmeid tuleks vaadelda ühtse lähenemisviisi kontekstis koos muudest allikatest pärit teabega ja kooskõlas üldise sissejuhatuse punktide 7 ja 8 sätetega. Kui hinnatakse naha sensibiliseerimise katsemeetodeid, mille puhul ei kasutata katseloomi, tuleb lisaks arvesse võtta, et LLNA ja muude loomkatsete tulemused ei pruugi täielikult kajastada kemikaali toimet inimesele.

4. Praeguse olemasoleva teabe põhjal on tõendatud, et h-CLAT on kohaldatav paljude uuritavate kemikaalide puhul, mis erinevad üksteisest orgaanilise funktsionaalrühma, toimemehhanismi, *in vivo* katsetega määratud nahka sensibiliseeriva toime tugevuse ja füüsikalise-keemiliste omaduste poolest (3, 14, 15). h-CLAT on kohaldatav uuritavate kemikaalide puhul, mis on sobivas lahustis/kandeaines lahustuvad või moodustavad selles püsiva dispersiooni (st kolloidlahuse või suspensiooni, milles uuritav kemikaal ei sadestu ega eraldu lahustist/kandeainest eri faasi) (vt punkt 14). Kui uuritava kemikaali log K_{ow} on suurem kui 3,5, saadakse sageli valenegatiivsed tulemused (14). Seepärast tuleks uuritavate kemikaalide puhul, mille log K_{ow} on suurem kui 3,5, jätta negatiivsed tulemused arvesse võtmata. Kui uuritava kemikaali log K_{ow} on üle 3,5, võib saadud positiivseid tulemusi sellegipoolest kasutada uuritava kemikaali naha sensibilisaatoriks liigitamise toetamiseks. Peale selle võidakse kasutatud rakuliini piiratud metaboliseerimisvõime (16) või katsetingimuste tõttu saada h-CLATga negatiivseid tulemusi ka prohapteeni (st ained, mis vajavad ensümaatilist aktiveerimist, nt P450 ensüümide abil) ja prehapteeni (st ained, mis aktiveeruvad oksüdeerumisel) puhul, eelkõige aeglaselt oksüdeeruvad ainete puhul (15). h-CLAT võimaldab hinnata ka fluorestseeruvaid uuritavaid kemikaale (17), kuid tugevalt fluorestseeruvad uuritavad kemikaalid, mille kiiritava kiirguse lainepikkus on sama kui fluorestseiniisotiotsüanaadil (FITC) või propiidiidumjodiidil (PI), segavad läbivoolutsütomeetrilist analüüsi ning neid ei ole võimalik FITCga konjugeeritud antikehade või PI abil õigesti hinnata. Sellisel juhul võib kasutada vastavalt muu fluorokroomiga märgistatud antikehasid või muud tsütotoksilisuse markerit, kui näiteks katsetega, mis tehakse liites 1.2 loetletud pädevusainetega, on võimalik tõendada, et sellise fluorokroomi või markeriga saadakse samasugused tulemused kui FITCga märgistatud antikehade (vt punkt 24) või PIga (vt punkt 18). Eespool kirjeldatust lähtuvalt tuleks negatiivseid tulemusi tõlgendada kõnealuste piirangute kontekstis ja koos ühtse lähenemisviisi raames muudest allikatest saadud teabega. Kui leidub andmeid, mille kohaselt h-CLATd ei saa kasutada mõne muu konkreetse uuritavate kemikaalide rühma puhul, ei tohiks seda asjaomase konkreetse kemikaalirühma puhul kasutada.
5. Nagu eespool kirjeldatud, aitab h-CLAT eristada naha sensibilisaatoreid kemikaalidest, mis nahka ei sensibiliseeri. Ent kui seda kasutatakse näiteks katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi raames, võib see aidata hinnata ka sensibiliseeriva toime tugevust (4, 5, 9). Võimalust kasutada h-CLATga saadud tulemusi toime tugevuse

hindamisel on siiski vaja täiendavalt uurida, soovitatavalt inimuuringutest saadud andmete alusel.

6. Mõisted on esitatud liites 1.1.

KATSE PÕHIMÕTE

7. h-CLAT on *in vitro* meetod, millega määratakse kvantitatiivselt raku pinnamarkerite (CD86 ja CD54) ekspressiooni muutusi inimese monotsüütse leukeemia rakuliini THP-1 rakkudes pärast 24-tunnist kokkupuudet uuritava kemikaaliga. Kõnealused pinnamolekulid on monotsüütse THP-1 tüüpilised markerid ja võivad võimaldada jälgendada dendriitrakkude aktiveerimist, millel on väga oluline roll T-rakkude aktivatsioonis. Pinnamarkerite ekspressiooni muutusi mõõdetakse läbivoolutsütomeetriliselt pärast rakkude värvimist fluorokroomiga märgistatud antikehadega. Samal ajal mõõdetakse ka tsütotoksilisust, et hinnata, kas pinnamarkerite ekspressiooni suurenemine toimub kontsentratsioonil, mille juures ei täheldata tsütotoksilisust. Arvutatakse pinnamarkerite fluorestsentssignaali suhteline tugevus lahustiga/kandeainega kontrolli näitajatega võrrelduna ja seda tulemust kasutatakse prognoosimudelil (vt punkt 26), et aidata eristada naha sensibilisaatoreid kemikaalidest, mis nahka ei sensibiliseeri.

PÄDEVUSE TÕENDAMINE

8. Enne katsemeetodi B.71 juurde kuuluvas käesolevas liites kirjeldatud meetodi rutiinset kasutamist tuleks tõendada labori tehnilist pädevust ning kasutada selleks liites 1.2 loetletud kümmet pädevusainet. Lisaks peaksid meetodi kasutajad haldama reageerimisvõime kontrollimise käigus kogutud andmeid (vt punkt 11) ning positiivsete ja lahustiga/kandeainega kontrollidega saadud varasemaid andmeid (vt punktid 20–22) sisaldavat andmebaasi ning kontrollima nende andmete põhjal, kas katsetulemused on laboris aja möödudes jätkuvalt reprodutseeritavad.

KATSE KÄIK

9. Käesolev meetod põhineb loomkatsetele alternatiivsete meetodite andmebaasi (DataBase on ALternative Methods, DB-ALM) teenusena kättesaadaval h-CLATd käsitleval katse-eeskirjal nr 158 (18), mis vastab EURL ECVAMi koordineeritud valideerimisuuringus kasutatud katse-eeskirjale. Seda katse-eeskirja soovitatakse kasutada laboris h-CLAT juurutamisel ja rakendamisel. Allpool kirjeldatakse h-CLAT põhikomponente ja katse käiku, mis koosneb kahest etapist: *annuse kindlaksmääramise katsest ja CD86/CD54 ekspressiooni mõõtmisest*.

Rakkude ettevalmistamine

10. h-CLAT puhul tuleks kasutada inimese monotsüütse leukeemia rakuliini THP-1. Soovitatavalt tuleks rakud (TIB-202™) soetada usaldusväärsest rakupangast, näiteks Ameerika Tüüp kultuuride Kollektsoonist (American Type Culture Collection).
11. THP-1 rakke kasvatatakse 37 °C juures reguleeritud õhuniiskusega 5-protsendilise CO₂-sisaldusega atmosfääris söötmes RPMI-1640, mis sisaldab 10 % veiselooteseerumit, 2-merkaptotetanooli kontsentratsioonis 0,05 mM, 100 ühikut penitsilliini milliliitri kohta ja streptomütsiini kontsentratsioonis 100 µg/ml. Penitsilliini ja streptomütsiini kasutamisest söötmes võib loobuda. Sel juhul peavad kasutajad siiski kontrollima, et antibiootikumide puudumine söötimest ei mõjuta tulemusi. Näiteks võib selleks teha katseid liites 1.2 loetletud pädevusainetega. Igal juhul tuleb saastumisohu vähendamiseks järgida rakukultuuridega töötamise head tava olenemata sellest, kas rakukultuuri sööde sisaldab antibiootikume või mitte. THP-1 rakke külvatakse regulaarselt iga 2–3 päeva järel ümber algtihedusega $0,1\text{--}0,2 \times 10^6$ rakku/ml. Kultuure tuleb säilitada tihedusvahemikus $0,1\text{--}1,0 \times 10^6$ rakku/ml. Enne rakkude kasutamist katses tuleb teha reageerimisvõime kontroll, et veenduda rakkude sobivuses. Rakkude reageerimisvõime kontroll tuleks teha kaks nädalat pärast sulatamist ning kasutada selleks positiivse kontrollina 2,4-dinitroklorobenseeni (DNCB) (CASi nr: 97-00-7; puhtus $\geq 99\%$) ja nikkelsulfaati (NiSO₄) (CASi nr: 10101-97-0; puhtus $\geq 99\%$) ning negatiivse kontrollina piimhapet (CASi nr: 50-21-5; puhtus $\geq 85\%$). Nii DNCB kui ka NiSO₄ peaksid esile kutsuma raku pinnamarkerite CD86 ja CD54 alusel tuvastatava positiivse reaktsiooni, piimhape aga negatiivse reaktsiooni. Katses võib kasutada ainult reageerimisvõime kontrolli läbinud rakke. Rakke võib paljundada kuni kahe kuu jooksul pärast sulatamist. Passaazide arv ei tohiks ületada 30. Reageerimisvõime kontroll tuleb teha vastavalt punktides 20–24 esitatud kirjeldusele.
12. Katses kasutamiseks külvatakse THP-1 rakud välja tihedusega $0,1 \times 10^6$ rakku/ml või $0,2 \times 10^6$ rakku/ml ning eelkasvatatakse neid rakukultuuripudelis vastavalt 72 või 48 tundi. Rakkude tihedus rakukultuuripudelis peaks vahetult pärast eelkasvatamise perioodi lõppu olema igas katses võimalikult sarnane (selle saavutamiseks kasutatakse ühte kahest eespool kirjeldatud eelkasvatamise tingimusest), sest rakkude tihedus pudelis vahetult pärast eelkasvatamist võib mõjutada allergeenide indutseeritavat CD86/CD54 ekspressiooni (19). Katse päeval eemaldatakse rakud rakukultuuripudelist ja suspendeeritakse uuesti värskes söötmes tihedusel 2×10^6 rakku/ml. Seejärel jaotatakse rakud 500 µl kaupa 24-kannulise lamedapõhjalise plaadi kannudesse (1×10^6 rakku kannu kohta) või 80 µl kaupa 96-kannulise lamedapõhjalise plaadi kannudesse ($1,6 \times 10^5$ rakku kannu kohta).

Annuse kindlaksmääramise katse

13. *Annuse kindlaksmääramise katse* eesmärk on leida CV75 väärtus ehk uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures rakkude eluvõimelisus on 75 % lahustiga/kandeainega

kontrolli puhul täheldatud väärtusest. CV75 väärtuse põhjal tehakse kindlaks *CD86/CD54* ekspressiooni mõõtmisel (vt punktid 20–24) kasutatav uuritava kemikaali kontsentratsioon.

Uuritavate kemikaalide ja kontrollainete ettevalmistamine

14. Uuritavad kemikaalid ja kontrollained valmistatakse ette katse tegemise päeval. h-CLAT puhul tehakse uuritavatest kemikaalidest lahus või püsiv dispersioon (vt ka punkt 4); lahustina/kandeainena kasutatakse eelistatavalt füsioloogilist lahust või söödet või kui uuritav kemikaal ei ole nendes lahustuv või ei moodusta neis püsivat dispersiooni, siis dimetüülsulfoksiidi (DMSO, puhtusega $\geq 99\%$). Kemikaali lõppkontsentratsioon peab olema 100 mg/ml (füsioloogilises lahuses või söötmes) või 500 mg/ml (DMSOs). Kui see on teaduslikult piisavalt põhjendatud, võib kasutada ka eespool nimetatutest erinevat lahustit/kandeainet. Arvesse tuleks võtta uuritava kemikaali püsivust lahustis/kandeaines lõppkontsentratsioonil.
15. Uuritava kemikaali põhilahust kontsentratsiooniga 100 mg/ml (füsioloogilises lahuses või söötmes) või 500 mg/ml (DMSOs) lahjendatakse järgmiselt.
 - Lahustina/kandeainena füsioloogilise lahuse või söötme kasutamisel: asjaomase lahustiga/kandeainega valmistatakse kahekordsete lahjenduste reana kaheksa eri kontsentratsiooniga põhilahust. Seejärel lahjendatakse neid põhilahuseid söötmes veel 50 korda (töölahused). Kui plaadil kasutataval suurimal lõppkontsentratsioonil 1000 µg/ml ei täheldata mürgisust, tuleks maksimaalne kontsentratsioon uue tsütotoksilisuse katsega uuesti kindlaks määrata. Füsioloogilises lahuses või söötmes lahustatud või püsiva dispersiooni moodustanud uuritava kemikaali lõppkontsentratsioon plaadil ei tohiks ületada 5000 µg/ml.
 - Lahustina/kandeainena DMSO kasutamisel: asjaomase lahustiga/kandeainega valmistatakse kahekordsete lahjenduste reana kaheksa eri kontsentratsiooniga põhilahust. Seejärel lahjendatakse neid põhilahuseid söötmes veel 250 korda (töölahused). Lõppkontsentratsioon plaadil ei tohiks ületada 1000 µg/ml, isegi kui sellel kontsentratsioonil ei täheldata mürgisust.

Seejärel kasutatakse töölahuseid kokkupuutekatses: plaadil olevale THP-1 rakkude suspensioonile lisatakse võrdne kogus töölahust (vt ka punkt 17), et saavutada täiendav kahekordne lahjendus (tavaliselt on lõppkontsentratsioonide vahemik plaadil 7,81–1000 µg/ml).
16. h-CLAT puhul kontrollina kasutatav lahusti/kandeaine on sööde (kui uuritavast kemikaalist tehakse lahus või püsiv dispersioon (vt punkt 4) söötmes või füsioloogilises lahuses) või DMSO (kui uuritavast kemikaalist tehakse lahus või püsiv dispersioon DMSOs), mida kasutatakse plaadil ühes lõppkontsentratsioonis 0,2 %. Seda lahjendatakse samal viisil, nagu on kirjeldatud töölahuste saamist käsitlevas punktis 15.

Uuritavate kemikaalide ja kontrollainetega töötlemine

17. Punktides 15 ja 16 kirjeldatud sööde ja töölahused segatakse 24- või 96-kannulisele lamedapõhjalisele plaadile kantud rakususpensiooniga (vt punkt 12) mahuvahekorras 1:1. Seejärel inkubeeritakse töödeldud plaate 37 °C juures 5-protsendilise CO₂-sisaldusega atmosfääris 24 ± 0,5 tundi. Tuleb jälgida, et lenduvad uuritavad kemikaalid ei aurustuks, ning hoida ära kannudevahelist uuritava kemikaaliga ristsaastumist. Selleks võib plaadi enne uuritava kemikaaliga inkubeerimist näiteks tihedalt kinni katta (20).

Propiidiumjodiidiga (PI) värvimine

18. Pärast 24 ± 0,5 tundi kestnud kokkupuudet viiakse rakud katsutitesse ja eraldatakse tsentrifuugimise teel. Supernatant visatakse ära ja allesjäänud rakud suspendeeritakse uuesti 200 (96-kannulise plaadi puhul) või 600 (24-kannulise plaadi puhul) mikrolitris fosfaadiga puhverdatud soolalahuses, mis sisaldab 0,1 % veise seerumi albumiini (värvimispuhver). 200 µl rakususpensiooni viiakse üle 96-kannulisele ümarapõhjalisele plaadile (96-kannulise plaadi puhul) või mikrokatsutisse (24-kannulise plaadi puhul) ning rakke pestakse kaks korda 200 µl (96-kannulise plaadi puhul) või 600 µl (24-kannulise plaadi puhul) värvimispuhvriga. Lõpuks suspendeeritakse rakud uuesti värvimispuhvrisk (nt 400 µl) ning lisatakse PI lahus (nt 20 µl; PI lõppkontsentratsioon võib olla näiteks 0,625 µg/ml). Võib kasutada ka muid tsütotoksilisuse markereid, näiteks 7-aminoaktinomütsiini D-d (7-AAD) või trüpaansinist, kui näiteks katsetega, mis tehakse liites 1.2 loetletud pädevusainetega, on võimalik tõendada, et asjaomase muu värvainega ja PIga saadavad tulemused on sarnased.

Tsütotoksilisuse mõõtmine läbivoolutsütomeetriga ja CV75 väärtuse hindamine

19. PI sisenemist rakkudesse analüüsitakse läbivoolutsütomeetriga; seejuures kasutatakse registreerimiskanalit FL3. Kokku registreeritakse 10 000 elusat (PIga värvumata) rakku. Tsütomeetri analüüsiprogrammi abil rakkude eluvõimelisuse arvutamiseks võib kasutada allpool esitatud valemit. Kui rakkude eluvõimelisus on väike, tuleks registreerida koos surnud rakkudega kokku kuni 30 000 rakku. Teine võimalus on registreerida andmeid ühe minuti jooksul alates analüüsi alustamise hetkest.

$$\text{Rakkude eluvõimelisus} = \frac{\text{elusate rakkude arv}}{\text{registreeritud rakkude üldarv}} \times 100$$

CV75 väärtus (vt punkt 13) ehk kontsentratsioon, mille juures elusate THP-1 rakkude osakaal on 75 % (tsütotoksilisus on 25 %), arvutatakse log-lineaarse interpolatsiooni teel järgmise valemiga:

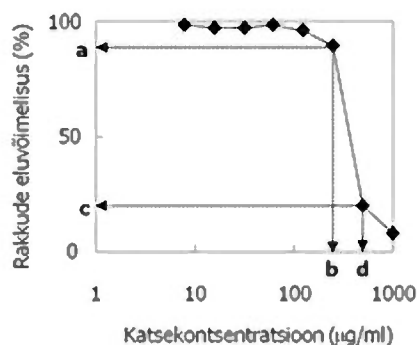
$$\log CV75 = \frac{(75-c) \times \log(b) - (75-a) \times \log(d)}{a-c},$$

kus

a on rakkude eluvõimelisuse vähim väärtus, mis ületab 75 %,

c on rakkude eluvõimelisuse suurim väärtus, mis jääb alla 75 %, ning

b ja d on kontsentratsioonid, mille juures rakkude eluvõimelisus on vastavalt a või c.



CV75 leidmiseks on lubatud kasutada ka muid meetodeid, kui on tõendatud (näiteks katsetega, mis on tehtud pädevusainetega), et see ei mõjuta tulemusi.

CD86/CD54 ekspressiooni mõõtmine

Uuritavate kemikaalide ja kontrollainete ettevalmistamine

20. Uuritava kemikaali lahuse või püsiva dispersiooni valmistamiseks kasutatakse sobivat lahustit/kandeainet (füsioloogiline lahus, sööde või DMSO; vt punkt 14). Kõigepealt lahjendatakse uuritavat kemikaali kontsentratsioonini, mis on 100 korda (füsioloogilise lahuse või söötme puhul) või 500 korda (DMSO puhul) suurem kui $1,2 \times CV75$, mis on kindlaks tehtud *annuse kindlaksmääramise katsega* (vt punkt 19). Kui CV75 väärtust ei ole võimalik kindlaks teha (nt *annuse kindlaksmääramise katses* ei täheldata piisavat tsütotoksilisust), tuleks lähtekontsentratsioonina kasutada suurimat kontsentratsiooni, mille juures uuritav kemikaal on asjaomases lahustis/kandeaines veel lahustuv või moodustab selles püsiva dispersiooni. Tuleb silmas pidada, et lõppkontsentratsioon plaadil ei tohi olla suurem kui 5000 µg/ml (füsioloogilise lahuse või söötme puhul) või 1000 µg/ml (DMSO puhul). Seejärel tehakse vastava lahustiga/kandeainega 1,2-kordsete lahjenduste rida, et saada h-CLAT puhul kasutatavad põhilahused (kaheksa kontsentratsiooni vahemikus $100 \times 1,2 \times CV75$ kuni $100 \times 0,335 \times CV75$ (füsioloogilise lahuse või söötme puhul) või vahemikus $500 \times 1,2 \times CV75$ kuni $500 \times 0,335 \times CV75$ (DMSO puhul); annuste kasutamise näide on esitatud DB-ALMi katse-eeskirjas nr 158). Seejärel lahjendatakse põhilahuseid söötmes veel 50 korda (füsioloogilise lahuse või söötme puhul) või 250 korda (DMSO puhul) (töölahused). Neid töölahuseid kasutatakse lõpuks kokkupuutekatses, kus neist tehakse plaadil veel viimane kahekordne lahjendus. Kui rakkude eluvõimelisuse hindamise tulemused ei vasta punktides 29 ja 30 kirjeldatud nõuetekohasuse kriteeriumitele, võib CV75 väärtuse täpsemaks kindlakstegemiseks *annuse*

kindlaksmääramise katset korrata. CD86/CD54 ekspressiooni mõõtmiseks saab kasutada ainult 24-kannulisi plaate.

21. Lahustiga/kandeainega kontroll valmistatakse ette vastavalt punktis 16 esitatud kirjeldusele. h-CLAT puhul kasutatav positiivne kontroll on DNCB (vt punkt 11), millest tehakse DMSOs põhilahused, mida lahjendatakse vastavalt punktis 20 esitatud põhilahuste lahjendamise juhistele. DNCBd kasutatakse *CD86/CD54 ekspressiooni mõõtmisel* positiivse kontrollina plaadil ühes lõppkontsentratsioonis (tavaliselt 4,0 µg/ml). DNCB kasutamiseks plaadil kontsentratsioonis 4,0 µg/ml valmistatakse DNCBst DMSOs põhilahus kontsentratsiooniga 2 mg/ml ning lahjendatakse seda seejärel sötmes 250 korda, et saada töölahus kontsentratsiooniga 8 µg/ml. Teise variandina võib positiivse kontrolli kontsentratsioonina kasutada DNCBga saadud CV75 väärtust, mis tehakse kindlaks igas katselaboris. Võib kasutada ka mõnda muud sobivat positiivset kontrolli, kui on olemas varasemad andmed, mis võimaldavad kindlaks määrata võrreldavad analüüsitsükli nõuetekohasuse kriteeriumid. Positiivse kontrolli lõppkontsentratsioon plaadil ei tohiks olla suurem kui 5000 µg/ml (füsioloogilise lahuse või söötme puhul) või 1000 µg/ml (DMSO puhul). Analüüsitsükli nõuetekohasuse kriteeriumid on samad kui uuritava kemikaali puhul (vt punkt 29), välja arvatud viimane nõuetekohasuse kriteerium, sest positiivset kontrolli hinnatakse vaid ühel kontsentratsioonil.

Uuritavate kemikaalide ja kontrollainetega töötlemine

22. Iga uuritava kemikaali ja kontrollaine puhul on prognoosi saamiseks vaja ühte katset. Iga katse koosneb vähemalt kahest sõltumatust analüüsitsüklist *CD86/CD54 ekspressiooni mõõtmiseks* (vt punktid 26–28). Iga sõltumatu analüüsitsükkel viiakse läbi eri päeval; samal päeval võib läbi viia mitu tsüklit juhul, kui iga analüüsitsükli, jaoks: a) valmistatakse sõltumatult värsked uuritava kemikaali põhilahused ja töölahused ning antikehade lahused; b) kasutatakse sõltumatult kogutud rakke (st rakud kogutakse erinevatest rakukultuuripudelitest); rakud võivad olla siiski samast passaažist. Uuritavate kemikaalide ja kontrollainete töölahused (500 µl) segatakse 500 µl rakususpensiooniga (1×10^6 rakku) vahekorras 1:1 ja rakke inkubeeritakse $24 \pm 0,5$ tundi, nagu on kirjeldatud punktides 20 ja 21. Igas tsüklis piisab ühest proovist uuritava kemikaali ja kontrollaine iga kontsentratsiooni kohta, kuna prognoosi saamiseks on vaja vähemalt kahte sõltumatut tsüklit.

Rakkude värvimine ja analüüs

23. Pärast $24 \pm 0,5$ tundi kestnud kokkupuudet viiakse rakud 24-kannuliselt plaadilt katsutisse, kogutakse tsentrifuugimise teel ja seejärel pestakse kaks korda 1 ml värvimispuhvriga (vajaduse korral võib pesemisetappe lisada). Pärast värvimist blokeeritakse rakud 600 µl blokeerimislahusega (värvimispuhver, mis sisaldab 0,01 % (massiühikutes mahuühiku kohta) globuliini (inimese globuliini Cohni fraktsioonid II, III (SIGMA, #G2388-10G) või

samaväärtuse)) ja inkubeeritakse neid 4 °C juures 15 min. Pärast blokeerimist jaotatakse rakud kolme 180 µl suuruse alikvoodina 96-kannulisele ümarapõhjalisele plaadile või mikrokatsutitesse.

24. Pärast tsentrifuugimist värvitakse rakke 4 °C juures 30 minuti vältel 50 µl CD86- või CD54-vastase antikehaga või hiire IgG1-ga (isotüübikontroll), mis on märgistatud FITCga. Tuleks kasutada DB-ALMi h-CLATi katse-eeskirjas nr 158 (18) kirjeldatud antikehasid, mis lahjendatakse värvimispuhvis mahuvahekorras 3 : 25 (CD86 puhul (BD-PharMingen, #555657, kloon Fun-1)) või 3 : 50 (CD54 puhul (DAKO, #F7143, kloon 6.5B5) ja IgG1 puhul (DAKO, #X0927)). Katsemeetodi väljatöötajate andmetel saavutatakse nimetatud lahjendusteguritega kõige parem signaali ja müra suhe. Katsemeetodi väljatöötajate kogemuste põhjal on eri partiide antikehade fluorestsentssignaali tugevus tavaliselt sarnane. Kasutajad võivad siiski kaaluda antikehade tiitrimist oma labori tingimustes, et teha kindlaks kõige paremad kasutamiseks sobivad kontsentratsioonid. Mõne muu fluorokroomiga märgistatud CD86-vastaseid ja/või CD54-vastaseid antikehasid võib kasutada juhul, kui näiteks katsetega, mis tehakse liites 1.2 loetletud pädevusainetega, on võimalik tõendada, et asjaomaste antikehade ja FITCga konjugeeritud antikehade puhul saadavad tulemused on sarnased. Tuleks arvesse võtta, et DB-ALMi h-CLATi katse-eeskirjas nr 158 (18) kirjeldatud antikehade kloonide või tarnija vahetamine võib tulemusi mõjutada. Pärast vähemalt kaks korda 150 µl värvimispuhvriga pesemist suspendeeritakse rakud uuesti värvimispuhvrisk (nt 400 µl), millele lisatakse PI lahust (nt 20 µl lõppkontsentratsiooni 0,625 µg/ml saamiseks) või muu tsütotoksilisuse markeri lahust (vt punkt 18). CD86 ja CD54 ekspressiooni taset ning rakkude eluvõimelisust analüüsitakse läbivoolutsütomeetriga.

ANDMED JA ARUANDLUS

Andmete hindamine

25. CD86 ja CD54 ekspressiooni analüüsitakse läbivoolutsütomeetriga; seejuures kasutatakse registreerimiskanalit FL1. Fluorestsentssignaali tugevuse geomeetrilise keskvärtuse (*mean fluorescence intensity*, MFI) põhjal arvutatakse positiivse kontrolli rakkude CD86 ja CD54 puhul täheldatav fluorestsentssignaali suhteline tugevus (*relative fluorescence intensity*, RFI) vastavalt järgmisele valemile:

$$RFI = \frac{\text{kemikaaliga töödeldud rakkude MFI} - \text{kemikaaliga töödeldud isotüübikontrolli rakkude MFI}}{\text{lahustiga/kandainega töödeldud rakkude MFI} - \text{lahustiga/kandainega töödeldud isotüübikontrolli rakkude MFI}} \times 100 .$$

Lisaks arvutatakse punktis 19 esitatud valemi järgi IgG1-ga värvitud isotüübikontrolli rakkude eluvõimelisus.

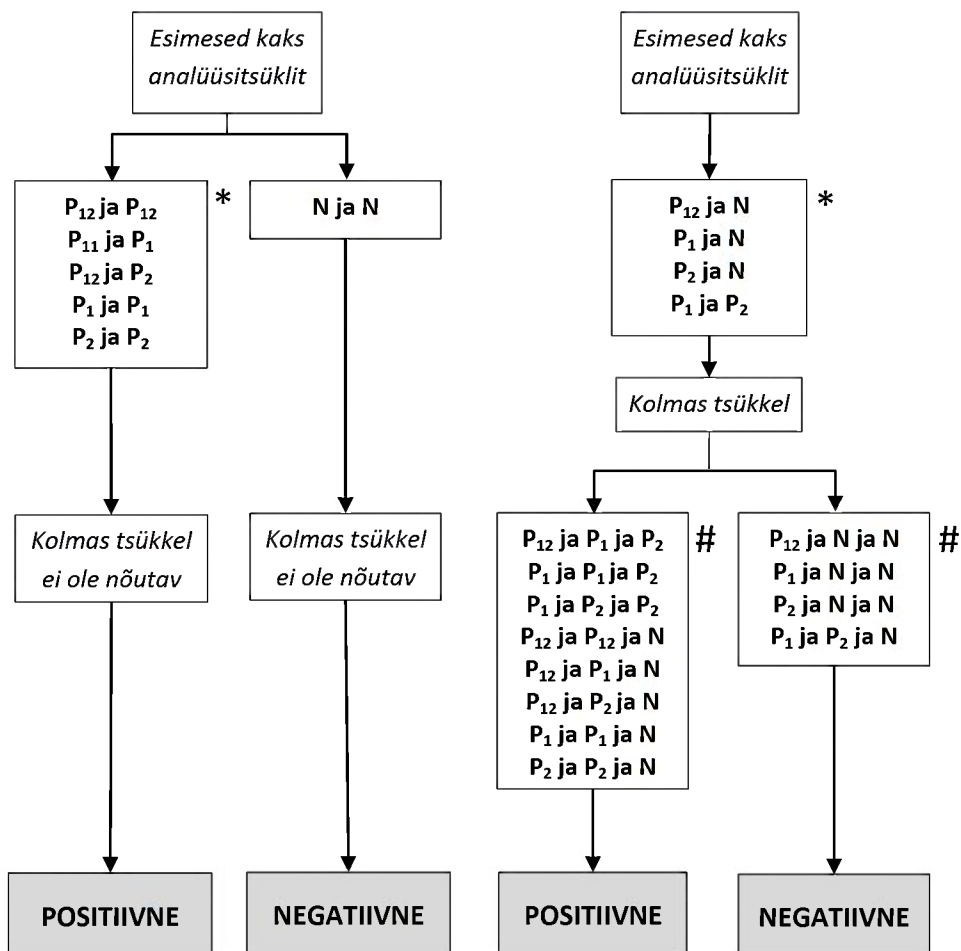
Prognoosimudel

26. *CD86/CD54* ekspressiooni mõõtmisel hinnatakse iga uuritavat kemikaali vähemalt kahes sõltumatus analüüsitsükklis, mille põhjal tehakse üks prognoosijäreldus (POSITIIVNE või NEGATIIVNE). *h*-CLAT kohast prognoosi käsitatakse POSITIIVSENA, kui vähemalt kahes kolmest sõltumatust analüüsitsüklist on täidetud vähemalt üks järgmistest tingimustest; vastasel korral tunnistatakse *h*-CLAT kohane prognoos NEGATIIVSEKS (joonis 1):

- *CD86* puhul on RFI mis tahes kasutatud kontsentratsioonil 150 % või suurem (ja rakkude eluvõimelisus ≥ 50 %);
- *CD54* puhul on RFI mis tahes kasutatud kontsentratsioonil 200 % või suurem (ja rakkude eluvõimelisus ≥ 50 %).

27. Seega kui kahes esimeses analüüsitsükklis saadakse *CD86* ja/või *CD54* puhul positiivne tulemus, tunnistatakse *h*-CLAT kohane prognoos POSITIIVSEKS ja kolmandat analüüsitsükklit ei ole vaja läbi viia. Kui kahes esimeses analüüsitsükklis saadakse kummagi markeri puhul negatiivne tulemus, tunnistatakse *h*-CLAT kohane prognoos NEGATIIVSEKS (seejuures võetakse nõuetekohaselt arvesse punkti 30 sätteid) ja kolmandat tsükklit ei ole vaja. Kui aga kahe esimese tsükli tulemused ei lange vähemalt ühe markeri (*CD54* või *CD86*) puhul kokku, on vaja kolmandat tsükklit ja lõplik prognoos tehakse kolme tsükli lõikes suurema osakaaluga tulemuse põhjal (st kaks kolmest). Seoses sellega tuleb silmas pidada, et kui viiakse läbi kaks sõltumatut tsükklit, millest ühes saadakse positiivne tulemus ainult *CD86* puhul (edaspidi P_1) ja teises positiivne tulemus ainult *CD54* puhul (edaspidi P_2), tuleb läbi viia kolmas tsükkel. Kui kolmandas tsükklis saadakse kummagi markeri puhul negatiivne tulemus (edaspidi N), tunnistatakse *h*-CLAT kohane prognoos NEGATIIVSEKS. Ent kui kolmandas tsükklis saadakse ükskõik kumma markeri puhul positiivne tulemus (P_1 või P_2) või mõlema markeri puhul positiivne tulemus (edaspidi P_{12}), tunnistatakse *h*-CLAT kohane prognoos POSITIIVSEKS.

Joonis 1. *h*-CLAT puhul kasutatav prognoosimudel; *h*-CLAT kohast prognoosi tuleb arvesse võtta ühtse lähenemisviisi raamistikus ning kooskõlas üldise sissejuhatuse punktide 7 ja 8 sätetega



P₁ – analüüsitsükkel, kus ainult CD86 on positiivne; P₂ – analüüsitsükkel, kus ainult CD54 on positiivne; P₁₂ – analüüsitsükkel, kus nii CD86 kui ka CD54 on positiivsed; N – analüüsitsükkel, kus ei CD86 ega CD54 ei ole positiivne.

* Kastides on esitatud kahe esimese analüüsitsükli tulemuste kombinatsioonid järjekorras, mis ei pruugi vastata nende saamise järjekorrale.

Kastides on esitatud kolme analüüsitsükli tulemuste kombinatsioonid lähtuvalt ülemises kastis esitatud kahe esimese tsükli tulemustest, kuid esitatu ei kajasta tulemuste saamise järjekorda.

28. h-CLAT kohase POSITIIVSE prognoosi saanud uuritava kemikaali puhul võib soovi korral määrata kaks toime avaldumise kontsentratsiooni: CD86 puhul EC150 ja CD54 puhul EC200. Need vastavad kontsentratsioonile, mille juures uuritava kemikaali põhjustatud RFI on vastavalt 150 või 200. Kui neid EC väärtusi kasutatakse näiteks katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi raames (4, 5, 6, 7, 8), võivad need

aidata hinnata sensibiliseeriva toime tugevust (9). Neid saab arvutada järgmiste valemitega:

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

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

kus

A_{conc} on väikseim kontsentratsioon ($\mu\text{g/ml}$), mille juures $RFI > 150$ (CD86) või 200 (CD54),

B_{conc} on suurim kontsentratsioon ($\mu\text{g/ml}$), mille juures $RFI < 150$ (CD86) või 200 (CD54),

A_{RFI} on RFI väärtus väikseimal kontsentratsioonil, mille juures $RFI > 150$ (CD86) või 200 (CD54), ning

B_{RFI} on RFI väärtus suurimal kontsentratsioonil, mille juures $RFI < 150$ (CD86) või 200 (CD54).

EC150 ja EC200 väärtuste täpsemaks määramiseks võib vaja minna kolme sõltumatut *CD86/CD54 ekspressiooni mõõtmist*. Lõplikud EC150 ja EC200 väärtused arvutatakse seejärel kolmes sõltumatus analüüsitsüklis saadud EC väärtuste mediaanina. Kui positiivsuse tingimused (vt punktid 26–27) on täidetud ainult kahes sõltumatus analüüsitsüklis kolmest, kasutatakse kahest asjaomasest arvutatud EC150 või EC200 väärtusest suuremat.

Nõuetekohasuse kriteeriumid

29. h-CLAT kasutamisel peaksid olema täidetud järgmised katse nõuetekohasuse kriteeriumid (22, 27).

- Söötmega ja lahustiga/kandeainega kontrollide puhul peaks rakkude eluvõimelisus olema suurem kui 90 %.
- Lahustiga/kandeainega kontrollis ei tohiks RFI väärtus CD86 ega CD54 puhul ületada positiivsuse kriteeriumi kohast väärtust (CD86 puhul $RFI \geq 150$ % ja CD54 puhul $RFI \geq 200$ %). Lahustiga/kandeainega kontrolli puhul arvutatakse RFI väärtus punktis 25 esitatud valemiga („kemikaaliga“ tuleks asendada muutujaga „lahustiga/kandeainega“ ning „lahustiga/kandeainega töödeldud“ tuleks asendada muutujaga „(söötmega) kontrolli“).
- Söötmega ja lahustiga/kandeainega kontrollide puhul peaks nii CD86 kui ka CD54 puhul olema vastava MFI väärtuse ja isotüübikontrolliga saadud MFI väärtuse suhtarv > 105 %.
- Positiivse kontrolli (DNCB) puhul peaks RFI väärtus nii CD86 kui ka CD54 puhul vastama positiivsuse kriteeriumile (CD86 puhul $RFI \geq 150$ % ja CD54 puhul $RFI \geq 200$ %) ning rakkude eluvõimelisus peaks olema üle 50 %.

- Uuritava kemikaali puhul peaks rakkude eluvõimelisus olema igas tsüklis vähemalt neljal kasutatud kontsentratsioonil suurem kui 50 %.
30. Negatiivsed tulemused võetakse arvesse üksnes juhul, kui uuritava kemikaali puhul on rakkude eluvõimelisus suurimal katses kasutatud kontsentratsioonil (st $1,2 \times CV75$ vastavalt punktis 20 kirjeldatud järjestikuse lahjendamise skeemile) väiksem kui 90 %. Kui rakkude eluvõimelisus $1,2 \times CV75$ juures on 90 % või suurem, tuleks negatiivne tulemus kõrvale jätta. Sellisel juhul soovitatakse kasutatava annuse täpsustamiseks korrata CV75 määramist. Tuleb märkida, et kui uuritava kemikaali suurim katsekonsentratsioon on füsioloogilises lahuses (või söötmes või muus lahustis/kandeaines) 5000 µg/ml või DMSOs 1000 µg/ml või suurim kontsentratsioon, mille juures kemikaal veel lahustub, võetakse negatiivne tulemus arvesse ka siis, kui rakkude eluvõimelisus on üle 90 %.

Katseprotokoll

31. Katseprotokoll peaks sisaldama järgmist teavet.

Uuritav kemikaal

Ühest koostisosast koosnev aine:

- kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus(ed), CASi number/numbrid, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem ja/või muu identimisteave;
- füüsiline välimus, log K_{ow} , lahustuvus vees, lahustuvus DMSOs, molekulmass ja muud asjakohased kättesaadavad andmed füüsikalise-keemiliste omaduste kohta;
- puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;
- vajaduse korral teave töötlemise kohta enne katset (nt soojendamine, peenestamine);
- kasutatud kontsentratsioon(id);
- kättesaadav teave säilitamistingimuste ja püsivuse kohta;
- iga uuritava kemikaali puhul lahusti/kandeaine valimise põhjendus.

Mitme koostisosast koosnev aine, tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal või segu:

- võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt näiteks koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), puhtusest, kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohaseid füüsikalise-keemilisi omadusi käsitlevatest kättesaadavatest andmetest (vt eespool);
- füüsiline välimus, lahustuvus vees, lahustuvus DMSOs ja muud asjakohased kättesaadavad andmed füüsikalise-keemiliste omaduste kohta;

- teadaoleva koostisega segu/polümeeri puhul molekulmass või näiline molekulmass või muu uuringu tegemiseks asjakohane teave;
- vajaduse korral teave töötlemise kohta enne katset (nt soojendamine, peenestamine);
- kasutatud kontsentratsioon(id);
- kättesaadav teave säilitamistingimuste ja püsivuse kohta;
- iga uuritava kemikaali puhul lahusti/kandeaine valimise põhjendus.

Kontrollid

Positiivne kontroll:

- kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus(ed), CASi number/numbrid, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem ja/või muu identimisteave;
- füüsiline välimus, log K_{ow} , lahustuvus vees, lahustuvus DMSOs, molekulmass ja vajaduse korral muud asjakohased kättesaadavad andmed füüsikalis-keemiliste omaduste kohta;
- puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;
- vajaduse korral teave töötlemise kohta enne katset (nt soojendamine, peenestamine);
- kasutatud kontsentratsioon(id);
- kättesaadav teave säilitamistingimuste ja püsivuse kohta;
- vajaduse korral viide varasematele positiivse kontrolliga saadud tulemustele, millest nähtub vastavus asjakohastele analüüsitsükli nõuetekohasuse kriteeriumidele.

Negatiivne ja lahustiga/kandeainega kontroll:

- kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus(ed), CASi number/numbrid, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem ja/või muu identimisteave;
- puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;
- asjaomases katsejuhendis nimetamata lahusti/kandeaine kasutamisel kontrollina kättesaadav teave selle füüsilise välimuse, molekulmassi ja muude asjakohaste füüsikalis-keemiliste omaduste kohta;
- kättesaadav teave säilitamistingimuste ja püsivuse kohta;
- iga uuritava kemikaali puhul lahusti/kandeaine valimise põhjendus.

Katsetingimused:

- sponsori, katselabori ja uuringu juhi nimi ja aadress;

- kasutatud katsemeetodi kirjeldus;
- kasutatud rakuliin, selle säilitamise tingimused ning päritolu (nt asutus, kellelt rakud saadi);
- kasutatud läbivoolutsütomeeter (nt mudel) ja selle seaded, kasutatud globuliin, antikehad ja tsütotoksilisuse marker;
- pädevusainete analüüsimise meetod, mida kasutati labori pädevuse tõendamiseks, ning katsemeetodiga saadud tulemuste pikaajalise reprodutseeritavuse tõendamise viis, näiteks laboris kontrollidega ja/või reageerimisvõime kontrollimisel varem saadud andmed.

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid:

- lahustiga/kandeainega kontrolli puhul saadud rakkude eluvõimelisuse, MFI ja RFI väärtused võrrelduna vastavate nõuetekohasust kajastavate vahemikega;
- positiivse kontrolliga saadud rakkude eluvõimelisuse ja RFI väärtused võrrelduna vastavate nõuetekohasust kajastavate vahemikega;
- rakkude eluvõimelisus uuritud kemikaali igal katses kasutatud kontsentratsioonil.

Katse käik:

- analüüsitsüklite arv;
- uuritava kemikaali kontsentratsioonid, lisamisviis ja kasutatud kokkupuuteaeg (kui erineb soovitatust);
- kokkupuute kestus (kui erineb soovitatust);
- kasutatud hindamis- ja otsustamiskriteeriumide kirjeldus;
- kõikide katse käigus tehtud muudatuste kirjeldus.

Tulemused:

- tabeli kujul andmed uuritava kemikaali ja positiivse kontrolli kohta igas analüüsitsüklis, sh CV75 (vajaduse korral), eraldi MFI, RFI ja rakkude eluvõimelisuse väärtused, EC150/EC200 väärtused (vajaduse korral) ning prognoosimudelil põhinev hinnang uuritava kemikaali kohta;
- vajaduse korral mis tahes muude asjakohaste vaatlusandmete kirjeldus.

Tulemuste arutelu:

- h-CLATga saadud tulemuste arutelu;
- katse tulemuste hindamine ühtse lähenemisviisi kontekstis, kui muu asjakohane teave on kättesaadav.

Järeldused

KIRJANDUS

- (1) Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., Yoneyama, K., Itagaki, H., Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Ito, Y., Suzuki, H., ja 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., ja Suzuki, H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol. In Vitro* 21: 428–437.
- (3) EURL ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Kättesaadav aadressil <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., ja 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., ja 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, S. N., Ramirez, T., Fabian, E., Mehling, A., Teubner, W., van Ravenzwaay, B., ja 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, J. W., Rorije, E., Emter, R., Natch, A., van Loveren, H., ja 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, P. S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., ja Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin

sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71: 337–351.

- (9) Jaworska, J. S., Natsch, A., Ryan, C., Strickland, J., Ashikaga, T., ja 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, D. M., Choksi, N., Matheson, J., Jacobs, A., Lowit, A., Allen, D., ja 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., ja 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) EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Kättesaadav aadressil <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) EURL ECVAM (2012). Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report. Kättesaadav aadressil <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>.
- (14) Takenouchi, O., Miyazawa, M., Saito, K., Ashikaga, T., ja 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., ja 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., ja 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., ja 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 No. 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT). 23 lk. Kättesaadav aadressil <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., ja 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., ja 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. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis, Prantsusmaa. 96 lk.
- (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. Kättesaadav aadressil [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) Ühinenud Rahvaste Organisatsioon (ÜRO) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Viies, täiendatud väljaanne. United Nations Publications, New York ja Genf. ISBN: 978-92-1-117006-1. Kättesaadav aadressil http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (24) Euroopa Kemikaalide Ökotoksikoloogia ja Toksikoloogia Keskus (ECETOC) (2003). Contact Sensitization: Classification According to Potency. Technical Report No. 87. Euroopa Kemikaalide Ökotoksikoloogia ja Toksikoloogia Keskus.

- (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., ja 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.

Liide 1.1

MÕISTED

Aine – looduslik või mis tahes tootmisprotsessi tulemusena saadud keemiline element või selle ühend koos püsivuse tagamiseks vajalike lisaainete ja tootmisprotsessi käigus tekkinud lisanditega, mis ei hõlma siiski lahusteid, mida on võimalik aine püsivust mõjutamata või selle koostist muutmata ainest eraldada.

Analüüsitsükl – ühe või mitme uuritava kemikaali analüüsimine lahustiga/kandeainega kontrolli ja positiivse kontrolliga paralleelselt.

Asjakohasus – näitaja, mille abil kirjeldatakse, kuivõrd katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat toimet, kas selle kasutamine on mõttekas ja kas see on konkreetse eesmärgi jaoks sobiv. Asjakohasusest nähtub, mil määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või ennustada huvipakkuvat bioloogilist toimet. Asjakohasuse puhul võetakse arvesse ka katsemeetodiga saavutatavat täpsust (vastavust) (21).

CV75 – hinnanguline kontsentratsioon, mille juures rakkude eluvõimelisus on 75 %.

EC150 – kontsentratsioon, mille juures CD86 ekspressiooni kajastav RFI väärtus on 150.

EC200 – kontsentratsioon, mille juures CD54 ekspressiooni kajastav RFI väärtus on 200.

Fluorestsentssignaali suhteline tugevus (RFI) – kemikaaliga töödeldud rakkude fluorestsentssignaali tugevuse väärtuste geomeetrilise keskmise suhteline väärtus võrrelduna lahustiga/kandeainega töödeldud rakkude fluorestsentssignaali tugevuse väärtuste geomeetrilise keskmisega.

Kahjuliku toime rada – sündmuste ahel alates sihtkemikaali või rühma sarnaste kemikaalide keemilisest struktuurist sõltuvast käivitavast molekulaarsest sündmusest kuni vaadeldava toime avaldumiseni *in vivo* (22).

Katsete tegemist ja hindamist käsitlev ühtne lähenemisviis – struktureeritud lähenemisviis, mida kasutatakse kemikaali või rühma kemikaalide ohtlikkuse tuvastamiseks (võimalik toime), ohu kirjeldamiseks (toime tugevus) ja/või ohutuse hindamiseks (võimalik toime/toime tugevus ja kokkupuude) ning mille raames lõimitakse strateegiliselt ja kaalutakse läbi kõik asjakohased andmed võimalikku ohtu ja/või riski ja/või täiendavate sihipäraste ja seega minimaalses ulatuses katsete tegemise vajadust käsitleva regulatiivse otsuse tegemiseks.

Kemikaal – aine või segu.

Lahustiga/kandeainega kontroll – töötlemata proov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente peale uuritava kemikaali, sealhulgas lahustit/kandeainet. Selle abil tehakse kindlaks lähtetase samas lahustis/kandeaines lahustatud või püsiva dispersiooni

moodustanud uuritava kemikaaliga töödeldud proovide jaoks. Kui sellist töötlemata proovi hinnatakse paralleelselt söötmega kontrolliga, võimaldab see ühtlasi kindlaks teha, kas lahusti/kandeaine mõjutab katsesüsteemi.

Läbivoolutsütomeetria – tsütomeetriline meetod, mille puhul vedelikus suspendeeritud rakud liiguvad üksteise järel läbi ergastava valguse fookuse ning sellest tingitud valguse hajumise viis kajastab rakkude ja nende koostisosade omadusi; sageli märgistatakse rakud fluorestseeruvate markeritega, mille puhul valgus kõigepealt neeldub ja seejärel kiirgub muutunud sagedusel.

Mitmest koostisosast koosnev aine – aine, mis on määratletud kvantitatiivse koostise alusel ja milles enam kui ühe põhikoostisosa sisaldus on vähemalt 10, kuid väiksem kui 80 massiprotsenti. Mitmest koostisosast koosnev aine saadakse tootmisprotsessi tulemusena. Erinevus segu ja mitmest koostisosast koosneva aine vahel seisneb selles, et segu saadakse kahe või enama aine kokku segamisel, ilma et toimuks keemilist reaktsiooni. Mitmest koostisosast koosnev aine saadakse keemilise reaktsiooni tulemusel.

Nõuetekohane katsemeetod – katsemeetod, mille asjakohasust ja usaldusväärsust konkreetse eesmärgi puhul peetakse piisavaks ning mis rajaneb teaduslikult usaldusväärsel põhimõtetel. Katsemeetod ei ole kunagi nõuetekohane absoluutses tähenduses, vaid üksnes seoses teatud kindla eesmärgiga (21).

Ohtlikkus – mõjurit või olukorda iseloomustav omadus, millest võib tuleneda kahjulik toime, kui organism, süsteem või (alam)populatsioon selle mõjuriga kokku puutub.

Positiivne kontroll – paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente ja mida on töödeldud ainega, millega teadaolevalt saadakse positiivne tulemus. Positiivse tulemuse väärtus ei tohiks olla liiga suur, et võimaldada hinnata positiivse kontrolliga saadud tulemuste varieeruvust ajas.

Prehapteenid – kemikaalid, mis muutuvad sensibilisaatoriks abiootilise muundumise teel.

Prohapteenid – kemikaalid, mis vajavad nahka sensibiliseeriva toime tekkimiseks ensümaatilist aktiveerimist.

Segu – kahest või enamast ainest koosnev segu või lahus.

Spetsiifilisus – katsemeetodiga õigesti negatiivseks/reaktsioonivõimetuks liigitatud uuritavate kemikaalide osakaal kõikide negatiivsete kemikaalide hulgas. Spetsiifilisus kajastab sellise katsemeetodi täpsust, millega saadakse kategoriseeritav tulemus, ning see on oluline näitaja katsemeetodi asjakohasuse hindamiseks (21).

Söötmega kontroll – töötlemata paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente. Sellist proovi käideldakse koos uuritava kemikaaliga töödeldud proovidega ja muude kontrollproovidega, et teha kindlaks, kas lahusti/kandeaine mõjutab katsesüsteemi.

Tundlikkus – katsemeetodiga õigesti positiivseks/reaktsioonivõimeliseks liigitatud uuritavate kemikaalide osakaal kõikide positiivsete kemikaalide hulgas. Tundlikkus kajastab sellise katsemeetodi täpsust, millega saadakse kategoriseeritav tulemus, ning see on oluline näitaja katsemeetodi asjakohasuse hindamiseks (21).

Täpsus – katsetulemuste ja vastuvõetavate võrdlusväärtuste kooskõla määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks asjakohastest aspektidest. Seda mõistet kasutatakse sageli vastavuse tähenduses, et väljendada katsemeetodiga saadud õigete tulemuste osakaalu (21).

Usaldusväärsus – näitaja, mis iseloomustab katsemeetodiga saadud tulemuste reprodutseeritavust pikema aja jooksul samas laboris ja eri laborites, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel. Usaldusväärsuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline reprodutseeritavus ning laborisisene korratavus (21).

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

UVCB – tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

Värvimispuhver – fosfaadiga puhverdatud soolalahus, mis sisaldab 0,1 % veise seerumi albumiini.

Ühest koostisosast koosnev aine – aine, mis on määratletud kvantitatiivse koostise alusel ja mille ühe põhikoostisosa sisaldus on vähemalt 80 massiprotsenti.

Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem (ÜRO GHS) – süsteem, millega nähakse ette kemikaalide (ainete ja segude) klassifitseerimine vastavalt nende füüsilise ohtlikkuse ning kahjuliku tervise- ja keskkonnamõju standarditud liigile ja tasemele ning mis hõlmab selliseid asjaomaseid teavitustähiseid nagu piktogrammid, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskaardid, et anda inimeste (sealhulgas tööandjate, töötajate, vedajate, tarbijate ja päästetöötajate) ning keskkonna kaitsmiseks vajalikku teavet kõnealuste kemikaalide kahjuliku toime kohta (23).

Liide 1.2

PÄDEVUSAINED

Enne katsemeetodi B.71 juurde kuuluvas käesolevas liites kirjeldatud meetodi rutiinset kasutamist tuleks tõendada labori tehnilist pädevust. Selleks tuleks h-CLAT kasutamisel saada tabelis 1 esitatud kümne soovitatava aine puhul eeldatavale tulemusele vastav prognoos ning CV75, EC150 ja EC200 väärtused, mis jäävad kümnest pädevusainest vähemalt kaheksa puhul asjaomasesse võrdlusvahemikku. Pädevusained on valitud nii, et nende puhul oleksid esindatud naha sensibiliseerimise ohuga seotud eri reaktsioonid. Peale selle on valikukriteeriumidena võetud arvesse ainete kaubanduslikku kättesaadavust, kvaliteetsete *in vivo* võrdlusandmete olemasolu ja h-CLATga saadud kvaliteetsete *in vitro* andmete olemasolu. Lisaks on h-CLAT kohta olemas avaldatud võrdlusandmed (3, 14).

Tabel 1. h-CLAT kasutamise tehnilise pädevuse tõendamiseks soovitatavad ained

Pädevusained	CASi nr	Füüsikaline olek	<i>In vivo</i> toime prognoos ¹	CV75 võrdlusvahemik, µg/ml ²	h-CLAT tulemus CD86 puhul (EC150 võrdlusvahemik, µg/ml) ²	h-CLAT tulemus CD54 puhul (EC200 võrdlusvahemik, µg/ml) ²
2,4-dinitroklorobenseen	97-00-7	Tahkis	Sensibilisaator (äärmiselt tugev)	2–12	Positiivne (0,5–10)	Positiivne (0,5–15)
4-fenüleendiamiin	106-50-3	Tahkis	Sensibilisaator (tugev)	5–95	Positiivne (< 40)	Negatiivne (> 1,5) ³
Nikkelsulfaat	10101-97-0	Tahkis	Sensibilisaator (mõõdukas)	30–500	Positiivne (< 100)	Positiivne (10–100)
2-merkaptobensotiasool	149-30-4	Tahkis	Sensibilisaator (mõõdukas)	30–400	Negatiivne (> 10) ³	Positiivne (10–140)
R(+)-limoneen	5989-27-5	Vedelik	Sensibilisaator (nõrk)	> 20	Negatiivne (> 5) ³	Positiivne (< 250)
Imidasolidinüülkarbamiid	39236-46-9	Tahkis	Sensibilisaator (nõrk)	25–100	Positiivne (20–90)	Positiivne (20–75)
Isopropanool	67-63-0	Vedelik	Sensibiliseeriva toimet	> 5000	Negatiivne (> 5000)	Negatiivne (> 5000)
Glütserool	56-81-5	Vedelik	Sensibiliseeriva toimet	> 5000	Negatiivne (> 5000)	Negatiivne (> 5000)
Piimhape	50-21-5	Vedelik	Sensibiliseeriva toimet	1500–5000	Negatiivne (> 5000)	Negatiivne (> 5000)
4-aminobensoehape	150-13-0	Tahkis	Sensibiliseeriva toimet	> 1000	Negatiivne (> 1000)	Negatiivne (> 1000)

Lühendid: CASi nr – Chemical Abstracts Service'i registrinumber.

¹ *In vivo* ohu (ja toime tugevuse) prognoos põhineb LLNA andmetel (3, 14). *In vivo* toime tugevuse väljendamisel on lähtutud ECETOCi soovitatud kriteeriumidest (24).

² Varasemate katsete andmete põhjal (13, 25).

³ Selle markeriga seotud varasemad tulemused on valdavalt negatiivsed, mistõttu negatiivne tulemus on üldjuhul ootuspärane. Esitatud vahemik on kindlaks määratud varasemate üksikute positiivsete tulemuste põhjal. Positiivse tulemuse korral peaks toime

avaldumise kontsentratsioon jääma esitatud võrdlusvahemikku.

2. liide

NAHA SENSIBILISEERIMINE *IN VITRO*: RAKULIINI U937 AKTIVEERIMISE KATSE (U-SENS™)

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

1. Katsemeetodiga U-SENS™ tehakse inimese histiotsüütse lümfoomi rakuliinis U937 kindlaks monotsüütide ja dendriitrakkude aktiveerimisega seotud raku pinnamarkeri (CD86) ekspressiooni kvantitatiivsed muutused pärast kokkupuudet sensibilisaatoriga (1). Seejärel kasutatakse rakuliinis U937 mõõdetud raku pinnamarkeri CD86 ekspressioonitaset toetava teabena, mis aitab eristada naha sensibilisaatoreid kemikaalidest, mis nahka ei sensibiliseeri.
2. Katsemeetodit U-SENS™ on hinnatud L'Oreali koordineeritud valideerimisuuringus (2) ning seejärel on selle sõltumatult läbi vaadanud loomkatsete alternatiivide Euroopa Liidu referentlabori (EURL ECVAM) teaduslik nõuandekomitee (3). Võttes arvesse kõiki kättesaadavaid andmeid ning reguleerivate asutuste ja sidusrühmade seisukohti, soovitas EURL ECVAM kasutada katsemeetodit U-SENS™ (4) ühtse lähenemisviisi osana, et aidata ohu alusel klassifitseerimise ja märgistamise eesmärgil eristada naha sensibilisaatoreid kemikaalidest, mis nahka ei sensibiliseeri. Oma juhenddokumendis, milles käsitletakse naha sensibiliseerimisega seotud ühtse lähenemisviisi puhul kasutatavaid andmete lõimimise struktureeritud meetodikaid ja teabeallikaid, vaatleb OECD mitut juhtumiuuringut, milles kirjeldatakse eri katsestrateegiaid ja prognoosimudeleid. Üks kõnealustest kindlaksmääratud meetodikatest põhineb katsemeetodil U-SENS (5). Näited meetodiga U-SENS™ saadud andmete kasutamisest kombineerituna muu teabega, sealhulgas varasemate katseandmete ja nõuetekohastest inimuuringutest saadud andmetega (6) on avaldatud kirjanduses (4, 5, 7).
3. U-SENS™ on osutunud rakendatavaks laborites, kus on olemas rakukultuurimeetodite kasutamise ja läbivoolutsütomeetrilise analüüsi kogemus. Selle meetodi puhul eeldatav prognooside reprodutseeritavuse ligikaudne määr on laborisisesel ja laboritevahelisel reprodutseeritavuse puhul vastavalt 90 % ja 84 % (8). Valideerimisuuringust (8) ja muudest avaldatud uuringutulemustest (1) nähtub üldiselt, et LLNA tulemustega võrreldes on selles katses naha sensibilisaatorite (st ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt 1. kategooria kemikaalide) mittesensibiliseerivatest kemikaalidest eristamise täpsus 86 % (N = 166), tundlikkus 91 % (118/129) ja spetsiifilisus 65 % (24/37). Inimuuringute tulemustega võrreldes on naha sensibilisaatorite (st ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt 1. kategooria kemikaalide) mittesensibiliseerivatest kemikaalidest eristamise täpsus 77 % (N = 101), tundlikkus 100 % (58/58) ja spetsiifilisus 47 % (20/43). LLNA tulemustega

võrreldes on meetodi U-SENS™ kohaste valenegatiivsete prognooside tõenäosus suurem vähesel määral kuni mõõdukalt nahka sensibiliseerivate (st ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt alamkategooria 1B) kemikaalide puhul ja väiksem siis, kui tegemist on tugevalt nahka sensibiliseeriva (st ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt alamkategooria 1A) kemikaaliga (1, 8, 9). Kokkuvõttes nähtub sellest teabest, et U-SENS™ on kasulik meetod, mis aitab kindlaks teha naha sensibiliseerimise ohtu. Ainsa meetodina kasutatava U-SENS™-iga saavutatav eespool nimetatud täpsus on siiski üksnes orienteeriv, sest katseandmeid tuleks vaadelda ühtse lähenemisviisi kontekstis koos muudest allikatest pärit teabega ja kooskõlas üldise sissejuhatuse punktide 7 ja 8 sätetega. Kui hinnatakse naha sensibiliseerimise katsemeetodeid, mille puhul ei kasutata katseloomi, tuleb lisaks arvesse võtta, et LLNA ja muude loomkatsete tulemused ei pruugi täielikult kajastada kemikaali toimet inimesele.

4. Praeguse olemasoleva teabe põhjal on tõendatud, et U-SENS™ on kohaldatav paljude uuritavate kemikaalide (sealhulgas kosmeetikatoode koostisainete, nt säilitusainete, pindaktiivsete ainete, toimeainete, värvainete) puhul, mis erinevad üksteisest orgaanilise funktsionaalrühma, füüsikalise-keemiliste omaduste, *in vivo* katsetega määratud nahka sensibiliseeriva toime tugevuse ja teadaolevalt naha sensibiliseerimisega seotud reaktsioonimehhanismide (Michaeli aktseptor, Schiffi aluse teke, atsüülrühma ülekande reaktiiv, nukleofiilne bimolekulaarne asendusreaktsioon [SN2] või nukleofiilne aromaatsne asendusreaktsioon [SNAr]) poolest (1, 8, 9, 10). U-SENS™ on kohaldatav uuritavate kemikaalide puhul, mis on sobivas lahustis/kandeaines lahustuvad või moodustavad selles püsiva dispersiooni (st kolloidlahuse või suspensiooni, milles uuritav kemikaal ei sadestu ega eraldu lahustist/kandeainest eri faasi) (vt punkt 13). Andmestikus esindatud kemikaalidega, mis on teadaolevalt prehapteenid (oksüdeerumisel aktiveeruvad ained) või prohapteneid (ained, mis vajavad ensümaatilist aktiveerimist, nt P450 ensüümide abil), saadi meetodi U-SENS™ kasutamisel õige prognoositulemus (1, 10). Membraani lõhkuvate ainete puhul võidakse CD86 ekspressiooni mittespetsiifilise suurenemise tõttu saada valepositiivsed tulemused, nagu nähtub asjaolust, et *in vivo* võrdlusliigitusest lähtuvalt saadud seitsmest valepositiivsest tulemusest kolm olid seotud pindaktiivsete ainetega (1). Seetõttu tuleks pindaktiivsete ainetega saadud positiivsetesse tulemustesse suhtuda ettevaatusega, aga pindaktiivsete ainetega saadud negatiivseid tulemusi võib arvesse võtta uuritava kemikaali liigitamisel kemikaaliks, mis nahka ei sensibiliseeri. U-SENS™ võimaldab hinnata ka fluorestseeruvaid uuritavaid kemikaale (1), kuid tugevalt fluorestseeruvad uuritavad kemikaalid, mille kiiritava kiirguse lainepikkus on sama kui fluorestsainisotiotsüanaadil (FITC) või propiidiumjodiidil (PI), segavad läbivoolutsütomeetrilist analüüsi ning neid ei ole võimalik FITCga konjugeeritud antikehade või PI abil õigesti hinnata (esimese puhul võidakse saada valepositiivsed tulemused ja teise puhul ei saa mõõta eluvõimelisust). Sellisel juhul võib kasutada vastavalt muu fluorokroomiga märgistatud antikehasid või muud tsütotoksilisuse markerit,

kui näiteks katsetega, mis tehakse liites 2.2 loetletud pädevusainetega, on võimalik tõendada, et sellise fluorokroomi või markeriga saadakse samasugused tulemused kui FITCga märgistatud antikehade või PIga (vt punkt 18). Eespool kirjeldatust lähtuvalt tuleks pindaktiivsete ainetega saadud positiivseid tulemusi ja tugevalt fluorestseeruvate uuritavate kemikaalidega saadud negatiivseid tulemusi tõlgendada kõnealuste piirangute kontekstis ja koos ühtse lähenemisviisi raames muudest allikatest saadud teabega. Kui leidub andmeid, mille kohaselt U-SENS™ ei sobi kasutamiseks mõne muu konkreetse uuritavate kemikaalide rühma puhul, ei tohiks seda asjaomase konkreetse kemikaalirühma puhul kasutada.

5. Nagu eespool kirjeldatud, aitab U-SENS™ eristada naha sensibilisaatoreid kemikaalidest, mis nahka ei sensibiliseeri. Ent kui seda kasutatakse näiteks katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi raames, võib see aidata hinnata ka sensibiliseeriva toime tugevust. Võimalust kasutada meetodiga U-SENS™ saadud tulemusi toime tugevuse hindamisel on siiski vaja täiendavalt uurida, soovitatavalt inimuuringutest saadud andmete alusel.
6. Mõisted on esitatud liites 2.1.

KATSE PÕHIMÕTE

7. U-SENS™ on *in vitro* meetod, millega määratakse kvantitatiivselt raku pinnamarkeri CD86 ekspressiooni muutusi inimese histiotsüütse lümfoomi rakuliini U937 rakkudes pärast 45 ± 3 tunni pikkust kokkupuudet uuritava kemikaaliga. Pinnamarker CD86 on üks U937 aktiveerimise tüüpiline marker. Teadaolevalt on CD86 kostimulatoorne molekul, mis võib võimaldada jäljendada monotsüütide aktiveerimist, millel on väga oluline roll T-rakkude aktivatsioonis. Pinnamarkeri CD86 ekspressiooni muutusi mõõdetakse läbivoolutsütoomeetriliselt pärast rakkude värvimist, milleks tavaliselt kasutatakse fluorestseinisotiotsüanaadiga (FITC) märgistatud antikehasid. Samal ajal mõõdetakse ka tsütotoksilisust (nt PIga), et hinnata, kas pinnamarkeri CD86 ekspressiooni suurenemine toimub kontsentratsioonil, mille juures ei täheldata tsütotoksilisust. Arvutatakse pinnamarkeri CD86 stimulatsiooniindeks (SI) lahustiga/kandeainega kontrolli näitajaga võrrelduna ja seda tulemust kasutatakse prognoosimudelil (vt punkt 19), et aidata eristada naha sensibilisaatoreid kemikaalidest, mis nahka ei sensibiliseeri.

PÄDEVUSE TÕENDAMINE

8. Enne katsemeetodi B.71 juurde kuuluva käesolevas liites kirjeldatud meetodi rutiinset kasutamist tuleks tõendada labori tehnilist pädevust ning kasutada selleks liites 2.2 loetletud kümmet pädevusainet kooskõlas *in vitro* meetodeid käsitleva hea tavaga (11).

Lisaks peaksid meetodi kasutajad haldama reageerimisvõime kontrollimise käigus kogutud andmeid (vt punkt 11) ning positiivsete ja lahustiga/kandeainega kontrollidega saadud varasemaid andmeid (vt punktid 15–16) sisaldavat andmebaasi ning kontrollima nende andmete põhjal, kas katsetulemused on laboris aja möödudes jätkuvalt reprodutseeritavad.

KATSE KÄIK

9. Käesolev meetod põhineb loomkatsetele alternatiivsete meetodite andmebaasi (DataBase on ALternative Methods, DB-ALM) teenusena kättesaadaval U-SENS™-i käsitleval katse-eeskirjal nr 183 (12). Meetodi U-SENS™ laboris juurutamisel ja rakendamisel tuleks kasutada standardset töökorda. U-SENS™-i rakendamiseks võib kasutada automaatsüsteemi, kui näiteks katsetega, mis tehakse liites 2.2 loetletud pädevusainetega, on võimalik tõendada, et sellise süsteemi kasutamisel saadakse sarnased tulemused. Allpool on kirjeldatud U-SENS™-i põhielemente ja katse käiku.

Rakkude ettevalmistamine

10. U-SENS™-i puhul tuleks kasutada inimese histiotsüütse lümfoomi rakuliini U937 (13). Soovitavalt tuleks rakud (kloon CRL1593.2) soetada usaldusväärsest rakupangast, näiteks Ameerika Tüüpkuultuuride Kollektsoonist (American Type Culture Collection).
11. U937 rakke kasvatatakse 37 °C juures reguleeritud õhuniiskusega 5-protsendilise CO₂-sisaldusega atmosfääris söötmes RPMI-1640, mis sisaldab 10 % veiselooteseerumit, 2 mM L-glutamiini, 100 ühikut penitsilliini milliliitri kohta ja streptomütsiini kontsentratsioon 100 µg/ml (täissööde). U937 rakke külvatakse regulaarselt iga 2–3 päeva järel ümber algtihedusega vastavalt 1,5 või 3×10^5 rakku/ml. Rakkude tihedus ei tohiks olla suurem kui 2×10^6 rakku/ml ja trüpaansinisega mittevärvumise alusel mõõdetud rakkude eluvõimelisus peaks olema $\geq 90\%$ (ei kohaldata esimesel sulatamisjärgsel väljakülvamisel). Enne katses kasutamist tuleks iga rakkude, veiselooteseerumi ja antikehade partii puhul teha reageerimisvõime kontroll, et veenduda nende sobivuses. Rakkude reageerimisvõime kontroll tuleks teha vähemalt üks nädal pärast sulatamist ning kasutada selleks positiivse kontrollina pikrüülsulfoonhapet (2,4,6-trinitrobenseensulfoonhape, TNBS) (CASi nr: 2508-19-2; puhtus $\geq 99\%$) ja negatiivse kontrollina piimhapet (CASi nr: 50-21-5, puhtus $\geq 85\%$). Reageerimisvõime kontrollimisel tuleks kummagi kontrollkemikaali puhul kasutada kuut lõppkontsentratsiooni (TNBS puhul 1, 12,5, 25, 50, 75 ja 100 µg/ml ning piimhappe puhul 1, 10, 20, 50, 100 ja 200 µg/ml). Täissöötmes lahustatud TNBS peaks esile kutsuma CD86 alusel tuvastatava positiivse kontsentratsioonist sõltuva reaktsiooni (nt kui kontsentratsioonile, mille puhul reaktsioon on positiivne, st CD86 SI ≥ 150 , järgneb kontsentratsioon, mille juures CD86 SI kasvab) ning täissöötmes lahustatud piimhappe puhul peaks CD86 alusel saadav tulemus olema negatiivne (vt punkt 21). Katses tuleks

kasutada üksnes reageerimisvõime kontrolli kaks korda läbinud rakke. Rakke võib paljundada kuni seitsme nädala jooksul pärast sulatamist. Passaažide arv ei tohiks ületada 21. Reageerimisvõime kontroll tuleks teha vastavalt punktides 18–22 esitatud kirjeldusele.

12. Katses kasutamiseks külvatakse U937 rakud välja tihedusega 3×10^5 rakku/ml või 6×10^5 rakku/ml ning eelkasvatatakse neid rakukultuuripudelis vastavalt kaks päeva või üks päev. Eespool kirjeldatust erinevaid eelkasvatamise tingimusi võib kasutada juhul, kui see on teaduslikult piisavalt põhjendatud ja näiteks katsetega, mis tehakse liites 2.2. loetletud pädevusainetega, on võimalik tõendada, et saadavad tulemused on sarnased. Katse päeval eemaldatakse rakud rakukultuuripudelitest ja suspendeeritakse uuesti värskes söötmes tihedusel 5×10^5 rakku/ml. Seejärel jaotatakse rakud 100 µl kaupa 96-kannulise lamedapõhjalise plaadi kannudesse (rakkude lõpptihedus on $0,5 \times 10^5$ rakku kannu kohta).

Uuritavate kemikaalide ja kontrollainete ettevalmistamine

13. Enne katse tegemist hinnatakse lahustuvust. Selleks tehakse uuritavast kemikaalist lahus või püsiv dispersioon kontsentratsiooniga 50 mg/ml; lahustina/kandeainena kasutatakse eelistatavalt täissöödet või kui uuritav kemikaal ei ole täissöötmes lahustuv, siis dimetüülsulfoksiidi (DMSO, puhtusega $\geq 99\%$). Katse tegemiseks lahustatakse uuritav kemikaal täissöötmes lõppkontsentratsioonini 0,4 mg/ml, kui kemikaal on kõnealuses lahustis/kandeaines lahustuv. Kui kemikaal lahustub üksnes DMSOs, lahustatakse kemikaal selles kontsentratsioonil 50 mg/ml. Kui see on teaduslikult piisavalt põhjendatud, võib kasutada ka eespool nimetatutest erinevat lahustit/kandeainet. Tuleks võtta arvesse uuritava kemikaali püsivust lahustit/kandeainet sisaldavas lõpplahuses.
14. Uuritavad kemikaalid ja kontrollained valmistatakse ette katse tegemise päeval. Kuna annuse kindlaksmääramise katset ei tehta, kasutatakse esimeses analüüsitsüklis kuut lõppkontsentratsiooni (1, 10, 20, 50, 100 ja 200 µg/ml) vastavas lahustis/kandeaines, milleks on kas täissööde või 0,4 % DMSO-d sisaldav sööde. Järgnevate analüüsitsüklite jaoks valmistatakse uuritavast kemikaalist vastava lahusti/kandeaine abil vähemalt neli töölahust (st vähemalt nelja eri kontsentratsiooniga); seejuures alustatakse täissöötmes lahustamisel kontsentratsioonist 0,4 mg/ml ja DMSOs lahustamisel kontsentratsioonist 50 mg/ml. Lõpuks lisatakse töölahustega töötlemiseks plaadil olevale töölahusele võrdne kogus U937 rakkude suspensiooni (vt punkt 11), et saavutada täiendav kahekordne lahjendus (12). Võimalikes täiendavates analüüsitsüklites kasutatavad kontsentratsioonid (vähemalt neli) valitakse kõigi eelnenud analüüsitsüklite tulemuste põhjal (8). Kasutamiseks sobivad lõppkontsentratsioonid on 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 ja 200 µg/ml. Suurim lubatud lõppkontsentratsioon on 200 µg/ml. Kui kontsentratsioonil 1 µg/ml täheldatakse CD86 puhul positiivset väärtust, hinnatakse kontsentratsiooni 0,1 µg/ml, et leida uuritava kemikaali selline kontsentratsioon, mille juures CD86-põhist positiivsuse läviväärtust ei

ületata. Igas analüüsitsükli, kus täheldatakse CD86-põhist kontsentratsioonist sõltuvat positiivset reaktsiooni, arvutatakse EC150 (kemikaali kontsentratsioon, mille juures saavutatakse CD86-põhine positiivsuse läviväärtus 150 %; vt punkt 19). Kui uuritav kemikaal kutsub esile kontsentratsioonist sõltumatu positiivse CD86-põhise reaktsiooni, ei pruugi EC150 arvutamine olla asjakohane, nagu on kirjeldatud U-SENS™-i käsitlevas DB-ALMi katse-eeskirjas nr 183 (12). Igas analüüsitsükli arvutatakse võimaluse korral alati CV70 (kontsentratsioon, mille juures kemikaali tsütotoksilisus saavutab läviväärtuse 70 %; vt punkt 19) (12). Et uurida CD86 taseme tõusu sõltuvust kontsentratsioonist, tuleks kasutamiseks sobivate kontsentratsioonide hulgast valida sellised kontsentratsioonid, mis on ühtlaselt jaotunud vahemikus EC150-st (või suurimast mittetsütotoksilisest kontsentratsioonist, mille juures CD86-põhine tulemus on negatiivne) kuni CV70-ni (või suurima lubatud kontsentratsioonini 200 µg/ml). Igas analüüsitsükli tuleks kasutada vähemalt nelja kontsentratsiooni, millest kaks peaksid võrdlemise võimaldamiseks olema samad kui eelnenud analüüsitsükli(te)s.

15. U-SENS™-i puhul kontrollina kasutatav lahusti/kandeaine on täissööde (kui uuritavast kemikaalist tehakse lahus või püsiv dispersioon söötmes) (vt punkt 4) või 0,4 % DMSO täissöötmes (kui uuritavast kemikaalist tehakse lahus või püsiv dispersioon DMSOs).
16. U-SENS™-i puhul kasutatav positiivne kontroll on TNBS (vt punkt 11), mille ettevalmistamiseks kasutatakse täissöödet. TNBSi tuleks CD86 ekspressiooni mõõtmisel kasutada plaadil positiivse kontrollina ühes lõppkontsentratsioonis (50 µg/ml), mille puhul rakkude eluvõimelisus on > 70 %. TNBSi kasutamiseks plaadil kontsentratsioonis 50 µg/ml valmistatakse TNBSist täissöötmes 1 M põhilahus (st kontsentratsiooniga 293 mg/ml) ning lahjendatakse seda seejärel täissöötmes 2930 korda, et saada töölahus kontsentratsiooniga 100 µg/ml. Negatiivse kontrollina tuleks kasutada piimhapet (CASI nr: 50-21-5), mille põhilahusest kontsentratsiooniga 0,4 mg/ml valmistatakse täissöötmes lahus kontsentratsiooniga 200 µg/ml. Igas analüüsitsükli valmistatakse igal plaadil ette kolm täissöödet sisaldava töötlemata kontrolli, lahustiga/kandeainega kontrolli ning negatiivse ja positiivse kontrolli paralleelproovi (12). Võib kasutada ka mõnda muud sobivat positiivset kontrolli, kui on olemas varasemad andmed, mis võimaldavad kindlaks määrata võrreldavad analüüsitsükli nõuetekohasuse kriteeriumid. Kõnealused analüüsitsükli nõuetekohasuse kriteeriumid on samad kui uuritava kemikaali puhul (vt punkt 12).

Uuritavate kemikaalide ja kontrollainetega töötlemine

17. Punktides 14–16 kirjeldatud lahustiga/kandeainega kontrollproovid ja töölahused segatakse 96-kannulisele lamedapõhjalisele plaadile kantud rakususpensiooniga (vt punkt 12) mahuvahekorras 1 : 1. Seejärel inkubeeritakse töödeldavaid plaate 37 °C juures 5-protsendilise CO₂-sisaldusega atmosfääris 45 ± 3 tundi. Enne inkubeerimist kaetakse

plaadid poolläbilaskva membraaniga, et takistada lenduvate uuritavate kemikaalide aurustumist ja uuritavate kemikaalidega töödeldud rakkude ristsaastumist (12).

Rakkude värvimine

18. Pärast 45 ± 3 tundi kestnud kokkupuudet viiakse rakud V-kujuliste kannudega mikrotiiterplaadile ja kogutakse tsentrifuugimise teel. Lahustuvushäire korral tekivad kristallid või tilgad, mis on mikroskoobi all vaadeldavad pärast 45 ± 3 tunni pikkust töötlemist (enne rakkude värvimist). Supernatant visatakse ära ja allesjäänud rakke pestakse üks kord 100 µl jääkülmas fosfaadiga puhverdatud soolalahuses (PBS), mis sisaldab 5 % veiselooteseerumit (värvimispuhver). Pärast tsentrifuugimist suspendeeritakse rakud uuesti 100 µl värvimispuhvril ja neid värvitakse 4 °C juures 30 minuti vältel valguse eest kaitstult 5 µl (nt 0,25 µg) CD86-vastase antikehaga või hiire IgG1ga (isotüübikontroll), mis on märgistatud FITCga. Tuleks kasutada U-SENS™-i käsitlevas DB-ALMi katse-eeskirjas nr 183 (12) kirjeldatud antikehasid (CD86 puhul: BD-PharMingen, katalooginumber 555657, kloon Fun-1, või Caltag/Invitrogen, katalooginumber MHCD8601, kloon BU63; IgG1 puhul: BD-PharMingen, katalooginumber 555748, või Caltag/Invitrogen, katalooginumber GM4992). Katsemeetodi väljatöötajate kogemuste põhjal on eri partiide antikehade fluorestsentssignaali tugevus tavaliselt sarnane. Katses võib kasutada muid kloone või muu tarnija antikehi, millega on edukalt viidud läbi reageerimisvõime kontroll (vt punkt 11). Kasutajad võivad siiski kaaluda antikehade tiitrimist oma labori tingimustes, et teha kindlaks kõige paremad kasutamiseks sobivad kontsentratsioonid. Mõnda muud tuvastamissüsteemi, näiteks muu fluorokroomiga märgistatud CD86-vastaseid antikehasid võib kasutada juhul, kui näiteks katsetega, mis tehakse liites 2.2 loetletud pädevusainetega, on võimalik tõendada, et asjaomaste antikehade ja FITCga konjugeeritud antikehade puhul saadavad tulemused on sarnased. Pärast vähemalt kaks korda 100 µl värvimispuhvriga ja üks kord 100 µl jääkülma PBSiga pesemist suspendeeritakse rakud uuesti jääkülmas PBSis (nt katsuti kaupa käsitsi analüüsivavate proovide puhul 125 mikrolitris või proovide automaatsisestamiseks ette nähtud plaadi kasutamisel 50 mikrolitris) ning lisatakse PI lahus (lõppkontsentratsioon 3 µg/ml). Võib kasutada ka muid tsütotoksilisuse markereid, näiteks 7-aminoaktinomütsiin D-d (7-AAD) või trüpaansinist, kui näiteks katsetega, mis tehakse liites 2.2 loetletud pädevusainetega, on võimalik tõendada, et asjaomase muu värvainega ja PIga saadavad tulemused on sarnased.

Läbivoolutsütomeetriga analüüsimine

19. CD86 ekspressioonitaset ja rakkude eluvõimelisust analüüsitakse läbivoolutsütomeetriga. Esimeses väravas R1 täheldatava rakupopulatsiooni selgeks tuvastamiseks ja rakuprügi elimineerimiseks kujutatakse rakke suuruse (FSC) ja granulaarsuse (SSC) punktdiagrammil, mis on esitatud logaritmskaalal. Iga kannu kohta registreeritakse väravas

R1 kokku 10 000 rakku. Sama värava R1 rakke kujutatakse FL3 või FL4 ja SSC punktdiagrammil. Eluvõimeliste rakkude eristamiseks kasutatakse teist väravat R2, mille abil valitakse välja propiidiumjodiidi suhtes negatiivsete rakkude populatsioon (kanal FL3 või FL4). Tsütomeetri analüüsiprogrammi abil rakkude eluvõimelisuse arvutamiseks võib kasutada allpool esitatud valemit. Kui rakkude eluvõimelisus on väike, võib registreerida koos surnud rakkudega kokku kuni 20 000 rakku. Teine võimalus on registreerida andmeid ühe minuti jooksul alates analüüsi alustamise hetkest.

$$\text{Rakkude eluvõimelisus} = \frac{\text{elusate rakkude arv}}{\text{registreeritud rakkude üldarv}} \times 100$$

Seejärel mõõdetakse väravas R2 (R1 sees) olevate eluvõimeliste rakkude seas kanalis FL1 positiivsena registreeritud rakkude protsentuaalne osakaal. CD86 ekspressiooni rakkude pinnal analüüsitakse eluvõimelisi rakke (R2) kujutaval FL1 ja SSC punktdiagrammil.

Täissöötmega/IgG1ga kannude puhul seadistatakse analüüsimarker põhipopulatsioonile lähedale selliselt, et IgG1 signaaliga rakkude osakaal täissöötmega kontrollides jääks vahemikku 0,6–0,9 %.

Värvusest tulenev segav mõju avaldub nihkena FITCga märgistatud IgG1 punktdiagrammil (kanalis FL1 registreeritud IgG1 signaalile vastava SI geomeetriline keskmine on ≥ 150 %).

Töötlemata või 0,4 % DMSOd sisaldavate kontrollproovide rakkude ja kemikaaliga töödeldud rakkude CD86 stimulatsiooniindeks arvutatakse vastavalt järgmisele valemile:

$$SI = \frac{CD86^{+}\text{-rakkude \% töödeldud proovis} - IgG1^{+}\text{-rakkude \% töödeldud proovis}}{CD86^{+}\text{-rakkude \% kontrollis} - IgG1^{+}\text{-rakkude \% kontrollis}} \times 100 .$$

IgG1⁺-rakkude % töötlemata kontrollis – töötlemata eluvõimeliste rakkude seas analüüsimarkeriga kindlaks määratud, kanalis FL1 registreeritud positiivsete IgG1 signaaliga rakkude protsentuaalne osakaal (lubatav vahemik on $\geq 0,6$ % ja $< 1,5$ %; vt punkt 22).

IgG1⁺/CD86⁺-rakkude % kontrollis/töödeldud proovis – kanalis FL1 registreeritud positiivsete IgG1/CD86 signaaliga rakkude protsentuaalne osakaal, mille mõõtmisel ei ole analüüsimarkerit eluvõimeliste kontrollrakkude / töödeldud rakkude suhtes nihutatud.

ANDMED JA ARUANDLUS

Andmete hindamine

20. U-SENSTM-i puhul arvutatakse järgmised näitajad: CV70 väärtus ehk kontsentratsioon, mille juures elusate U937 rakkude osakaal on 70 % (tsütotoksilisus on 30 %), ja EC150 väärtus ehk kontsentratsioon, mille juures uuritava kemikaali põhjustatud CD86 stimulatsiooniindeks (SI) on 150 %.

CV70 arvutatakse log-lineaarse interpolatsiooni teel järgmise valemiga:

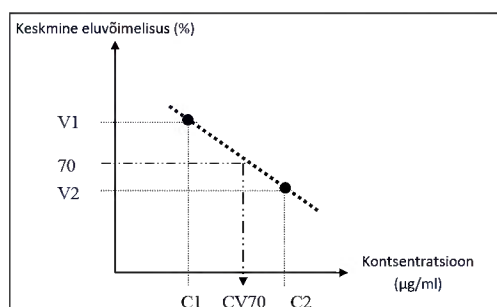
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)],$$

kus

V1 on rakkude eluvõimelisuse vähim väärtus, mis ületab 70 %,

V2 on rakkude eluvõimelisuse suurim väärtus, mis jääb alla 70 %, ning

C1 ja C2 on kontsentratsioonid, mille juures rakkude eluvõimelisus on vastavalt V1 või V2.



CV70 leidmiseks on lubatud kasutada ka muid meetodeid, kui on tõendatud (nt katsetega, mis on tehtud pädevusainetega), et see ei mõjuta tulemusi.

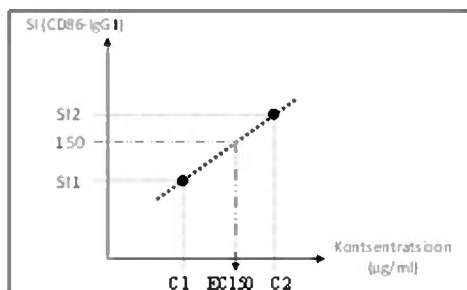
EC150 arvutatakse log-lineaarse interpolatsiooni teel järgmise valemiga:

$$EC150 = C1 + [(150 - SI1) / (SI2 - SI1) * (C2 - C1)],$$

kus

C1 on suurim kontsentratsioon (µg/ml), mille juures CD86 SI < 150 % (SI1), ja

C2 on vähim kontsentratsioon (µg/ml), mille juures CD86 SI ≥ 150 % (SI2).



EC150 ja CV70 väärtused arvutatakse järgmiselt:

- iga analüüsitsükli puhul saadud konkreetseid EC150 ja CV70 väärtusi kasutatakse selleks, et uurida CD86 taseme tõusu sõltuvust kontsentratsioonist (vt punkt 14);
- keskmiste eluvõimelisuse väärtuste põhjal tehakse kindlaks üldine CV70 (12);
- keskmiste CD86 SI väärtuste põhjal tehakse U-SENSTM-i kohase prognoosi järgi POSITIIVSEKS loetud uuritava kemikaali puhul (vt punkt 21) kindlaks üldine EC150 (12).

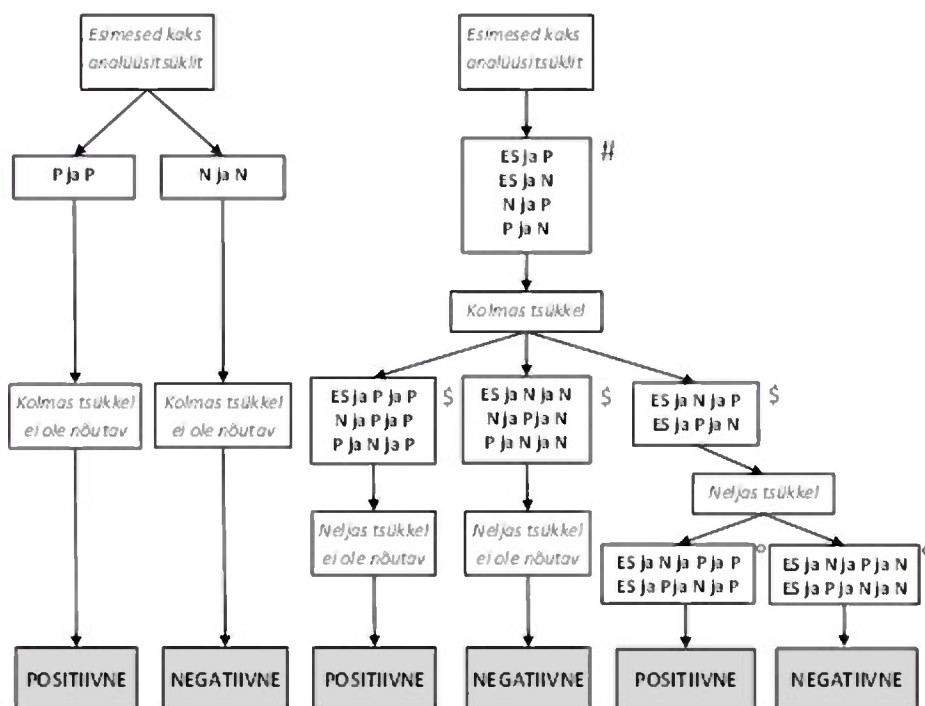
Prognoosimudel

21. CD86 ekspressiooni mõõtmisel hinnatakse iga uuritavat kemikaali vähemalt neljal kontsentratsioonil ja vähemalt kahes sõltumatus eri päeval läbi viidavas analüüsitsükli, mille põhjal tehakse üks prognoosijäreldus (NEGATIIVNE või POSITIIVNE).

- U-SENSTM-i iga üksiku analüüsitsükli kohast prognoosi käsitatakse negatiivsena (N), kui CD86 SI on kõigil mittetsütotoksilistel kontsentratsioonidel (rakkude eluvõimelisus on $\geq 70\%$) alla 150 % ja ei täheldata segavat mõju (seoses tsütotoksilisusega, lahustuvusega (vt punkt 18) või värvusega (vt punkt 19), olenemata mittetsütotoksilisest kontsentratsioonist, mille juures segav mõju ilmneb). Kõigil muudel juhtudel – kui CD86 SI on 150 % või suurem ja/või täheldatakse segavat mõju – käsitatakse U-SENSTM-i iga üksiku analüüsitsükli kohast prognoosi positiivsena (P).
- U-SENSTM-i kohast prognoosi käsitatakse NEGATIIVSENA, kui vähemalt kahe sõltumatu analüüsitsükli kohased prognoosid on negatiivsed (N) (joonis 1). Kui kahes esimeses analüüsitsükli saadakse negatiivne (N) tulemus, siis tunnistatakse U-SENSTM-i kohane prognoos NEGATIIVSEKS ja kolmandat analüüsitsükli ei ole vaja läbi viia.
- U-SENSTM-i kohast prognoosi käsitatakse POSITIIVSENA, kui vähemalt kahe sõltumatu analüüsitsükli kohased prognoosid on positiivsed (P) (joonis 1). Kui kahes esimeses analüüsitsükli saadakse positiivne (P) tulemus, siis tunnistatakse U-SENSTM-i kohane prognoos POSITIIVSEKS ja kolmandat analüüsitsükli ei ole vaja läbi viia.
- Kuna annuse kindlaksmääramise katset ei tehta, käsitatakse erandina olukorda, kus esimeses analüüsitsükli on CD86 SI 150 % või suurem üksnes suurimal mittetsütotoksilisel kontsentratsioonil. Sel juhul käsitatakse analüüsitsükli saadud tulemust EBASELGENA (ES) ning tuleks läbi viia täiendavad analüüsitsükli, kus kasutatakse ka muid kontsentratsioone (mis jäävad suurima mittetsütotoksilise ja vähima tsütotoksilise kontsentratsiooni vahele; vt punkt 20). Kui analüüsitsükli tulemus on ES, tuleks läbi viia veel vähemalt kaks analüüsitsükli, millele lisandub neljas analüüsitsükkel juhul, kui teise ja kolmanda tsükli tulemused (teineteisest sõltumatult N ja/või P) ei lange kokku (joonis 1). Täiendavate analüüsitsükli tulemust käsitatakse positiivsena isegi juhul, kui CD86 SI väärtust 150 % või enam täheldatakse üksnes ühel mittetsütotoksilisel kontsentratsioonil, sest kontsentratsioone on kohandatud vastavalt konkreetsele uuritavale

kemikaalile. Lõplik prognoos tehakse selle põhjal, millise tulemuse osakaal on kolme või nelja eraldi analüüsitsükli lõikes suurem (st kaks kolmest või kaks neljast) (joonis 1).

Joonis 1. U-SENSTM-i puhul kasutatav prognoosimudel; U-SENSTM-i kohast prognoosi tuleks vaadelda ühtse lähenemisviisi raames ning kooskõlas punkti 4 ja üldise sissejuhatuse punktide 7, 8 ja 9 nõuetega



N – analüüsitsükkel, kus CD86 ei ole positiivne ja segavat mõju ei täheldata;

P – analüüsitsükkel, kus CD86 on positiivne ja/või täheldatakse segavat mõju;

ES – ebaselge; ebaselge tulemusega esimene analüüsitsükkel, kus CD86 on positiivne üksnes suurima mittetsütotoksilise kontsentratsiooni juures;

– üksnes esimese analüüsitsükli põhjal ebaselgeks (ES) loetud üksiktulemus tingib automaatselt vajaduse viia läbi kolmas analüüsitsükkel, et saavutada positiivsete (P) või negatiivsete (N) tulemuste ülekaal vähemalt kolmest sõltumatust analüüsitsüklist vähemalt kahes;

\$ – kastides on esitatud kolme analüüsitsükli tulemuste kombinatsioonid lähtuvalt ülemises kastis esitatud kahe esimese tsükli tulemustest;

° – kastides on esitatud nelja analüüsitsükli tulemuste kombinatsioonid lähtuvalt ülemises kastis esitatud kolme esimese tsükli tulemustest.

Nõuetekohasuse kriteeriumid

22. Meetodi U-SENSTM kasutamisel peaksid olema täidetud järgmised katse nõuetekohasuse kriteeriumid (12).

- U937 rakkude keskmine eluvõimelisus kolmes töötlemata paralleelproovis peab 45 ± 3 tundi kestnud kokkupuute lõpus olema $> 90 \%$ ja CD86 ekspressioonis ei tohi esineda triivi. Töötlemata U937 rakkude CD86 ekspressiooni baastasemele vastav väärtus peab jääma vahemikku $\geq 2 \%$ ja $\leq 25 \%$.
- DMSO kasutamisel lahustina arvutatakse DMSO juuresolekul saadud SI võrrelduna töötlemata rakkudega saadud SIga, et hinnata kandeainena DMSOd sisaldava kontrolli nõuetekohasust; seejuures peab kolme paralleelproovi rakkude keskmine eluvõimelisus olema $> 90 \%$. Kandeainena DMSOd sisaldav kontroll on nõuetekohane, kui selle kolme paralleelprooviga saadud CD86 SI keskvärtus on väiksem kui 250% töötlemata U937 rakkude kolme paralleelprooviga saadud CD86 SI keskvärtusest.
- Analüüsitsüklitel tunnistatakse nõuetekohaseks, kui töötlemata U937 rakkude puhul jääb vähemalt kaks kolmest IgG1ga saadud signaali väärtusest vahemikku $\geq 0,6 \%$ ja $< 1,5 \%$.
- Samaaegselt hinnatav negatiivne kontroll (piimhappega) tunnistatakse nõuetekohaseks, kui kolmest paralleelproovist vähemalt kaks on negatiivsed (CD86 SI on $< 150 \%$) ja neis ei täheldata tsütotoksilisust (rakkude eluvõimelisus on $\geq 70 \%$).
- Positiivne kontroll (TNBSiga) tunnistatakse nõuetekohaseks, kui kolmest paralleelproovist vähemalt kaks on positiivsed (CD86 SI on $\geq 150 \%$) ja neis ei täheldata tsütotoksilisust (rakkude eluvõimelisus on $\geq 70 \%$).

Katseprotokoll

23. Katseprotokoll peaks sisaldama järgmist teavet.

Uuritav kemikaal

Ühest koostisosast koosnev aine:

- kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus(ed) ja CASi number/numbrid, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem ja/või muu identimisteave;
- füüsiline välimus, lahustuvus täissöötmes, lahustuvus DMSOs, molekulmass ja muud asjakohased kättesaadavad andmed füüsikalise-keemiliste omaduste kohta;
- puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;
- vajaduse korral teave töötlemise kohta enne katset (nt soojendamine, peenestamine);
- kasutatud kontsentratsioon(id);
- kättesaadav teave säilitamistingimuste ja püsivuse kohta;
- iga uuritava kemikaali puhul lahusti/kandeaine valimise põhjendus.

Mitme koostisosast koosnev aine, tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne

reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal või segu:

- võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt näiteks koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), puhtusest, kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohaseid füüsikalis-keemilisi omadusi käsitlevatest kättesaadavatest andmetest (vt eespool);
- füüsiline välimus, lahustuvus täissöötmes, lahustuvus DMSOs ja muud asjakohased kättesaadavad andmed füüsikalis-keemiliste omaduste kohta;
- teadaoleva koostisega segu/polümeeri puhul molekulmass või näiline molekulmass või muu uuringu tegemiseks asjakohane teave;
- vajaduse korral teave töötlemise kohta enne katset (nt soojendamine, peenestamine);
- kasutatud kontsentratsioon(id);
- kättesaadav teave säilitamistingimuste ja püsivuse kohta;
- iga uuritava kemikaali puhul lahusti/kandeaine valimise põhjendus.

Kontrollid

Positiivne kontroll:

- kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus(ed) ja CASi number/numbrid, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem ja/või muu identimisteave;
- füüsiline välimus, lahustuvus DMSOs, molekulmass ja vajaduse korral muud asjakohased kättesaadavad andmed füüsikalis-keemiliste omaduste kohta;
- puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;
- vajaduse korral teave töötlemise kohta enne katset (nt soojendamine, peenestamine);
- kasutatud kontsentratsioon(id);
- kättesaadav teave säilitamistingimuste ja püsivuse kohta;
- vajaduse korral viide varasematele positiivse kontrolliga saadud tulemustele, millest nähtub vastavus asjakohastele analüüsitsükli nõuetekohasuse kriteeriumidele.

Negatiivne ja lahustiga/kandeainega kontroll:

- kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus(ed) ja CASi number/numbrid, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem ja/või muu identimisteave;
- puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

- asjaomases katsejuhendis nimetamata lahusti/kandeaine kasutamisel kontrollina kättesaadav teave selle füüsilise välimuse, molekulmassi ja muude asjakohaste füüsikalise-keemiliste omaduste kohta;
- kättesaadav teave säilitamistingimuste ja püsivuse kohta;
- iga uuritava kemikaali puhul lahusti/kandeaine valimise põhjendus.

Katsetingimused:

- sponsori, katselabori ja uuringu juhi nimi ja aadress;
- kasutatud katsemeetodi kirjeldus;
- kasutatud rakuliin, selle säilitamistingimused ning päritolu (nt asutus, kellelt rakud saadi);
- kasutatud läbivoolutsütomeeter (nt mudel) ja selle seaded, kasutatud globuliin, antikehad ja tsütotoksilisuse marker;
- pädevusainete analüüsimise meetod, mida kasutati labori pädevuse tõendamiseks, ning katsemeetodiga saadud tulemuste pikaajalise reprodutseeritavuse tõendamise viis, näiteks laboris kontrollidega ja/või reageerimisvõime kontrollimisel varem saadud andmed.

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid:

- lahustiga/kandeainega kontrolli puhul saadud rakkude eluvõimelisuse ja CD86 SI väärtused võrrelduna vastavate nõuetekohasust kajastavate vahemikega;
- positiivse kontrolliga saadud rakkude eluvõimelisuse ja SI väärtused võrrelduna vastavate nõuetekohasust kajastavate vahemikega;
- rakkude eluvõimelisus uuritud kemikaali igal katses kasutatud kontsentratsioonil.

Katse käik:

- analüüsitsükli arv;
- uuritava kemikaali kontsentratsioonid, lisamisviis ja kasutatud kokkupuuteaeg (kui erineb soovitatust);
- kokkupuute kestus;
- kasutatud hindamis- ja otsustamiskriteeriumide kirjeldus;
- kõikide katse käigus tehtud muudatuste kirjeldus.

Tulemused:

- tabeli kujul andmed uuritava kemikaali ja positiivse kontrolli kohta igas analüüsitsüklis, sh CV70 (vajaduse korral), SI, rakkude eluvõimelisuse väärtused, EC150 väärtused (vajaduse korral) ja prognoosimudelil põhinev hinnang uuritava kemikaali kohta;

- vajaduse korral mis tahes muude asjakohaste vaatlusandmete kirjeldus.

Tulemuste arutelu:

- U-SENSTM-iga saadud tulemuste arutelu;
- katse tulemuste hindamine ühtse lähenemisviisi kontekstis, kui muu asjakohane teave on kättesaadav.

Järeldused

KIRJANDUS

- (1) Piroird, C., Ovigne, J. M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., ja 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) ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Kättesaadav aadressil http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations.
- (3) 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. Kättesaadav aadressil [<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705>].
- (4) ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28553 EN; doi 10.2760/588955. Kättesaadav aadressil <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 and Assessment No. 256. ENV/JM/MONO(2016)29. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis. Kättesaadav aadressil [<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., ja 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., ja 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., ja 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., ja 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 on Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis. Kättesaadav aadressil 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). 33 lk. Kättesaadav aadressil <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>.
- (13) Sundström, C., ja Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17: 565–577.
- (14) OECD (2005). Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Series on Testing and Assessment No. 34. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis. Kättesaadav aadressil <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (15) Ühinenud Rahvaste Organisatsioon (ÜRO) (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6. Kuues, täiendatud väljaanne. United Nations Publications, New York ja Genf. Kättesaadav aadressil http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
- (16) 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. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis. Kättesaadav aadressil <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.

- (17) ECETOC (2003). Contact Sensitization: Classification According to Potency. Technical Report No. 87. Euroopa Kemikaalide Ökotoksikoloogia ja Toksikoloogia Keskus, Brüssel. Kättesaadav aadressil https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

Liide 2.1

MÕISTED

Aine – looduslik või mis tahes tootmisprotsessi tulemusena saadud keemiline element või selle ühend koos püsivuse tagamiseks vajalike lisaainete ja tootmisprotsessi käigus tekkinud lisanditega, mis ei hõlma siiski lahusteid, mida on võimalik aine püsivust mõjutamata või selle koostist muutmata ainest eraldada.

Analüüsitsükl – ühe või mitme uuritava kemikaali analüüsimine lahustiga/kandeainega kontrolli ja positiivse kontrolliga paralleelselt.

Asjakohasus – näitaja, mille abil kirjeldatakse, kuivõrd katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat toimet, kas selle kasutamine on mõttekas ja kas see on konkreetse eesmärgi jaoks sobiv. Asjakohasusest nähtub, mil määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või ennustada huvipakkuvat bioloogilist toimet. Asjakohasuse puhul võetakse arvesse ka katsemeetodiga saavutatavat täpsust (vastavust) (14).

CD86le avalduv kontsentratsioonist sõltuv mõju – sõltuvus kontsentratsioonist esineb juhul, kui positiivse tulemuse ($CD86\ SI \geq 150$) saamiseks vajalikule kontsentratsioonile järgneval kontsentratsioonil täheldatakse CD86 SI suurenemist.

CV70 – hinnanguline kontsentratsioon, mille juures rakkude eluvõimelisus on 70 %.

EC150 – hinnanguline kontsentratsioon, mille puhul CD86 ekspressiooni kajastav SI on 150 %.

Kahjuliku toime rada – sündmuste ahel alates sihtkemikaali või rühma sarnaste kemikaalide keemilisest struktuurist sõltuvast käivitavast molekulaarsest sündmusest kuni vaadeldava toime avaldumiseni *in vivo* (15).

Katsete tegemist ja hindamist käsitlev ühtne lähenemisviis – struktureeritud lähenemisviis, mida kasutatakse kemikaali või rühma kemikaalide ohtlikkuse tuvastamiseks (võimalik toime), ohu kirjeldamiseks (toime tugevus) ja/või ohutuse hindamiseks (võimalik toime / toime tugevus ja kokkupuude) ning mille raames lõimitakse strateegiliselt ja kaalutakse läbi kõik asjakohased andmed võimalikku ohtu ja/või riski ja/või täiendavate sihipäraste ja seega minimaalses ulatuses katsete tegemise vajadust käsitleva regulatiivse otsuse tegemiseks.

Kemikaal – aine või segu.

Lahustiga/kandeainega kontroll – töötlemata proov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente peale uuritava kemikaali, sealhulgas lahustit/kandeainet. Selle abil tehakse kindlaks lähtetase samas lahustis/kandeaines lahustatud või püsiva dispersiooni moodustanud uuritava kemikaaliga töödeldud proovide jaoks. Kui sellist töötlemata proovi

hinnatakse paralleelselt söötmega kontrolliga, võimaldab see ühtlasi kindlaks teha, kas lahusti/kandeaine mõjutab katsesüsteemi.

Läbivoolutsütomeetria – tsütomeetriline meetod, mille puhul vedelikus suspendeeritud rakud liiguvad üksteise järel läbi ergastava valguse fookuse ning sellest tingitud valguse hajumise viis kajastab rakkude ja nende koostisosade omadusi; sageli märgistatakse rakud fluorestseeruvate markeritega, mille puhul valgus kõigepealt neeldub ja seejärel kiirgub muutunud sagedusel.

Mitmest koostisosast koosnev aine – aine, mis on määratletud kvantitatiivse koostise alusel ja milles enam kui ühe põhikoostisosa sisaldus on vähemalt 10, kuid väiksem kui 80 massiprotsenti. Mitmest koostisosast koosnev aine saadakse tootmisprotsessi tulemusena. Erinevus segu ja mitmest koostisosast koosneva aine vahel seisneb selles, et segu saadakse kahe või enama aine kokku segamisel, ilma et toimuks keemilist reaktsiooni. Mitmest koostisosast koosnev aine saadakse keemilise reaktsiooni tulemusel.

Nõuetekohane katsemeetod – katsemeetod, mille asjakohasust ja usaldusväärsust konkreetse eesmärgi puhul peetakse piisavaks ning mis rajaneb teaduslikult usaldusväärsel põhimõtetel. Katsemeetod ei ole kunagi nõuetekohane absoluutses tähenduses, vaid üksnes seoses teatud kindla eesmärgiga (14).

Ohtlikkus – mõjurit või olukorda iseloomustav omadus, millest võib tuleneda kahjulik toime, kui organism, süsteem või (alam)populatsioon selle mõjuriga kokku puutub.

Positiivne kontroll – paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente ja mida on töödeldud ainega, millega teadaolevalt saadakse positiivne tulemus. Positiivse tulemuse väärtus ei tohiks olla liiga suur, et võimaldada hinnata positiivse kontrolliga saadud tulemuste varieeruvust ajas.

Prehapteenid – kemikaalid, mis muutuvad sensibilisaatoriks abiootilise muundumise, nt oksüdeerumise teel.

Prohapteenid – kemikaalid, mis vajavad nahka sensibiliseeriva toime tekkimiseks ensümaatilist aktiveerimist.

Segu – kahest või enamast ainest koosnev segu või lahus.

SI – stimulatsiooniindeks. Kemikaaliga töödeldud rakkude fluorestsentssignaali tugevuse väärtuste geomeetrilise keskmise suhteline väärtus võrrelduna lahustiga töödeldud rakkude fluorestsentssignaali tugevuse väärtuste geomeetrilise keskmisega.

Spetsiifilisus – katsemeetodiga õigesti negatiivseks/reaktsioonivõimetuks liigitatud uuritavate kemikaalide osakaal kõikide negatiivsete kemikaalide hulgas. Spetsiifilisus kajastab sellise katsemeetodi täpsust, millega saadakse kategoriseeritav tulemus, ning see on oluline näitaja katsemeetodi asjakohasuse hindamiseks (14).

Triiv – triiv esineb juhul, kui i) kolmanda töötlemata kontrollprooviga saadud korrigeeritud $CD86^{+}(\%)$ väärtus on väiksem kui 50 % esimese ja teise töötlemata kontrollprooviga saadud korrigeeritud $CD86^{+}(\%)$ väärtuste keskmisest ning ii) negatiivse kontrolli kolmanda prooviga saadud korrigeeritud $CD86^{+}(\%)$ väärtus on väiksem kui 50 % negatiivse kontrolli esimese ja teise prooviga saadud korrigeeritud $CD86^{+}(\%)$ väärtuste keskmisest.

Tundlikkus – katsemeetodiga õigesti positiivseks/reaktsioonivõimeliseks liigitatud uuritavate kemikaalide osakaal kõikide positiivsete kemikaalide hulgas. Tundlikkus kajastab sellise katsemeetodi täpsust, millega saadakse kategoriseeritav tulemus, ning see on oluline näitaja katsemeetodi asjakohasuse hindamiseks (14).

Täpsus – katsetulemuste ja vastuvõetavate võrdlusväärtuste kooskõla määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks asjakohastest aspektidest. Seda mõistet kasutatakse sageli vastavuse tähenduses, et väljendada katsemeetodiga saadud õigete tulemuste osakaalu (14).

Usaldusväärsus – näitaja, mis iseloomustab katsemeetodiga saadud tulemuste reprodutseeritavust pikema aja jooksul samas laboris ja eri laborites, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel. Usaldusväärsuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline reprodutseeritavus ning laborisisene korratavus (14).

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

UVCB – tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

Värvimispuhver – fosfaadiga puhverdatud soolalahus, mis sisaldab 5 % veiselooteseerumit.

Ühest koostisosast koosnev aine – aine, mis on määratletud kvantitatiivse koostise alusel ja mille ühe põhikoostisosa sisaldus on vähemalt 80 massiprotsenti.

Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem (ÜRO GHS) – süsteem, millega nähakse ette kemikaalide (ainete ja segude) klassifitseerimine vastavalt nende füüsilise ohtlikkuse ning kahjuliku tervise- ja keskkonnamõju standarditud liigile ja tasemele ning mis hõlmab selliseid asjaomaseid teavitustähiseid nagu piktogramm, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskardid, et anda inimeste (sealhulgas tööandjate, töötajate, vedajate, tarbijate ja päästetöötajate) ning keskkonna kaitsmiseks vajalikku teavet kõnealuste kemikaalide kahjuliku toime kohta (16).

Liide 2.2**PÄDEVUSAINED**

Enne katsemetodi B.71 juurde kuuluvas käesolevas liites kirjeldatud meetodi rutiinset kasutamist tuleks tõendada labori tehnilist pädevust. Selleks tuleks U-SENSTM-i kasutamisel saada tabelis 1 esitatud soovitatava kümne aine puhul eeldatavale tulemusele vastav prognoos ning CV70 ja EC150 väärtused, mis jäävad kümnest pädevusainest vähemalt kaheksa puhul asjaomasesse võrdlusvahemikku. Pädevusained on valitud nii, et nende puhul oleksid esindatud naha sensibiliseerimise ohuga seotud eri reaktsioonid. Peale selle on valikukriteeriumidena võetud arvesse ainete kaubanduslikku kättesaadavust, kvaliteetsete *in vivo* võrdlusandmete olemasolu ja U-SENSTM-iga saadud kvaliteetsete *in vitro* andmete olemasolu. Lisaks on U-SENSTM-i kohta olemas avaldatud võrdlusandmed (1, 8).

Tabel 1. U-SENSTM-i kasutamise tehnilise pädevuse tõendamiseks soovitatavad ained

Pädevusained	CASi nr	Füüsik aline olek	<i>In vivo</i> toime prognoos ¹	U- SENS TM Lahusti/ kandeain e	U-SENS TM CV70 võrdlusva hemik, µg/ml ²	U-SENS TM EC150 võrdlusvah emik, µg/ml ²
4-fenüleendiamiin	106-50-3	Tahkis	Sensibilisaator (tugev)	Täissööde ³	< 30	Positiivne (≤ 10)
Pikrüülsulfoonhape	2508-19-2	Vedelik	Sensibilisaator (tugev)	Täissööde	> 50	Positiivne (≤ 50)
Dietüülmaleaat	141-05-9	Vedelik	Sensibilisaator (mõõdukas)	DMSO	10–100	Positiivne (≤ 20)
Resortsinool	108-46-3	Tahkis	Sensibilisaator (mõõdukas)	Täissööde	> 100	Positiivne (≤ 50)
Kaneelalkohol	104-54-1	Tahkis	Sensibilisaator (nõrk)	DMSO	> 100	Positiivne (10–100)
4-allüülanisool	140-67-0	Vedelik	Sensibilisaator (nõrk)	DMSO	> 100	Positiivne (< 200)
Sahhariin	81-07-2	Tahkis	Sensibiliseeriv a toimeta	DMSO	> 200	Negatiivne (> 200)
Glütserool	56-81-5	Vedelik	Sensibiliseeriv a toimeta	Täissööde	> 200	Negatiivne (> 200)
Piimhape	50-21-5	Vedelik	Sensibiliseeriv a toimeta	Täissööde	> 200	Negatiivne (> 200)
Salitsüülhape	69-72-7	Tahkis	Sensibiliseeriv a toimeta	DMSO	> 200	Negatiivne (> 200)

Lühendid: CASi nr – Chemical Abstracts Service'i registrinumber.

¹ *In vivo* ohu (ja toime tugevuse) prognoos põhineb LLNA andmetel (1, 8). *In vivo* toime tugevuse väljendamisel on lähtutud ECETOCi soovitatud kriteeriumidest (17).

² Varasemate katsete andmete põhjal (1, 8).

³ Täissööde – sööde RPMI-1640, mis sisaldab 10 % veiselooteseerumit, 2 mM L-glutamiini, 100 ühikut penitsilliini milliliitri kohta ja streptomütsiini kontsentratsioonis 100 µg/ml (8).

3. liide

NAHA SENSIBILISEERIMINE *IN VITRO*: IL-8 LUTSIFERAASIKATSE

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

1. Erinevalt raku pinnamarkerite ekspressiooni analüüsimiseks ette nähtud katsetest mõõdetakse IL-8 lutsiferaasikatsega muutusi IL-8 ekspressioonis. IL-8 on tsütokiin, mis on seotud dendriitrakkude aktiveerimisega. IL-8 ekspressiooni mõõdetakse THP-1 baasil loodud IL-8 reporterrakuliinis (THP-G8, mis on saadud inimese ägeda monotsüütse leukeemia rakuliinist THP-1) pärast rakkude kokkupuudet sensibilisaatoriga (1). Selle meetodi puhul hinnatakse lutsiferaasi ekspressiooni, et aidata eristada naha sensibilisaatoreid kemikaalidest, mis nahka ei sensibiliseeri.
2. IL-8 lutsiferaasikatse meetodit on hinnatud Alternatiivsete Meetodite Valideerimise Jaapani Keskuse (JaCVAM), **Jaapani majandus-, kaubandus- ja tööstusministeeriumi ning Loomkatsete Alternatiivide Jaapani Ühingu (JSAAE)** läbi viidud valideerimisuuringus (2) ning seejärel on see vastastikuse eksperdihinnangu raames sõltumatult läbi vaadatud (3) JaCVAMi ning Jaapani tervishoiu-, töö- ja sotsiaalministeeriumi egiidi all ning **alternatiivsete meetodite alase rahvusvahelise koostöö foorumi (ICATM)** toetusel. Kõikidest kättesaadavatest andmetest ning reguleerivate asutuste ja sidusrühmade seisukohtadest lähtuvalt peetakse IL-8 lutsiferaasikatset ühtse lähenemisviisi kasulikuks osaks, mis võimaldab aidata ohu alusel klassifitseerimise ja märgistamise eesmärgil eristada naha sensibilisaatoreid kemikaalidest, mis nahka ei sensibiliseeri. Näited IL-8 lutsiferaasikatsega saadud andmete kasutamisest muu teabega kombineerituna on avaldatud kirjanduses (4, 5, 6).
3. IL-8 lutsiferaasikatse meetod on osutunud rakendatavaks laborites, kus on olemas rakukultuuride kasutamise ja lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmise kogemus. Laborisisese ja laboritevahelise reprodutseeritavuse määr on vastavalt 87,7 % ja 87,5 % (2). Valideerimisuuringu (2) ja muude avaldatud tööde (1, 6) andmetest nähtub, et LLNA tulemustega võrreldes liigitati IL-8 lutsiferaasikatsega 143 kemikaalist 118 positiivseks või negatiivseks ja 25 kemikaali puhul oli tulemus ebaselge ning IL-8 lutsiferaasikatses oli naha sensibilisaatorite (ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt 1. kategooria kemikaalide) mittesensibiliseerivatest kemikaalidest (ÜRO GHSi /CLP-määruse kohaselt kategoriseerimata kemikaalidest) eristamise täpsus 86 % (101/118), tundlikkus 96 % (92/96) ja spetsiifilisus 41 % (9/22). Kui allpool kirjeldatud kohaldamisalast (punkt 5) välja jäävad ained kõrvale jätta, liigitati IL-8 lutsiferaasikatsega 136 kemikaalist 113 positiivseks või negatiivseks ja 23 kemikaali puhul oli tulemus ebaselge ning IL-8 lutsiferaasikatse meetodi täpsus oli 89 % (101/113), tundlikkus 96 % (92/96) ja

spetsiifilisus 53 % (9/17). Inimuuringute andmete alusel, millele on osutanud Urbisch *et al.* (7), liigitati IL-8 lutsiferaasikatsega 90 kemikaalist 76 positiivseks või negatiivseks ja 14 kemikaali puhul oli tulemus ebaselge ning meetodi täpsus oli 80 % (61/76), tundlikkus 93 % (54/58) ja spetsiifilisus 39 % (7/18). Kui kohaldamisalast välja jäävad ained kõrvale jätta, liigitati IL-8 lutsiferaasikatsega 84 kemikaalist 71 positiivseks või negatiivseks ja 13 kemikaali puhul oli tulemus ebaselge ning meetodi täpsus oli 86 % (61/71), tundlikkus 93 % (54/58) ja spetsiifilisus 54 % (7/13). IL-8 lutsiferaasikatses valenegatiivsete prognooside saamise tõenäosus on suurem vähesel määral kuni mõõdukalt nahka sensibiliseerivate (ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt alamkategooria 1B) kemikaalide puhul ja väiksem siis, kui tegemist on tugevalt nahka sensibiliseeriva (ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt alamkategooria 1A) kemikaaliga (6). Kokkuvõttes nähtub sellest teabest, et IL-8 lutsiferaasikatset saab kasutada naha sensibiliseerimise ohu kindlakstegemisel. Ainsa meetodina kasutatava IL-8 lutsiferaasikatsega saavutatav eespool nimetatud täpsus on siiski üksnes orienteeriv, sest katseandmeid tuleks vaadelda ühtse lähenemisviisi kontekstis koos muudest allikatest pärit teabega ja kooskõlas üldise sissejuhatuse punktide 8 ja 7 sätetega. Kui hinnatakse naha sensibiliseerimise katsemeetodeid, mille puhul ei kasutata katseloomi, tuleb lisaks meeles pidada, et LLNA ja muude loomkatsete tulemused ei pruugi täielikult kajastada kemikaali toimet inimesele.

4. Praeguse olemasoleva teabe põhjal on tõendatud, et IL-8 lutsiferaasikatse meetod on kohaldatav paljude uuritavate kemikaalide puhul, mis erinevad üksteisest orgaanilise funktsionaalrühma, toimemehhanismi, *in vivo* katsetega määratud nahka sensibiliseeriva toime tugevuse ja füüsikalis-keemiliste omaduste poolest (2, 6).
5. Kuigi kõnealuses IL-8 lutsiferaasikatses kasutatav lahusti on X-VIVO™ 15, võimaldab see katse anda õige hinnangu kemikaalide kohta, mille $\log K_{ow} > 3,5$ ja vees lahustuvus on programmiga EPI Suite™ tehtud arvutuste kohaselt ligikaudu 100 µg/ml, ning tuvastada vees halvasti lahustuvaid nahka sensibiliseerivaid kemikaale tõhusamalt kui IL-8 lutsiferaasikatse, milles kasutatakse lahustina dimetüülsulfoksiidi (DMSO) (2). Ent kontsentratsioonil 20 mg/ml mittelahustuvate kemikaalide puhul saadavad negatiivsed tulemused võivad olla valenegatiivsed, kuna sellised kemikaalid ei lahustu X-VIVO™ 15-s. Seepärast tuleks kõnealuste kemikaalide puhul jätta negatiivsed tulemused arvesse võtmata. Valideerimisuuringus täheldati suurt valenegatiivsete tulemuste määra anhidriidide puhul. Peale selle võidakse kasutatava rakuliini piiratud metaboliseerimisvõime (8) või katsetingimuste tõttu saada katses negatiivseid tulemusi ka prohapteeniidega (ained, mis vajavad metaboolset aktiveerimist) ja prehapteeniidega (ained, mis aktiveeruvad õhus oksüdeerumisel). Ehkki võimaliku pre- või prohapteeni puhul saadavate negatiivsete tulemuste tõlgendamisel tuleks olla ettevaatlik, oli IL-8 lutsiferaasikatset käsitlevas andmestikus esindatud ainete kohta tehtud õigete järelduste määr prehapteeniide puhul 11/11, prohapteeniide puhul 6/6 ja pre-/prohapteeniide puhul 6/8

- (2). Lähtuvalt pre- ja prohapteeni tuvastamiseks kasutatava kolme loomadega mitteseotud katsemeetodi (DPRA, KeratinoSens™ ja h-CLAT) hiljutisest põhjalikust analüüsist (9) ja tulenevalt asjaolust, et IL-8 lutsiferaasikatses kasutatav rakuliin THP-G8 on saadud h-CLATs kasutatavast rakuliinist THP-1, võib IL-8 lutsiferaasikatse meetod muude meetoditega kombineerituna aidata suurendada muudel kui loomkatsetel põhinevate meetodite tundlikkust pre- ja prohapteeni tuvastamisel. Seni uuritud pindaktiivsete ainetele on saadud (vale)positiivsed tulemused, seda olenemata nende liigist (nt katioonid, anioonid või mitteioonid). Lisaks võivad lutsiferaasile segavat mõju avaldavad kemikaalid moonutada selle aktiivsust või mõõtmistulemusi ning seeläbi põhjustada näilist inhibitsiooni või tugevamat luminesentsi (10). Näiteks on muude lutsiferaasipõhiste reportergeenikatsete puhul täheldatud, et fütoöstrogeenid, mis esinevad suuremas kontsentratsioonis kui 1 µM, mõjutavad luminesentsisignaale lutsiferaasi reportergeeni üleaktiveerimise teel. Seepärast tuleb lutsiferaasi ekspressioonitaset, mis on mõõdetud suures kontsentratsioonis esineva fütoöstrogeeni või sellise ühendi juuresolekul, mille puhul kahtlustatakse fütoöstrogeeniga sarnast lutsiferaasi reportergeeni aktiveerivat toimet, hoolikalt analüüsida (11). Eespool kirjeldatust tulenevalt ei kuulu pindaktiivsed ained, anhidriidid ja lutsiferaasile segavat mõju avaldavad kemikaalid käesoleva katsemeetodi kohaldamisalasse. Kui leidub andmeid, mille kohaselt IL-8 lutsiferaasikatset ei saa kasutada mõne muu konkreetse uuritavate kemikaalide rühma puhul, ei tohiks seda asjaomase konkreetse kemikaalirühma puhul kasutada.
6. Nagu eespool kirjeldatud, aitab IL-8 lutsiferaasikatse eristada naha sensibilisaatoreid kemikaalidest, mis nahka ei sensibiliseeri. Täiendavalt on vaja uurida seda, kas IL-8 lutsiferaasikatse tulemusi saab muudest allikatest pärit teabega kombineerituna kasutada toime tugevuse hindamisel; seda tuleks soovitatavalt teha inimuuringutest saadud andmete alusel.
7. Mõisted on esitatud liites 3.1.

KATSE PÕHIMÕTE

8. IL-8 lutsiferaasikatses kasutatakse inimese monotsüüti leukeemia rakuliini THP-1, mis on pärit Ameerika Tüüpkultuuride Kollektsoonist (Manassas, VA, Ameerika Ühendriigid). Selle rakuliini baasil on Tohoku Ülikooli arstiteaduskonna dermatoloogiaosakonnas loodud IL-8 reporterrakuliin THP-G8, mis sisaldab oranži valgust tekitava püsiva lutsiferaasi (SLO) ja punast valgust tekitava püsiva lutsiferaasi (SLR) geene, mis on vastavalt IL-8 ja glütseeraldehüüd-3-fosfaadi dehüdrogenaasi (GAPDH) promootori kontrolli all (1). See võimaldab pärast kokkupuudet sensibiliseeriva kemikaaliga luminesentskiirguse tuvastamise teel kvantitatiivselt mõõta lutsiferaasi geeni aktiveerumist IL-8 ja GAPDH

aktiivsuse näitajana; selleks otstarbeks kasutatakse üldkasutatavaid valgust tekitavaid lutsiferaasi substraate.

9. Kahe värvuse tekitamist võimaldav katsesüsteem koosneb oranži valgust tekitavast lutsiferaasist (SLO; $\lambda_{\text{maks}} = 580 \text{ nm}$) (12), mis võimaldab mõõta IL-8 promootorist sõltuvat geeniekspressiooni, ja punast valgust tekitavast lutsiferaasist (SLR; $\lambda_{\text{maks}} = 630 \text{ nm}$) (13), mis võimaldab mõõta sisemise kontrollina kasutatavat GAPDH promootorist sõltuvat geeniekspressiooni. Jaanimardika D-lutsiferiin kiirgab nende kahe lutsiferaasiga reageerides eri värvi valgust ning tekkivat luminesentskiirgust mõõdetakse üheaegselt üheetapilises reaktsioonis: selleks kasutatakse katsesegust lähtuva valguskiirguse lahutamist optilise filtri abil (14) (liide 3.2).
10. THP-G8 rakke töödeldakse 16 tunni jooksul uuritava kemikaaliga ning seejärel mõõdetakse lutsiferaasi SLO aktiivsus (SLO-LA), mis kajastab IL-8 promootori aktiivsust, ja lutsiferaasi SLR aktiivsus (SLR-LA), mis kajastab GAPDH promootori aktiivsust. Parema arusaadavuse huvides kasutatakse lühendite SLO-LA ja SLR-LA asemel vastavalt tähiseid IL8LA ja GAPLA. Tabelis 1 on esitatud ülevaade IL-8 lutsiferaasikatse puhul kasutatavatest lutsiferaasi aktiivsusega seotud mõistetest. Mõõdetud väärtuste põhjal arvutatakse järgmised näitajad: normaliseeritud IL8LA (nIL8LA), mida väljendatakse IL8LA ja GAPLA suhtarvuna; nIL8LA suurenemine (Ind-IL8LA), mida väljendatakse neljas uuritava kemikaaliga töödeldud THP-G8 rakkude paralleelproovis mõõdetud nIL8LA väärtuste aritmeetilise keskmise ja neljas töötlemata THP-G8 rakkude paralleelproovis mõõdetud nIL8LA väärtuste aritmeetilise keskmise suhtarvuna; GAPLA inhibeerimise määr (Inh-GAPLA), mida väljendatakse neljas uuritava kemikaaliga töödeldud THP-G8 rakkude paralleelproovis mõõdetud GAPLA väärtuste aritmeetilise keskmise ja neljas töötlemata THP-G8 rakkude paralleelproovis mõõdetud GAPLA väärtuste aritmeetilise keskmise suhtarvuna ning mida kasutatakse tsütotoksilisuse näitajana.

Tabel 1. IL-8 lutsiferaasikatse puhul kasutatavad lutsiferaasi aktiivsusega seotud mõisted

Lühendid	Määratlus
GAPLA	Lutsiferaasi SLR aktiivsus, mis kajastab GAPDH promootori aktiivsust
IL8LA	Lutsiferaasi SLO aktiivsus, mis kajastab IL-8 promootori aktiivsust
nIL8LA	IL8LA : GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA kemikaaliga töödeldud THP-G8 rakkudes : nIL8LA töötlemata rakkudes
Inh-GAPLA	GAPLA kemikaaliga töödeldud THP-G8 rakkudes : GAPLA töötlemata rakkudes
CV05	Kemikaali vähim kontsentratsioon, mille juures Inh-GAPLA on < 0,05

11.

12. Siin kirjeldatud IL-8 lutsiferaasikatse meetodiga sarnaste muudetud *in vitro* IL-8 lutsiferaasikatse meetodite valideerimise hõlbustamiseks on olemas tulemuslikkuse standardid (15), mis võimaldavad OECD katsejuhendit 442E selliste meetodite lisamiseks õigeaegselt muuta. OECD otsuse kohane andmete vastastikune tunnustamine on tagatud vaid sellise katsemeetodi puhul, mis on valideeritud kooskõlas tulemuslikkuse standarditega ning mille OECD on läbi vaadanud ja katsejuhendisse 442E lisanud (16).

PÄDEVUSE TÕENDAMINE

13. Enne katsemeetodi B.71 juurde kuuluvas käesolevas liites kirjeldatud meetodi rutiinset kasutamist tuleks tõendada labori tehnilist pädevust ning kasutada selleks liites 3.3 loetletud kümmet pädevusainet kooskõlas *in vitro* meetodeid käsitleva hea tavaga (17). Lisaks peaksid meetodi kasutajad haldama reageerimisvõime kontrollimise käigus kogutud andmeid (vt punkt 15) ning positiivsete ja lahustiga/kandeainega kontrollidega saadud varasemaid andmeid (vt punktid 21–24) sisaldavat andmebaasi ning kontrollima nende andmete põhjal, kas katsetulemused on laboris aja möödudes jätkuvalt reprodutseeritavad.

KATSE KÄIK

14. IL-8 lutsiferaasikatse jaoks on olemas standardne töökord, mida tuleks katsemeetodi rakendamisel kasutada (18). Katset läbi viia soovivad laborid saavad soetada rekombinantse THP-G8 rakuliini Jaapanis Tottoris asuvast ettevõttest GPC Lab. Co. Ltd., kui nad allkirjastavad OECD vormil esitatud tingimustele vastava materjali üleandmise lepingu. Järgmistes punktides on kirjeldatud katsemeetodi põhielemente ja katse käiku.

Rakkude ettevalmistamine

15. IL-8 lutsiferaasikatse tegemiseks tuleks kasutada THP-G8 rakuliini, mis on soetatud Jaapanis Tottoris asuvast ettevõttest GPC Lab. Co. Ltd. (vt punktid 8 ja 13). Pärast rakkude kättesaamist paljundatakse neid (2–4 passaaži) ja säilitatakse need külmutatult homogeense tüvikultuurina. Kõnealuse tüvikultuuri rakkude paljundamiseks võib neid kuni 12 korda ümber külvata või kasvatada neid kuni kuue nädala jooksul. Paljundamiseks kasutatakse söödet RPMI-1640, mis sisaldab 10 % veiselooteseerumit, antibiootikume / seentevastast ainet (0,85 % füsioloogilises lahuses 100 ühikut penitsilliin G-d milliliitri kohta, streptomütsiini kontsentratsioonis 100 µg/ml ja amfoteritsiin B-d kontsentratsioonis 0,25 µg/ml) (nt GIBCO, katalooginumbriga 15240-062), puromütsiini (nt CASi numbriga 58-58-2) kontsentratsioonis 0,15 µg/ml ja G418 (nt CASi numbriga 108321-42-2) kontsentratsioonis 300 µg/ml.
16. Enne rakkude kasutamist katses tuleks teha reageerimisvõime kontroll, et veenduda rakkude sobivuses. Kõnealune kontroll tuleks teha 1–2 nädalat pärast sulatamist või pärast

2–4 korda ümber külvamist ning kasutada selleks positiivse kontrollina 4-nitrobensüülbromiidi (4-NBB) (CASi nr: 100-11-8; puhtus $\geq 99\%$) ja negatiivse kontrollina piimhapet (CASi nr: 50-21-5; puhtus $\geq 85\%$). 4-NBB puhul peaks Ind-IL8LA alusel tuvastatav reaktsioon olema positiivne ($\text{Ind-IL8LA} \geq 1,4$) ja piimhappe puhul negatiivne ($\text{Ind-IL8LA} < 1,4$). Katses kasutatakse üksnes reageerimisvõime kontrolli läbinud rakke. Reageerimisvõime kontroll tuleb teha vastavalt punktides 22–24 esitatud kirjeldusele.

17. Katses kasutamiseks külvatakse THP-G8 rakud välja tihedusega $2\text{--}5 \times 10^5$ rakku/ml ning eelkasvatatakse neid rakukultuuripudelis 48–96 tundi. Katse päeval pestakse rakukultuuripudelid eemaldatud rakke söötmega RPMI-1640, mis sisaldab 10 % veiselooteseerumit, aga ei sisalda antibiootikume, ja rakud suspendeeritakse uuesti 10 % veiselooteseerumit sisaldavas antibiootikumideta söötmes RPMI-1640 tihedusel 1×10^6 rakku/ml. Seejärel jaotatakse rakud 50 μl kaupa 96-kannulise lamedapõhjalise plaadi kannudesse (nt Costar, katalooginumber 3603) (5×10^4 rakku kannu kohta).

Uuritava kemikaali ja kontrollainete ettevalmistamine

18. Uuritav kemikaal ja kontrollained valmistatakse ette katse tegemise päeval. IL-8 lutsiferaasikatse puhul lahustatakse uuritav kemikaal turul kättesaadavas seerumita söötmes X-VIVO™ 15 (Lonza, 04-418Q) lõppkontsentratsioonini 20 mg/ml. X-VIVO™ 15 lisatakse mikrotsentrifuugi katsutis olevale 20 mg uuritavale kemikaalile (olenemata kemikaali lahustuvusest) kuni koguseni 1 ml. Seejärel segatakse lahust ägedalt keerisregistil ja loksutatakse 30 minutit rootori maksimumkiirusel 8 pööret minutis ümbritseva õhu temperatuuril umbes 20 °C juures. Kui katsutisse jääb veel lahustumata tahket kemikaali, töödeldakse seda ultraheliga, kuni kemikaal on täielikult lahustunud või moodustab püsiva dispersiooni. Kui uuritav kemikaal on X-VIVO™ 15-s lahustuv, siis lahjendatakse lahust viis korda X-VIVO™ 15-ga ja kasutatakse saadud lahust X-VIVO™ 15-s lahustatud uuritava kemikaali põhilahusena (4 mg/ml). Kui uuritav kemikaal ei ole X-VIVO™ 15-s lahustuv, loksutatakse segu pöördloksutil veel vähemalt 30 minutit ning tsentrifuugitakse seejärel 5 minutit kiirusel 15 000 pööret minutis ($\approx 20\,000\text{ g}$); saadud supernatanti kasutatakse X-VIVO™ 15-s lahustatud uuritava kemikaali põhilahusena. Muu lahusti, näiteks DMSO, vee või söötme kasutamisel tuleks esitada sellekohane teaduslik põhjendus. Kemikaalide lahustamise korda on üksikasjalikult kirjeldatud liites 3.5. Punktides 18–23 kirjeldatud X-VIVO™ 15 lahused segatakse 96-kannulisele lamedapõhjalisele mustale plaadile kantud rakususpensiooniga (vt punkt 16) mahuvahekorras 1 : 1.
19. Esimese analüüsitsükli puhul on eesmärk teha kindlaks tsütotoksilisuse avaldumise kontsentratsioon ja uurida kemikaali võimet nahka sensibiliseerida. X-VIVO™ 15-s lahustatud uuritava kemikaali põhilahusest tehakse 96-kannulisel katseplaadil (nt Costar,

katalooginumber EW-01729-03) X-VIVO™ 15 abil rida kahekordseid lahjendusi (vt liide 3.5). Seejärel lisatakse 96-kannulisele lamedapõhjalisele mustale plaadile kantud 50 µl rakususpensioonile 50 µl lahjendatud lahust kannu kohta. Nii saadakse X-VIVO™ 15-s lahustuva uuritava kemikaali lõppkontsentratsioonid vahemikus 0,002–2 mg/ml (liide 3.5). Selliste uuritavate kemikaalide puhul, mis X-VIVO™ 15-s kontsentratsioonil 20 mg/ml ei lahustu, tehakse kindlaks ainult lahjendustegurid vahemikus 2–2¹⁰, kuid uuritava kemikaali tegelikud lõppkontsentratsioonid ei ole teada ja sõltuvad uuritava kemikaali küllastuskontsentratsioonist X-VIVO™ 15-s valmistatud põhilahuses.

20. Järgnevates analüüsitsükklites (st teises, kolmandas ja neljandas tsükklis) valmistatakse põhilahus X-VIVO™ 15-s neli korda suurema kontsentratsiooniga, kui oli esimeses tsükklis kasutatud kontsentratsioon, mille juures rakkude eluvõimelisus oli läviväärtusest väiksem (CV05 – väiksem kontsentratsioon, mille juures Inh-GAPLA on < 0,05). Kui Inh-GAPLA ei lange alla 0,05 ka kõige suuremal esimeses analüüsitsükklis kasutatud kontsentratsioonil, valmistatakse põhilahus X-VIVO™ 15-s esimeses analüüsitsükklis kasutatud suurima kontsentratsiooniga. CV05-le vastava kontsentratsiooni arvutamiseks jagatakse esimeses analüüsitsükklis kasutatud põhilahuse kontsentratsioon CV05 puhul kasutatud lahendusteguriga X (lahjendustegur CV05 (X) – lahjendustegur, mida tuleb kasutada põhilahuse lahjendamiseks kontsentratsioonini CV05) (vt liide 3.5). Selliste uuritavate ainete puhul, mis kontsentratsioonil 20 mg/ml X-VIVO™ ei lahustu, tehakse CV05 kindlaks nii, et põhilahuse kontsentratsioon korrutatakse teguriga 1/X. 2.–4. analüüsitsükli jaoks valmistatakse teine põhilahus kontsentratsiooniga 4 × CV05 (liide 3.5).
21. Teisest põhilahusest valmistatakse X-VIVO™ 15-ga 96-kannulisel katseplaadil rida 1,5-kordseid lahjendusi. Seejärel lisatakse 96-kannulise lamedapõhjalise musta plaadi kannudesse kantud 50 µl rakususpensioonile 50 µl lahjendatud lahust kannu kohta. Iga uuritavat kemikaali tuleks igal kontsentratsioonil analüüsida neljas kannus. Järgnevalt segatakse proovid plaadiloksutil ja neid inkubeeritakse 37 °C juures 5-protsendilise CO₂-sisaldusega atmosfääris 16 tundi. Seejärel mõõdetakse lutsiferaasi aktiivsus allpool kirjeldatud viisil.
22. Lahustiga kontrollina kasutatakse segu, mis sisaldab kannu kohta 50 µl X-VIVO™ 15 ja 50 µl rakususpensiooni 10 % veiselooteseerumit sisaldavas RPMI-1640-s.
23. Soovitatav positiivse kontrolli aine on 4-NBB. 1,5 ml mikrotsentrifuugi katsutisse viiakse 20 mg 4-NBBd ning lisatakse X-VIVO™ 15 kuni koguseni 1 ml. Lahust segatakse ägedalt keerisregistil ja loksutatakse vähemalt 30 minutit jooksul rootori maksimumkiirusel 8 pööret minutis. Pärast 5 minutit tsentrifuugimist kiirendusega 20 000 g lahjendatakse supernatanti X-VIVO™ 15-ga neli korda ning 500 µl lahjendatud supernatanti kantakse 96-kannulise katseplaadi ühte kannu. Lahjendatud supernatanti lahjendatakse X-VIVO™ 15-ga uuesti kaks ja neli korda ning igast saadud lahusest lisatakse 50 µl 96-kannulise

lamedapõhjalise musta plaadi kannudesse, mis sisaldavad 50 µl THP-G8 rakkude suspensiooni (liide 3.6). Positiivset kontrolli tuleks igal kontsentratsioonil analüüsida neljas kannus. Plaati loksutatakse plaadiloksutil ja inkubeeritakse CO₂ inkubaatoris 37 °C juures 5-protsendilise CO₂-sisaldusega atmosfääris 16 tundi. Seejärel mõõdetakse punktis 29 kirjeldatud viisil lutsiferaasi aktiivsus.

24. Soovitatav negatiivse kontrolli aine on piimhape. 1,5 ml mikrotsentrifuugi katsutisse viiakse 20 mg piimhapet ning lisatakse X-VIVO™ 15 kuni koguseni 1 ml (20 mg/ml). Piimhappelahust kontsentratsiooniga 20 mg/ml lahjendatakse X-VIVO™ 15-ga veel viis korda (4 mg/ml); 500 µl saadud piimhappelahusest kontsentratsiooniga 4 mg/ml kantakse 96-kannulise katseplaadi ühte kannu. Seda lahust lahjendatakse X-VIVO™ 15-ga kaks korda ja seejärel uuesti kaks korda, et saada lahused kontsentratsiooniga 2 mg/ml ja 1 mg/ml. Igast saadud kolmest lahusest ja kandeainega kontrollist (X-VIVO™ 15) lisatakse 50 µl 96-kannulise lamedapõhjalise musta plaadi kannudesse, mis sisaldavad 50 µl THP-G8 rakkude suspensiooni. Negatiivset kontrolli analüüsitakse igal kontsentratsioonil neljas kannus. Plaati loksutatakse plaadiloksutil ja inkubeeritakse CO₂ inkubaatoris 37 °C juures 5-protsendilise CO₂-sisaldusega atmosfääris 16 tundi. Seejärel mõõdetakse punktis 29 kirjeldatud viisil lutsiferaasi aktiivsus.
25. Võib kasutada ka mõnda muud sobivat positiivset või negatiivset kontrolli, kui on olemas varasemad andmed, mis võimaldavad kindlaks määrata võrreldavad analüüsitsükli nõuetekohasuse kriteeriumid.
26. Tuleks jälgida, et lenduvad uuritavad kemikaalid ei aurustuks, ning hoida ära kannudevahelist uuritava kemikaaliga ristsaastumist. Selleks võib plaadi enne uuritava kemikaaliga inkubeerimist näiteks tihedalt kinni katta.
27. Uuritavate kemikaalide ja lahustiga kontrolli puhul on positiivse või negatiivse prognoosi saamiseks vaja läbi viia 2–4 analüüsitsükli (vt tabel 2). Iga analüüsitsükkel viiakse läbi eri päeval; igas tsüklis kasutatakse X-VIVO™ 15-s lahustatud uuritava kemikaali värsket põhilahust ja sõltumatult kogutud rakke. Rakud võivad pärineda samast passaažist.

Lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmine

28. Luminestsentskiirgust mõõdetakse 96-kannulise mikroplaadi jaoks ette nähtud luminomeetriga, mis on varustatud optiliste filtritega – nt seadmega Phelios (ATTO, Tokyo, Jaapan) või Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Saksamaa) või ARVO-seeria seadmega (PerkinElmer, Waltham, MA, Ameerika Ühendriigid). Reprodutseeritavuse tagamiseks tuleb luminomeeter iga katse eel kalibreerida (19). Kalibreerimiseks on saadaval oranži või punast valgust tekitavad rekombinantset lutsiferaasid.

29. Igasse kemikaaliga töödeldud või töötlemata rakususpensiooni sisaldavasse plaadi kannu lisatakse 100 µl lutsiferaasikatsse eelsoojendatud reaktiivi Tripluc® (Tripluc). Plaati loksutatakse 10 minutit ümbritseva õhu temperatuuril umbes 20 °C juures. Lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmiseks asetatakse plaat luminomeetrisse. Bioluminestsentsi mõõdetakse 3 sekundit ilma optilise filtrita (F0) ja 3 sekundit optilise filtriga (F1). Kui kasutatakse muid seadeid, mis võivad sõltuda näiteks kasutatava luminomeetri mudelist, tuleks seda põhjendada.
30. Mõõdetud väärtuste põhjal arvutatakse soovitud näitajad iga kontsentratsiooni puhul, nt IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, IL8LA keskvärtus ± standardhälve, GAPLA keskvärtus ± standardhälve, nIL8LA keskvärtus ± standardhälve, Ind-IL8LA keskvärtus ± standardhälve, Inh-GAPLA keskvärtus ± standardhälve ja Ind-IL8LA usaldusvahemik usaldusnivool 95 %. Käesolevas punktis nimetatud näitajate määratlused on esitatud liidetes 3.1 ja 3.4.
31. Mitme värvuse tuvastamist võimaldavate reporterkatsete puhul kasutatakse mõõtmise eel eri värvuste lahutamiseks üldjuhul selliseid detektorseadmeid (luminomeeter ja plaadilugemisseade), mis on varustatud optiliste filtritega, nt teravapiiriliste madal- või kõrgpääsufiltrite või ribapääsufiltritega. Enne katset tuleks määrata filtrite läbilaskvustegurid iga bioluminestsentssignaali värvuse jaoks vastavalt liitele 3.2.

ANDMED JA ARUANDLUS

Andmete hindamine

32. Positiivseks/negatiivseks liigitamise otsus tehakse igas analüüsitsüklis järgmiste kriteeriumide alusel:
- IL-8 lutsiferaasikatsel põhinev prognoos tunnistatakse positiivseks, kui uuritava kemikaaliga saadud Ind-IL8LA väärtus on $\geq 1,4$ ja Ind-IL8LAd iseloomustava usaldusnivoole 95 % vastava usaldusvahemiku alampiir on $\geq 1,0$;
 - IL-8 lutsiferaasikatsel põhinev prognoos tunnistatakse negatiivseks, kui uuritava kemikaaliga saadud Ind-IL8LA väärtus on $< 1,4$ ja/või Ind-IL8LAd iseloomustava usaldusnivoole 95 % vastava usaldusvahemiku alampiir on $< 1,0$.

Prognoosimudel

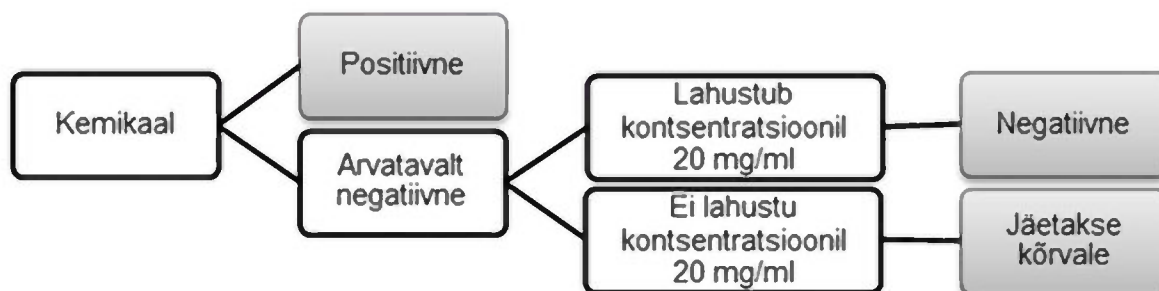
33. Uuritav kemikaal, mille puhul on esimese, teise, kolmanda ja neljanda analüüsitsükli lõikes saadud kaks positiivset tulemust, tunnistatakse positiivseks; uuritav kemikaal, mille puhul on esimese, teise, kolmanda ja neljanda analüüsitsükli lõikes saadud kolm negatiivset tulemust, tunnistatakse arvatavalt negatiivseks (tabel 2). Arvatavalt negatiivsete kemikaalide seas tunnistatakse negatiivseks sellised kemikaalid, mis lahustuvad X-

VIVO™ 15-s kontsentratsioonil 20 mg/ml; kemikaalid, mis X-VIVO™ 15-s kontsentratsioonil 20 mg/ml ei lahustu, tuleks kõrvale jätta (joonis 1).

Tabel 2. Positiivsete ja arvatavalt negatiivsete kemikaalide kindlakstegemise kriteeriumid

1. tsükel	2. tsükel	3. tsükel	4. tsükel	Lõplik prognoos
Positiivne	Positiivne	-	-	Positiivne
	Negatiivne	Positiivne	-	Positiivne
		Negatiivne	Positiivne	Positiivne
			Negatiivne	Arvatavalt negatiivne
Negatiivne	Positiivne	Positiivne	-	Positiivne
		Negatiivne	Positiivne	Positiivne
			Negatiivne	Arvatavalt negatiivne
	Negatiivne	Positiivne	Positiivne	Positiivne
			Negatiivne	Arvatavalt negatiivne
		Negatiivne	-	Arvatavalt negatiivne

Joonis 1. Prognoosimudel lõppotsuse tegemiseks



Nõuetekohasuse kriteeriumid

34. IL-8 lutsiferaasikatse puhul peaksid olema täidetud järgmised nõuetekohasuse kriteeriumid.

- Ind-IL8LA peaks olema igas analüüsitsüklis vähemalt ühel positiivse kontrolli (4-NBB) kontsentratsioonil suurem kui 5,0.
- Ind-IL8LA peaks olema igas analüüsitsüklis kõikidel negatiivse kontrolli (piimhape) kontsentratsioonidel väiksem kui 1,4.

- Andmed, mis on saadud plaatidelt, kus rakke ja Triplucit sisaldavates ilma kemikaalita kontrollkannudes täheldatud GAPLA väärtus on alla viie korra suurem kui GAPLA väärtus kannus, mis sisaldab ainult katsesöödet (kannu kohta 50 µl söödet RPMI-1640, mis sisaldab 10 % veiselooteseerumit, ja 50 µl X-VIVO™ 15), tuleks jätta arvesse võtmata.
- Andmed, mis on saadud plaatidelt, kus uuritava või kontrollkemikaaliga saadud Inh-GAPLA väärtus on kõigil kontsentratsioonidel väiksem kui 0,05, tuleks jätta arvesse võtmata. Sellisel juhul tuleks esimest katset korrata nii, et korduskatses kasutatakse suurima lõppkontsentratsioonina eelmises katses kasutatud vähimat lõppkontsentratsiooni.

Katseprotokoll

35. Katseprotokoll peaks sisaldama järgmist teavet.

Uuritavad kemikaalid

Ühest koostisosast koosnev aine:

- kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus(ed) ja CASi number/numbrid, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem ja/või muu identimisteave;
- füüsiline välimus, lahustuvus vees, molekulmass ja muud asjakohased kättesaadavad andmed füüsikalise-keemiliste omaduste kohta;
- puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;
- vajaduse korral teave töötlemise kohta enne katset (nt soojendamine, peenestamine);
- lahustuvus X-VIVO™ 15-s. X-VIVO™ 15-s mittelahustuvate kemikaalide puhul teave selle kohta, kas pärast tsentrifuugimist on näha sadet või hõljumit;
- kasutatud kontsentratsioon(id);
- kättesaadav teave säilitamistingimuste ja püsivuse kohta;
- iga uuritava kemikaali puhul lahusti/kandeaine valimise põhjendus juhul, kui ei kasutatud X-VIVO™ 15.

Mitmest koostisosast koosnev aine, tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal või segu:

- võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt näiteks koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), puhtusest, kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohaseid füüsikalise-keemilisi omadusi käsitlevatest kättesaadavatest andmetest (vt eespool);
- füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased kättesaadavad andmed füüsikalise-keemiliste omaduste kohta;

- teadaoleva koostisega segu/polümeeri puhul molekulmass või näiline molekulmass või muu uuringu tegemiseks asjakohane teave;
- vajaduse korral teave töötlemise kohta enne katset (nt soojendamine, peenestamine);
- lahustuvus X-VIVO™ 15-s. X-VIVO™ 15-s mittelahustuvate kemikaalide puhul teave selle kohta, kas pärast tsentrifuugimist on näha sadet või hõljumit;
- kasutatud kontsentratsioon(id);
- kättesaadav teave säilitamistingimuste ja püsivuse kohta;
- iga uuritava kemikaali puhul lahusti/kandeaine valimise põhjendus juhul, kui ei kasutatud X-VIVO™ 15.

Kontrollid

Positiivne kontroll:

- kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus(ed) ja CASi number/numbrid, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem ja/või muu identimisteave;
- füüsiline välimus, lahustuvus vees, molekulmass ja muud asjakohased kättesaadavad andmed füüsikalise-keemiliste omaduste kohta;
- puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;
- vajaduse korral teave töötlemise kohta enne katset (nt soojendamine, peenestamine);
- kasutatud kontsentratsioon(id);
- kättesaadav teave säilitamistingimuste ja püsivuse kohta;
- vajaduse korral viide varasematele positiivse kontrolliga saadud tulemustele, millest nähtub vastavus asjakohastele nõuetekohasuse kriteeriumidele.

Negatiivne kontroll:

- kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus(ed) ja CASi number/numbrid ja/või muu identimisteave;
- puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;
- asjaomases katsejuhendis nimetamata negatiivsete kontrolli aine kasutamisel kättesaadav teave selle füüsilise välimuse, molekulmassi ja muude asjakohaste füüsikalise-keemiliste omaduste kohta;
- kättesaadav teave säilitamistingimuste ja püsivuse kohta;
- iga uuritava kemikaali puhul lahusti valimise põhjendus.

Katsetingimused:

- sponsori, katselabori ja uuringu juhi nimi ja aadress;
- kasutatud katsemeetodi kirjeldus;
- kasutatud rakuliin, selle säilitamistingimused ning päritolu (nt asutus, kellelt rakud saadi);
- veiselooteserumi partiinumber ja päritolu, tarnija nimi, 96-kannulise lamedapõhjalise musta plaadi partiinumber ja reaktiivi Tripluc partiinumber;
- passaaži number ja rakkude tihedus katses kasutamisel;
- enne katset rakkude külvamisel kasutatud rakuloendusmeetod ning võetud meetmed, millega tagati rakkude homogeenne jaotus;
- kasutatud luminomeeter (nt mudel), sealhulgas seadme seaded, kasutatud lutsiferaasisubstraat ja liites 3.2 kirjeldatud kontrollkatsel põhinev tõendus asjakohaste luminescentskiirguse mõõtmiste läbiviimise kohta;
- laboris katse tegemiseks vajaliku pädevuse tõendamiseks (nt pädevusainetega katsete tegemiseks) kasutatud meetod või katsemeetodiga saadud tulemuste pikaajalise reprodutseeritavuse tõendamiseks kasutatud meetod.

Katse käik:

- proovide ja analüüsitsüklite arv;
- uuritava kemikaali kontsentratsioonid, lisamisviis ja kasutatud kokkupuuteaeg (kui erineb soovitatust);
- kasutatud hindamis- ja otsustamiskriteeriumide kirjeldus;
- kasutatud katse nõuetekohasuse kriteeriumide kirjeldus;
- kõikide katse käigus tehtud muudatuste kirjeldus.

Tulemused:

- mõõdetud IL8LA ja GAPLA väärtused;
- arvutatud nIL8LA, Ind-IL8LA ja Inh-GAPLA väärtused;
- Ind-IL8LA usaldusvahemik usaldusnivool 95 %;
- graafik, millel on kujutatud lutsiferaasi aktiivsuse ja rakkude eluvõimelisuse kontsentratsioonist sõltuvuse kõverad;
- vajaduse korral mis tahes muude asjakohaste vaatlusandmete kirjeldus.

Tulemuste arutelu:

- IL-8 lutsiferaasikatsega saadud tulemuste arutelu;
- katse tulemuste hindamine ühtse lähenemisviisi kontekstis, kui muu asjakohane teave on kättesaadav.

Järeldused

KIRJANDUS

- (1) Takahashi, T., Kimura, Y., Saito, R., Nakajima, Y., Ohmiya, Y., Yamasaki, K., ja 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: 359–369.
- (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. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis. Kättesaadav aadressil <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. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis. Kättesaadav aadressil <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 and Assessment No. 256. ENV/JM/MONO(2016)29. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis. Kättesaadav aadressil <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (5) van der Veen, J. W., Rorije, E., Emter, R., Natsch, A., van Loveren, H., ja Ezendam, J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 69: 371–379.
- (6) Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., Takahashi, T., Nakajima, Y., Ohmiya, Y., ja Aiba, S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29: 1816–1830.
- (7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P. S., Gerberick, F., *et al.* (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71: 337–351.
- (8) Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., Kosaka, N., Ishikawa, M., Nukada, Y., Miyazawa, M., Ito, Y., Nishiyama, N., ja 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). *ATLA* 38: 275–284.

- (9) Patlewicz, G., Casati, S., Basketter, D. A., Asturiol, D., Roberts, D. W., Lepoittevin, J.-P., Worth, A., ja 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., ja Auld, D. S. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. *Chem. Biol.* 17: 646–657.
- (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, Pariis. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en>.
- (12) Viviani, V., Uchida, A., Suenaga, N., Ryufuku, M., ja Ohmiya, Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280:1286–1291.
- (13) Viviani, V. R., Bechara, E. J., ja Ohmiya, Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. *Biochemistry* 38: 8271–8279.
- (14) Nakajima, Y., Kimura, T., Sugata, K., Enomoto, T., Asakawa, A., Kubota, H., Ikeda, M., ja Ohmiya, Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. *Biotechniques* 38: 891–894.
- (15) OECD (2017). Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. Avaldamisel. OECD, Pariis, Prantsusmaa.
- (16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Pariis, Prantsusmaa.
- (17) OECD (2018). Draft Guidance Document on Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment.

Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis. Kättesaadav aadressil http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf.

- (18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol. Kättesaadav aadressil http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.
- (19) Niwa, K., Ichino, Y., Kumata, S., Nakajima, Y., Hiraishi, Y., Kato, D., Viviani, V. R., ja Ohmiya, Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. *Photochem. Photobiol.* 86: 1046–1049.
- (20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Pariis, Prantsusmaa.
- (21) Ühinenud Rahvaste Organisatsioon (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Kuues, täiendatud väljaanne. United Nations Publications, New York ja Genf. ISBN: 978-92-1-117006-1. Kättesaadav aadressil http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

Liide 3.1

MÕISTED

Aine – looduslik või mis tahes tootmisprotsessi tulemusena saadud keemiline element või selle ühend koos püsivuse tagamiseks vajalike lisaainete ja tootmisprotsessi käigus tekkinud lisanditega, mis ei hõlma siiski lahusteid, mida on võimalik aine püsivust mõjutamata või selle koostist muutmata ainest eraldada.

Analüüsitsükel – ühe või mitme uuritava kemikaali analüüsimine lahustiga/kandeainega kontrolli ja positiivse kontrolliga paralleelselt.

Asjakohasus – näitaja, mille abil kirjeldatakse, kuivõrd katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat toimet, kas selle kasutamine on mõttekas ja kas see on konkreetse eesmärgi jaoks sobiv. Asjakohasusest nähtub, mil määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või ennustada huvipakkuvat bioloogilist toimet. Asjakohasuse puhul võetakse arvesse ka katsemeetodiga saavutatavat täpsust (vastavust) (16).

CV05 – rakkude eluvõimelisuse tasemes kajastuv näitaja ehk vähim kontsentratsioon, mille juures kemikaali toimel avalduv Inh-GAPLA on väiksem kui 0,05.

FInSLO-LA – IL-8 lutsiferaasikatset käsitlevas valideerimisaruandes ja varasemates väljaannetes kasutatud lühend, millega osutatakse näitajale Ind-IL8LA. Mõiste Ind-IL8LA määratlus on esitatud allpool.

GAPLA – punast valgust tekitava püsiva lutsiferaasi (SLR) ($\lambda_{\text{maks}} = 630 \text{ nm}$) aktiivsus, mida reguleerib GAPDH promootor ning mis kajastab rakkude eluvõimelisust ja eluvõimeliste rakkude arvu.

II-SLR-LA – IL-8 lutsiferaasikatset käsitlevas valideerimisaruandes ja varasemates väljaannetes kasutatud lühend, millega osutatakse näitajale Inh-GAPLA. Mõiste Inh-GAPLA määratlus on esitatud allpool.

IL-8 (interleukiin 8) – endoteelirakkude, fibroblastide, keratinotsüütide, makrofaagide ja monotsüütide toodetav tsütokiin, mis põhjustab neutrofiilide ja T-lümfotsüütide kemotaksist.

IL8LA – oranži valgust tekitava püsiva lutsiferaasi (SLO) ($\lambda_{\text{maks}} = 580 \text{ nm}$) aktiivsus, mida reguleerib IL-8 promootor.

Ind-IL8LA – nIL8LA suurenemine kordades. Selle arvutamiseks jagatakse kemikaaliga töödeldud THP-G8 rakkude puhul täheldatud nIL8LA väärtus töötlemata THP-G8 rakkude puhul täheldatud nIL8LA väärtusega ning see näitab, mil määral kemikaal suurendab IL-8 promootori aktiivsust.

Induktsiooni alampiir (MIT) – väiksem kontsentratsioon, mille juures kemikaal vastab

positiivsuse kriteeriumidele.

Inh-GAPLA – GAPLA inhibeerimise määr. Selle arvutamiseks jagatakse kemikaaliga töödeldud THP-G8 rakkude puhul täheldatud GAPLA väärtus töötlemata THP-G8 rakkude puhul täheldatud GAPLA väärtusega ning see näitab kemikaali tsütotoksilisust.

Kahjuliku toime rada – sündmuste ahel alates sihtkemikaali või rühma sarnaste kemikaalide keemilisest struktuurist sõltuvast käivitavast molekulaarsest sündmusest kuni vaadeldava toime avaldumiseni *in vivo* (20).

Katsete tegemist ja hindamist käsitlev ühtne lähenemisviis – struktureeritud lähenemisviis, mida kasutatakse kemikaali või rühma kemikaalide ohtlikkuse tuvastamiseks (võimalik toime), ohu kirjeldamiseks (toime tugevus) ja/või ohutuse hindamiseks (võimalik toime/toime tugevus ja kokkupuude) ning mille raames lõimitakse strateegiliselt ja kaalutakse läbi kõik asjakohased andmed võimalikku ohu ja/või riski ja/või täiendavate sihipäraste ja seega minimaalses ulatuses katsete tegemise vajadust käsitleva regulatiivse otsuse tegemiseks.

Kemikaal – aine või segu.

Lahustiga/kandeainega kontroll – töötlemata proov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente peale uuritava kemikaali, sealhulgas lahustit/kandeainet. Selle abil tehakse kindlaks lähtetase samas lahustis/kandeaines lahustatud või püsiva dispersiooni moodustanud uuritava kemikaaliga töödeldud proovide jaoks. Kui sellist töötlemata proovi hinnatakse paralleelselt söötmega kontrolliga, võimaldab see ühtlasi kindlaks teha, kas lahusti/kandeaine mõjutab katsesüsteemi.

Mitmest koostisosast koosnev aine – aine, mis on määratletud kvantitatiivse koostise alusel ja milles enam kui ühe põhikoostisosa sisaldus on vähemalt 10, kuid väiksem kui 80 massiprotsenti. Mitmest koostisosast koosnev aine saadakse tootmisprotsessi tulemusena. Erinevus segu ja mitmest koostisosast koosneva aine vahel seisneb selles, et segu saadakse kahe või enama aine kokku segamisel, ilma et toimuks keemilist reaktsiooni. Mitmest koostisosast koosnev aine saadakse keemilise reaktsiooni tulemusel.

nIL8LA – IL-8 promootori aktiivsust kajastav lutsiferaasi SLO aktiivsus (IL8LA), mis on normaliseeritud GAPDH promootori aktiivsust kajastava lutsiferaasi SLR aktiivsuse (GAPLA) suhtes. Sellega väljendatakse IL-8 promootori aktiivsust pärast rakkude eluvõimelisuse või rakkude arvu arvessevõtmist.

nSLO-LA – IL-8 lutsiferaasikatset käsitlevas valideerimisaruandes ja varasemates väljaannetes kasutatud lühend, millega osutatakse näitajale nIL8LA. Mõiste nIL8LA määratlus on esitatud eespool.

Nõuetekohane katsemeetod – katsemeetod, mille asjakohasust ja usaldusväärsust konkreetse eesmärgi puhul peetakse piisavaks ning mis rajaneb teaduslikult usaldusväärsel põhimõtetel. Katsemeetod ei ole kunagi nõuetekohane absoluutses tähenduses, vaid üksnes

seoses teatud kindla eesmärgiga (29).

Ohtlikkus – mõjurit või olukorda iseloomustav omadus, millest võib tuleneda kahjulik toime, kui organism, süsteem või (alam)populatsioon selle mõjuriga kokku puutub.

Pindaktiivne aine – detergent või muu aine, mis võib vähendada vedeliku pindpinevust ja võimaldab sellel vahutada või tungida tahkesse ainesse; sama mis märgav aine (katsejuhend nr 437).

Positiivne kontroll – paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente ja mida on töödeldud ainega, millega teadaolevalt saadakse positiivne tulemus. Positiivse tulemuse väärtus ei tohiks olla liiga suur, et võimaldada hinnata positiivse kontrolliga saadud tulemuste varieeruvust ajas.

Prehapteenid – kemikaalid, mis muutuvad sensibilisaatoriks abiootilise muundumise teel.

Prohapteenid – kemikaalid, mis vajavad nahka sensibiliseeriva toime tekkimiseks ensümaatilist aktiveerimist.

Segu – kahest või enamast ainest koosnev segu või lahus.

SLO-LA – IL-8 lutsiferaasikatset käsitlevas valideerimisaruandes ja varasemates väljaannetes kasutatud lühend, millega osutatakse näitajale IL8LA. Mõiste IL8LA määratlus on esitatud eespool.

SLR-LA – IL-8 lutsiferaasikatset käsitlevas valideerimisaruandes ja varasemates väljaannetes kasutatud lühend, millega osutatakse näitajale GAPLA. Mõiste GAPLA määratlus on esitatud eespool.

Spetsiifilisus – katsemeetodiga õigesti negatiivseks/reaktsioonivõimetuks liigitatud uuritavate kemikaalide osakaal kõikide negatiivsete kemikaalide hulgas. Spetsiifilisus kajastab sellise katsemeetodi täpsust, millega saadakse kategoriseeritav tulemus, ning see on oluline näitaja katsemeetodi asjakohasuse hindamiseks (16).

THP-G8 – IL-8 lutsiferaasikatses kasutatav IL-8 reporterrakuliin. Inimese makrofaagilaadsete rakkude liin THP-1, millesse on transfekteeritud lutsiferaaside SLO ja SLR geenid, mis on vastavalt IL-8 ja GAPDH promootori kontrolli all.

Tundlikkus – katsemeetodiga õigesti positiivseks/reaktsioonivõimeliseks liigitatud uuritavate kemikaalide osakaal kõikide positiivsete kemikaalide hulgas. Tundlikkus kajastab sellise katsemeetodi täpsust, millega saadakse kategoriseeritav tulemus, ning see on oluline näitaja katsemeetodi asjakohasuse hindamiseks (16).

Täpsus – katsetulemuste ja vastuvõetavate võrdlusväärtuste kooskõla määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks asjakohastest aspektidest. Seda mõistet kasutatakse sageli vastavuse tähenduses, et väljendada katsemeetodiga saadud õigete tulemuste osakaalu (16).

Usaldusväärsus – näitaja, mis iseloomustab katsemeetodiga saadud tulemuste reprodutseeritavust pikema aja jooksul samas laboris ja eri laborites, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel. Usaldusväärsuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline reprodutseeritavus ning laborisisene korratavus (16).

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

UVCB – tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

Ühest koostisosast koosnev aine – aine, mis on määratletud kvantitatiivse koostise alusel ja mille ühe põhikoostisosa sisaldus on vähemalt 80 massiprotsenti.

Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem (ÜRO GHS) – süsteem, millega nähakse ette kemikaalide (ainete ja segude) klassifitseerimine vastavalt nende füüsilise ohtlikkuse ning kahjuliku tervise- ja keskkonnamõju standarditud liigile ja tasemele ning mis hõlmab selliseid asjaomaseid teavitustähiseid nagu piktogrammide, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskardid, et anda inimeste (sealhulgas tööandjate, töötajate, vedajate, tarbijate ja päästetöötajate) ning keskkonna kaitsmiseks vajalikku teavet kõnealuste kemikaalide kahjuliku toime kohta (21).

Liide 3.2

LUTSIFERAASI AKTIIVSUSE MÕÕTMISE PÕHIMÕTE NING SLO JA SLR-I PUHUL KOHALDATAVATE OPTILISE FILTRI LÄBILASKVUSTEGURITE KINDLAKSTEGEMINE

Mitme reporteriga katsesüsteemi Tripluc on võimalik kasutada mitme värvuse tuvastamist võimaldava mikroplaatide jaoks ette nähtud luminomeetriga, mille saab varustada optilise filtriga (nt Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). Mõõtmiseks kasutatav optiline filter on madal- või kõrgpääsufilter piirlainepikkusega 600–620 nm või ribapääsufilter lainepikkusele 600–700 nm.

Lutsiferaaside tekitatava kahe värvuse mõõtmine optilise filtri abil

Selles näites kasutatakse luminomeetrit Phelios AB-2350 (ATTO). See luminomeeter on varustatud 600 nm madalpääsufiltriga (R60, HOYA Co., filter 1), mis võimaldab eristada SLO ($\lambda_{\text{maks}} = 580 \text{ nm}$) ja SLRi ($\lambda_{\text{maks}} = 630 \text{ nm}$) põhjustatud luminesentsi.

600 nm madalpääsufiltri läbilaskvustegurite kindlakstegemiseks kasutatakse puhastatud lutsiferaase SLO ja SLR ning i) mõõdetakse SLO ja SLRi põhjustatud bioluminesentsi tugevus ilma filtrita (F0), ii) mõõdetakse SLO ja SLRi põhjustatud, 600 nm madalpääsufiltri (filter 1) läbinud bioluminesentskiirguse tugevus ja iii) arvutatakse allpool loetletud 600 nm madalpääsufiltri läbilaskvustegurid SLO ja SLRi puhul.

Läbilaskvustegurid		Lühend	Määratlus
SLO	Filter 1: läbilaskvustegur	κO_{R60}	Filtri läbilaskvustegur SLO puhul
SLR	Filter 1: läbilaskvustegur	κR_{R60}	Filtri läbilaskvustegur SLRi puhul

Kui valida katseproovis SLO ja SLRi põhjustatud luminesentsi tugevuse tähisteks vastavalt O ja R, siis on i) filtri puudumisel täheldatav kogu optilist spektrit hõlmava valguse tugevus F0 ja ii) 600 nm madalpääsufiltri (filter 1) läbinud valguse tugevus F1 kirjeldatavad järgmiste valemitega.

$$F0 = O + R$$

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

Need valemid võib esitada ka järgmisel kujul:

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

Seejärel saab arvutatud läbilaskvustegurite ($\kappa_{O_{R60}}$ ja $\kappa_{R_{R60}}$) ning mõõdetud F0 ja F1 väärtuste abil leida O ja Ri väärtused järgmise valemiga:

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

Läbilaskvusteguri kindlakstegemiseks kasutatavad materjalid ja meetodid

1) Reaktiivid

Puhastatud eraldi lutsiferaasid:

lüofiliseeritud puhastatud SLO

lüofiliseeritud puhastatud SLR

(valideerimisuuringu jaoks hangiti need koos rakuliiniga THP-G8 Jaapanis Tottoris asuvast ettevõttest GPC Lab. Co. Ltd.)

Katsereaktiiv:

lutsiferaasikatse reaktiiv Tripluc® (nt ettevõttest TOYOBO; katalooginumber MRA-301)

Sööde:

lutsiferaasikatse sööde (30 ml, säilitatakse temperatuuril 2–8 °C)

Reaktiiv	Konts.	Lõppkonts. söötmes	Vajalik kogus
RPMI-1640	-	-	27 ml
Veiselooteseerum	-	10 %	3 ml

2) Ensüümilahuse valmistamine

Lüofiliseeritud puhastatud lutsiferaasi lahustamiseks katsutis lisatakse sellele 200 µl 10–100 mM Tris/HCl-i või Hepes/HCl-i (pH 7,5–8,0), mis sisaldab 10 % glütserooli massiühikutes ruumalaühiku kohta. Ensüümilahus jaotatakse 10 µl alikvootidena ühekordsetesse 1,5 ml katsutitesse ja säilitatakse sügavkülmikus temperatuuril -80 °C. Külmutatud ensüümilahus on kasutatav kuni kuue kuu jooksul. Kasutamisel lisatakse igasse ensüümilahust (lahjendatud ensüümilahust) sisaldavasse katsutisse 1 ml lutsiferaasikatse söödet (10 % veiselooteseerumit sisaldav RPMI-1640) ja inaktiveerumise takistamiseks hoitakse katsuteid jääl.

3) Bioluminestsentsi mõõtmine

Lutsiferaasikatse reaktiiv Tripluc® sulatatakse ja seda hoitakse toatemperatuuril veevannis või ümbritseva õhu temperatuuril. Luminomeeter lülitatakse sisse 30 minutit

enne mõõtmise algust, et fotokordisti jõuaks stabiliseeruda. 100 µl lahjendatud ensüümilahust kantakse 96-kannulisele mustale lamedapõhjalisele plaadile (SLO proovid kannudesse B1, B2 ja B3, SLRi proovid kannudesse D1, D2, ja D3). Seejärel kantakse igasse ensüümilahust sisaldavasse plaadi kannu pipetiga 100 µl eelsoojendatud Triplucit. Plaati loksutatakse plaadiloksutil toatemperatuuril (umbes 25 °C) 10 minutit. Vajaduse korral kõrvaldatakse kannudes olevast lahusest mullid. Lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmiseks asetatakse plaat luminomeetrisse. Bioluminestsentsi mõõdetakse 3 sekundit ilma optilise filtrita (F0) ja 3 sekundit optilise filtriga (F1).

Optilise filtri läbilaskvustegur arvutatakse vastavalt järgmistele valemitele.

Läbilaskvustegur (SLO ($\kappa_{O_{R60}}$)) = $(B1/F1 + B2/F1 + B3/F1) : (B1/F0 + B2/F0 + B3/F0)$

Läbilaskvustegur (SLR ($\kappa_{R_{60}}$)) = $(D1/F1 + D2/F1 + D3/F1) : (D1/F0 + D2/F0 + D3/F0)$

Arvutatud läbilaskvustegureid kasutatakse kõigi sama luminomeetriga tehtavate mõõtmiste puhul.

Seadmete kvaliteedi kontrollimine

Tuleks kasutada IL-8 lutsiferaasikatset käsitlevas katse-eeskirjas kirjeldatud korda (18).

Liide 3.3

PÄDEVUSAINED

Enne katsemeetodi B.71 juurde kuuluvas käesolevas liites kirjeldatud meetodi rutiinset kasutamist tuleks tõendada labori tehnilist pädevust. Selleks tuleks IL-8 lutsiferaasikatses saada tabelis 1 esitatud soovitatava kümne aine puhul eeldatavale tulemusele vastav prognoos ning kümnest pädevusainest vähemalt kaheksa puhul väärtused, mis jäävad asjaomasesse võrdlusvahemikku (pädevusained on valitud nii, et nende puhul oleksid esindatud naha sensibiliseerimise ohuga seotud eri reaktsioonid). Peale selle on valikukriteeriumidena võetud arvesse ainete kaubanduslikku kättesaadavust, kvaliteetsete *in vivo* võrdlusandmete olemasolu ja IL-8 lutsiferaasikatsega saadud kvaliteetsete *in vitro* andmete olemasolu. Lisaks on IL-8 lutsiferaasikatse kohta olemas avaldatud võrdlusandmed (1, 6).

Tabel 1. IL-8 lutsiferaasikatse puhul tehnilise pädevuse tõendamiseks soovitatavad ained

Pädevusained	CA Si nr	Olek	Lahustuvus X-VIVO15-s kontsentratsioonil 20 mg/ml	In vivo toime prognoos ¹	IL-8 lutsiferaasikatse kohane prognoos ²	Võrdlusvahemik (µg/ml) ³	
						CV05 ⁴	IL-8 lutsiferaasikatse kohane MIT ⁵
2,4-dinitroklorobenseen	97-00-7	Tahkis	Ei lahustu	Sensibilisaat or (äärmiselt tugev)	Positiivne	2,3–3,9	0,5–2,3
Formaldehüüd	50-00-0	Vedelik	Lahustub	Sensibilisaat or (tugev)	Positiivne	9–30	4–9
2-merkaptobensotiasool	149-30-4	Tahkis	Ei lahustu	Sensibilisaat or (mõõdukas)	Positiivne	250–290	60–250
Etüleendiamiin	107-15-3	Vedelik	Lahustub	Sensibilisaat or (mõõdukas)	Positiivne	500–700	0,1–0,4
Etüleenglükooldimetakrülaad	97-90-5	Vedelik	Ei lahustu	Sensibilisaat or (nõrk)	Positiivne	> 2000	0,04–0,1
4-allüülanisool (estragool)	140-67-0	Vedelik	Ei lahustu	Sensibilisaat or (nõrk)	Positiivne	> 2000	0,01–0,07
Streptomütsiinsulfaat	3810-74-0	Tahkis	Lahustub	Sensibiliseeriva toimetaga	Negatiivne	> 2000	> 2000
Glütserool	56-81-5	Vedelik	Lahustub	Sensibiliseeriva toimetaga	Negatiivne	> 2000	> 2000
Isopropanool	67-63-0	Vedelik	Lahustub	Sensibiliseeriva toimetaga	Negatiivne	> 2000	> 2000

Lühendid: CASi nr – Chemical Abstracts Service'i registrinumber.

¹ *In vivo* toime tugevuse väljendamisel on lähtutud ECETOCi soovitatud kriteeriumidest (19).

² Varasemate katsete andmete põhjal (1, 6).

³ CV05 ja IL-8 lutsiferaasikatse kohase MIT arvutamiseks kasutati programmiga EPI Suite™ saadud vees lahustuvuse andmeid.

⁴ CV05 – vähim kontsentratsioon, mille juures kemikaali toimet avaldab Inh-GAPLA on väiksem kui 0,05.

⁵ MIT – väiksem kontsentratsioon, mille juures kemikaal vastab positiivsuse kriteeriumidele.

Liide 3.4

INDEKSID JA HINDAMISKRITEERIUMID

nIL8LA (nSLO-LA)

IL8LA (SLO-LA) ja GAPLA (SLR-LA) puhul tehakse mõõtmisi j-ndas analüüsitsükli (j = 1–4) i-ndal kontsentratsioonil (i = 0–11). Normaliseeritud IL8LA tähis on nIL8LA (nSLO-LA) ja selle määratlus on järgmine:

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

See on käesoleva katsemeetodi puhul kasutatav lähtesuurus.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Ind-IL8LA on käesoleva katsemeetodi puhul peamine näitaja, mis väljendab nIL8LA (nSLO-LA) keskmise väärtuse suurenemist kordades konkreetsetes analüüsitsükli i-ndal kontsentratsioonil võrrelduna sama näitaja väärtusega nullkontsentratsioonil. Kõnealune suhe on esitatav järgmise valemiga:

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

Juhtlabori ettepaneku kohaselt vastab uuritava kemikaali puhul positiivsele tulemusele väärtus 1,4. Nimetatud väärtus põhineb juhtlabori varasemate katseandmete analüüsil. Andmehalduse töörühm on kasutanud seda väärtust valideerimisuuringu kõigis etappides. Nagu valemist nähtub, on katse esmane tulemusnäitaja Ind-IL8LA kahe aritmeetilise keskmise suhtarv.

Usaldusvahemik usaldusnivool 95 % (CI_{95%})

Kõnealuse esmase mõõdetava tulemusnäitaja kordustäpsuse hindamiseks saab leida nimetatud suhtarvul põhineva usaldusnivoole 95 % vastava usaldusvahemiku (CI_{95%}). Kui CI_{95%} alampiir on ≥ 1 , siis see näitab, et kontsentratsioonil nr i on nIL8LA oluliselt suurem kui lahustiga kontrolli puhul. CI_{95%} leidmiseks on mitu võimalust. Valideerimisuuringus kasutatud meetod põhineb Fielleri teoreemil. Selle teoreemi järgi leitakse usaldusvahemik usaldusnivool 95 % valemiga

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

kus

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0,975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}, \quad B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}, \quad C = \bar{y}_i^2 - t_{0,975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \quad n_0 = 4,$$

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j n_{IL8LA_{0j}}, \quad sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (n_{IL8LA_{0j}} - \bar{x}_0)^2,$$

$$n_{yi} = 4, \quad \bar{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (n_{IL8LA_{ij}}) \quad \text{ja} \quad sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yi} - 1)\} \times \sum_j (n_{IL8LA_{ij}} - \bar{y}_i)^2.$$

$t_{0,975(v)}$ on keskse t-jaotuse 97,5-protsentiil vabadusastmete arvu v puhul, kus

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

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Inh-GAPLA on konkreetsetes analüüsitsüklis i -ndal kontsentratsioonil täheldatava GAPLA (SLR-LA) keskvaartuse ja lahustiga kontrolli puhul täheldatava sama näitaja keskvaartuse suhtarv ning see on esitatav järgmisel kujul:

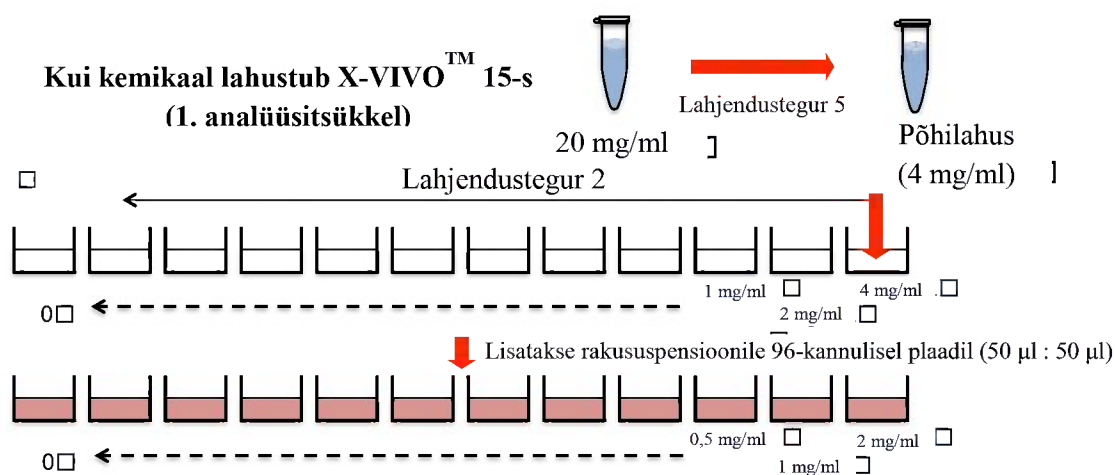
$$Inh - GAPLA_i = \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij}\} / \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j}\}.$$

Kuna GAPLA asub n_{IL8LA} arvutamise valemi nimetajas, põhjustab see väga väikestel väärtustel suurt varieeruvust n_{IL8LA} väärtustes. Seepärast võib Ind-IL8LA väärtusi, mis on saadud Inh-GAPLA väga väikeste väärtuste puhul (alla 0,05), pidada ebatäpseks.

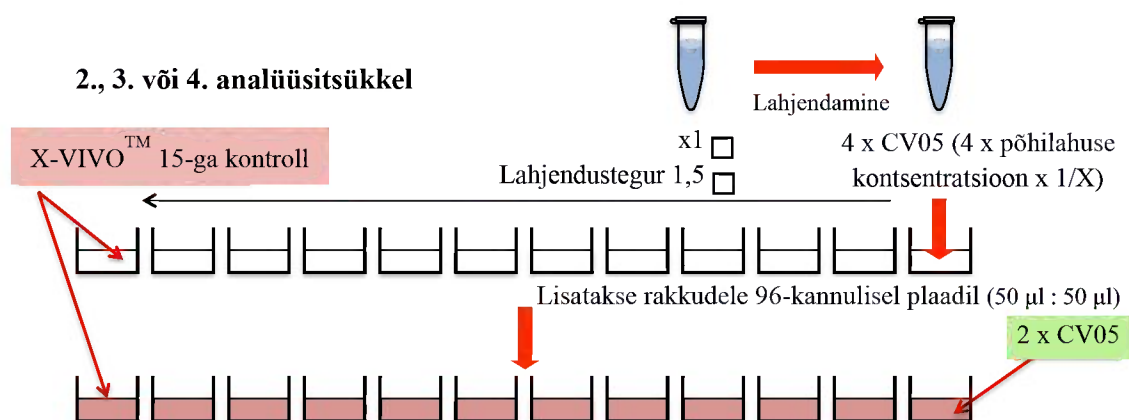
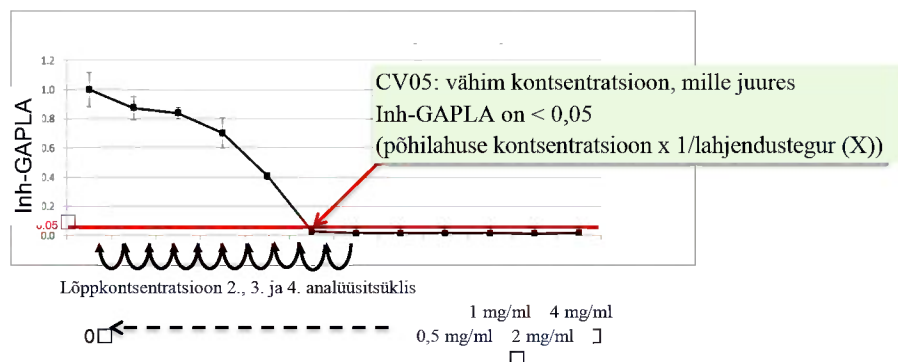
Liide 3.5

IL-8 LUTSIFERAASIKATSES KASUTATAV KEMIKAALIDE LAHUSTAMISE SKEEM

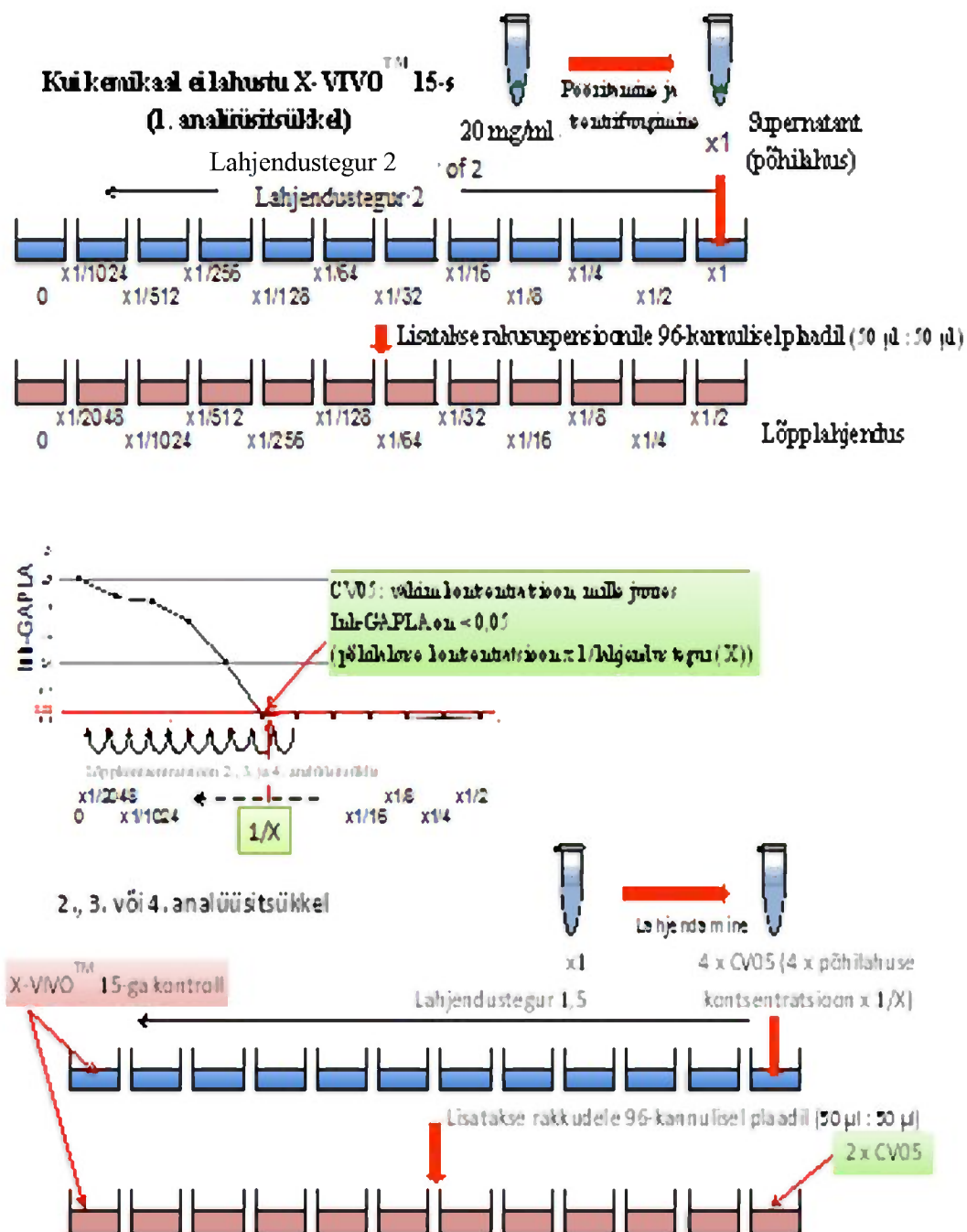
a) X-VIVO™ 15-s kontsentratsioonil 20 mg/ml lahustuvad kemikaalid



Tehakse kindlaks suurim kontsentratsioon järgnevate analüüsitsüklite jaoks

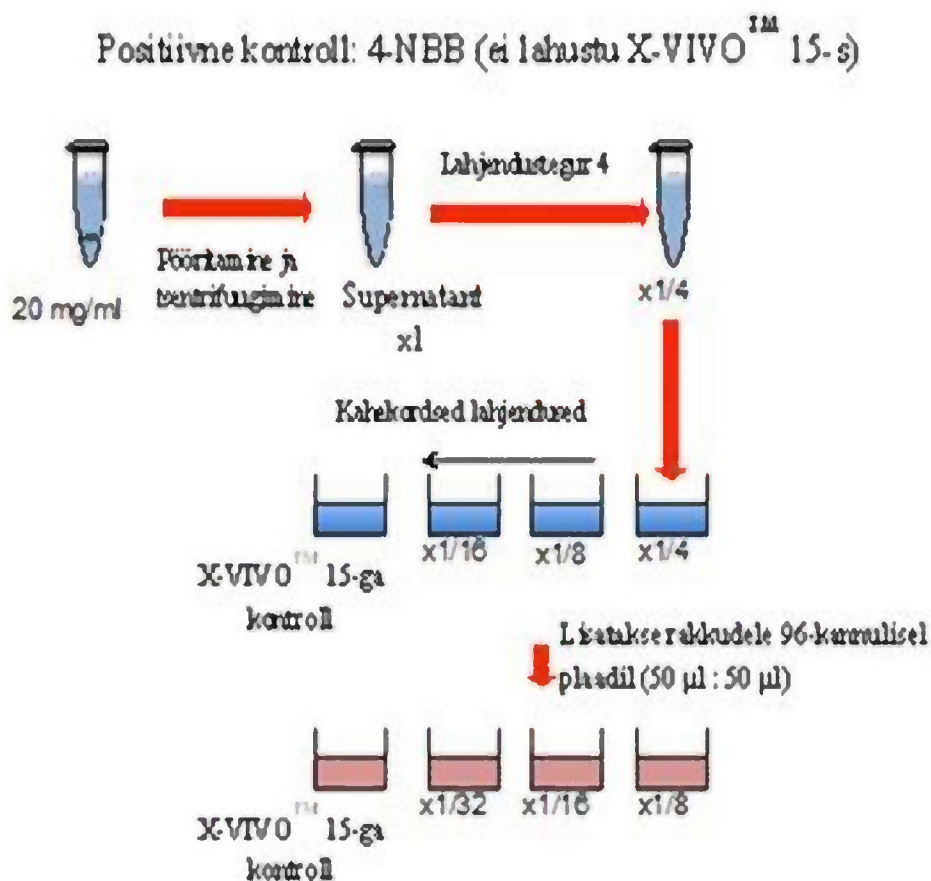


b) X-VIVO™ 15-s kontsentratsioonil 20 mg/ml lahustumatud kemikaalid



Liide 3.6

IL-8 LUTSIFERAASIKAATSE POSITIIVSE KONTROLLINA KASUTATAVA 4-NBB LAHUSTAMISE SKEEM



“

9) C osasse lisatakse järgmised peatükid:

„C.52. ÜHTE PÕLVKONDA HÕLMAV PIKENDATUD SIGIVUSKATSE JAAPANI RIISIKALAGA (MEOGRT)

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 240 (2015). Jaapani riisikalaga tehtava ühte põlvkonda hõlmava pikendatud sigivuskatse (MEOGRT) juhendis kirjeldatakse põhjalikku katsemeetodit, mille aluseks on kalade kokkupuude kemikaaliga mitme põlvkonna jooksul, et koguda ökoloogilise ohu ja kemikaalide, sealhulgas võimalikud endokriinfunktsiooni kahjustavad kemikaalid, riskihindamise aspektist olulisi andmeid. MEOGRT puhul kestab kokkupuude kemikaaliga kuni teise põlvkonna (F2) koorumiseni (kaks nädalat pärast viljastamist). Täiendavalt oleks vaja uurida seda, kas põlvkonna F2 uurimine koorumisjärgsel perioodil oleks põhjendatud; praegu ei ole piisavalt teavet, mille põhjal saaks esitada põlvkonna F2 uurimise pikendamist põhjendavaid asjakohaseid tingimusi või kriteeriume. Käesolevat katsemeetodit võidakse siiski uue teabe ja andmete põhjal ajakohastada. Näiteks võivad juhised põlvkonna F2 uurimise pikendamiseks kuni sigimiseni olla kasulikud teatud asjaoludel (nt suure biokontsentratsiooni potentsiaaliga kemikaalid või andmed põlvkondadevahelise toime kohta muudes taksonites). Käesoleva katsemeetodi abil saab hinnata kemikaalide, sealhulgas potentsiaalselt endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide võimalikku kroonilist toimet kaladele. Meetodis keskendutakse eelkõige võimalikule populatsiooni mõjutavale toimele (kahjulik mõju ellujäämisele, arengule, kasvule ja sigimisele), et arvutada täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) või toimet avaldav kontsentratsioon (EC_x), kuid tuleks arvesse võtta, et EC_x-il põhinevad meetodid ei sobi tavaliselt sellist tüüpi suurte uuringute jaoks, kus EC_x-i kindlakstegemise eesmärgil uuritavate kontsentratsioonide arvu suurendamine võib olla ebaotstarbekas ja põhjustada kasutatavate loomade suure arvu tõttu loomade heaoluga seotud probleeme. Kemikaalide puhul, mis ei vaja mitmes põlvkonnas hindamist või millel puudub endokriinfunktsiooni kahjustamise potentsiaal, võivad olla sobivamad muud katsemeetodid (1). Jaapani riisikala on käesoleva katsemeetodiga kasutamiseks sobiv liik tänu lühikesele elutsüklile ja võimalusele tuvastada selle geneetilist sugu (2), mida peetakse selle katsemeetodi keskse tähtsusega komponendiks. Meetodis kirjeldatud konkreetsed meetodid ja vaatluste lõppnäitajad on kohaldatavad üksnes jaapani riisikala suhtes. Sarnase katse-eeskirja jaoks võivad sobida ka muud väikesed kalaliigid (nt võotdaanio).
2. Käesoleva katsemeetodi kohaselt mõõdetakse mitmeid bioloogilisi lõppnäitajaid. Esmajoones pööratakse tähelepanu võimalikule kahjulikule toimele, mis avaldub populatsiooni näitajates, sealhulgas ellujäämus, üldine areng, kasv ja sigimine. Teises järjekorras kogutakse muud kasulikku teavet *vitellogeniini* (*vtg*) mRNA (või vitellogeniini valgu, VTG) ja geneetilise sooga seotud fenotüübi teiseste sootunnuste mõõtmise ning

histopatoloogia hindamise teel, et saada andmeid toimemehhanismide kohta ja seostada neid muudes valdkondades ja laboriuuringutes saadud tulemustega juhul, kui leidub *a posteriori* tõendeid kemikaali endokriinfunktsiooni kahjustava potentsiaali kohta (nt muude katsetega on leitud androgeenide või östrogeenide funktsiooni kahjustav toime). Tuleb märkida, et kui kemikaalil või selle metaboliitidel endokriinfunktsiooni kahjustavat toimet ei kahtlustata, võib nimetatud teiseste lõppnäitajate mõõtmise vajadus puududa ning sobivam on kasutada vähem ressursse ja loomi vajavaid uuringuid (1). Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

3. Kuna uuritud kemikaalide arv on väike ja kõnealuse üsna keeruka katse valideerimisse on kaasatud vähe laboreid, võib eeldada, et katsemeetod vaadatakse läbi ja seda muudetakse saadud kogemuste valguses pärast seda, kui on tehtud piisavalt uuringuid kõnealuse uue uuringukava toimivuse kinnitamiseks. Andmeid saab kasutada endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide analüüsimise ja hindamise OECD kontseptuaalse raamistiku 5. tasemel. Meetodi kohaselt algab katse sellega, et täiskasvanud kalad (põlvkond F0) viiakse sigimisperioodil kokkupuutesse uuritava kemikaaliga. Kokkupuude jätkub põlvkonna ja F1 arengu ja sigimise perioodil kuni põlvkonna F2 koorumiseni. Tänu sellele võimaldab katse hinnata nii struktuurseid kui ka aktiveerivaid radasid, mis mõjutavad endokriinfunktsiooni. Endokriinfunktsiooniga seotud lõppnäitajate tõlgendamisel võib kasutada tõendite kaalukusel põhinevat meetodit.
4. Katsesse tuleks kaasata vajalikul arvul isendeid, et saavutada sigimisega seotud lõppnäitajate hindamiseks piisav statistiline võimsus (vt 3. liide), tagades samal ajal loomade heaolu kaalutlustel, et kasutatavate loomade arv on võimalikult väike. Arvestades kasutatavate katseloomade suurt arvu, tuleb katse vajalikkust hoolikalt kaaluda seoses olemasolevate andmetega, mis võivad juba hõlmata asjakohast teavet paljude MEOGRT lõppnäitajate kohta. Sellega seoses võib abi saada OECD koostatud raamistikust kaladele avalduva mürgisuse katsete kohta (1).
5. Katsemeetod on välja töötatud eelkõige üksiku aine toime eristamiseks. Ent kui tekib vajadus teha katse seguga, siis tuleks kaaluda, kas meetodiga saadakse kavandatud regulatiivse eesmärgi jaoks sobivad tulemused.
6. Enne katse alustamist on oluline koguda andmeid uuritava kemikaali füüsikalise-keemiliste omaduste kohta, eelkõige selleks, et oleks võimalik valmistada püsivaid kemikaalilahuseid. Samuti tuleb kasutada piisavalt tundlikku analüüsimeetodit uuritava kemikaali kontsentratsioonide kontrollimiseks.

KATSE PÕHIMÕTE

7. Katse alustamiseks viiakse suguküpsed isas- ja emasisendid (vähemalt 12 nädalat pärast viljastamist) sigimispaarides kolmeks nädalaks kemikaaliga kokkupuutesse. Selle aja jooksul levitatakse uuritavat kemikaali vanemate põlvkonna (F0) organismis vastavalt kemikaali toksikokineetilistele omadustele. Võimalikult lähedal neljanda nädala esimesele päevale korjatakse mari, et saada põlvkond F1. Põlvkonna F1 kasvatamise ajal (kokku 15 nädalat) hinnatakse kooruvust ja ellujäämust. Lisaks võetakse 9.–10. viljastamisjärgsel nädalal kaladelt proove arengu lõppnäitajate kindlakstegemiseks ning 12.–14. viljastamisjärgsel nädalal hinnatakse kolme nädala jooksul kudemist. Põlvkond F2 luuakse pärast kolmandat sigivuse hindamise nädalat ja seda kasvatatakse kuni koorumise lõpuni.

KATSE NÕUETEKOHASUSE KRITEERIUMID

8. Katse nõuetekohasuse suhtes kohaldatakse järgmisi kriteeriume.
- Lahustunud hapniku kontsentratsioon peaks kogu katse vältel olema ≥ 60 % õhu küllastuskontsentratsioonist.
 - Keskmine veetemperatuur peaks kogu uuringu vältel olema vahemikus 24–26 °C. Üksikutes akvaariumides esinevad põgusad kõrvalekalded keskmisest ei tohiks ületada 2 °C.
 - Keskmine sigivus iga põlvkonna (F0 ja F1) kontrollrühmades peaks olema suurem kui 20 marjatera paari kohta päevas. Kõikide hindamise jooksul valminud marjaterade viljakus peaks olema üle 80 %. Lisaks peaks kontrollrühma soovituslikust 24 sigimispaarist 16 (> 65 %) väljutama päevas rohkem kui 20 marjatera paari kohta.
 - Marjaterade (keskmine) kooruvus kontrollrühmades peaks olema ≥ 80 % (nii põlvkonnas F1 kui ka põlvkonnas F2).
 - Kontrollrühmas (F1) peaks (keskmine) ellujäämus kuni 3. viljastamisjärgse nädalani ja alates 3. viljastamisjärgsest nädalast kuni põlvkonnaga F1 katse lõpetamiseni (15. viljastamisjärgne nädal) olema vastavalt ≥ 80 % ja ≥ 90 %.
 - Tuleks esitada tõendid selle kohta, et uuritava kemikaali kontsentratsioone lahuses on suudetud hoida rahuldavalt vahemikus ± 20 % mõõtmistulemuste keskväärtusest.

Kuigi see ei ole nõuetekohasuse kriteerium, ei tohiks ühe kontsentratsioonirühma paralleelnõude ega katse kontsentratsioonirühmade vahel olla statistilisi erinevusi vee temperatuuris (igapäevaste temperatuurimõõtmiste põhjal; välja arvatud põgusad kõrvalekalded).

9. Kuigi suurema kokkupuutega rühmades võib täheldada vähenenud sigivust, peaks põlvkonna F0 sigivus kokkupuute suuruse järgi vähemalt kolmandast rühmast alates ja kõigis väiksema kokkupuutega rühmades olema piisav koorumisinkubaatorite täitmiseks. Peale selle peaks põlvkonna F1 embrüote ellujäämus olema kokkupuute suuruse järgi

kolmandas rühmas ja kõigis väiksema kokkupuutega rühmades piisav selleks, et hinnata lõppnäitajaid noorkaladest proovide võtmise etapil (vt punktid 36 ja 38 ja 9. liide). Lisaks peaks põlvkonna F1 koorumisjärgne ellujäämus olema kokkupuute suuruse järgi teises rühmas vähemalt nõutaval miinimumtasemel (~ 20 %). Need ei ole otseselt nõuetekohasuse kriteeriumid, vaid soovitusel, mis võimaldavad arvutada usaldusväärseid NOEC väärtusi.

10. Kui leitakse kõrvalekaldeid katse nõuetekohasuse kriteeriumidest, tuleks kaaluda selliste kõrvalekallete mõju katsetulemuste usaldusväärsusele ning esitada need kõrvalekalded ja kaalutlused katseprotokollis.

MEETODI KIRJELDUS

Seadmed

11. Tavapärased laboriseadmed, eeskätt järgmised seadmed:

- a) hapnikumõõtur ja pH-meeter;
- b) seadmed vee kareduse ja leelisuse määramiseks;
- c) asjakohased temperatuuri reguleerimise ja soovitatavalt selle pideva jälgimise seadmed;
- d) soovitatava biomassisisalduse ja asustustiheduse jaoks piisava suurusega keemiliselt inertsest materjalist proovinõud (vt 3. liide);
- e) sobiva täpsusega kaal (st täpsusega $\pm 0,5$ mg).

Vesi

12. Katses võib kasutada sellist vett, milles katsealune liik kasvab ja milles tal on piisavalt pikk eluiga. Vesi peab olema kogu katse jooksul püsiva kvaliteediga. Tagamaks, et lahjendamiseks kasutatav vesi ei mõjutaks liigselt katsetulemusi ega põhjustaks näiteks uuritava kemikaaliga komplekside moodustumist või avaldaks negatiivset mõju sugukarja jõudlusele, tuleks kindlate ajavahemike järel võtta analüüsimiseks veeproove. Kui lahjendusvesi on teadaolevalt suhteliselt püsiva kvaliteediga, tuleks raskemetallide (nt Cu, Pb, Zn, Hg, Cd ja Ni), peamiste anioonide ja kationide (nt Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- ja SO_4^{2-}), pestitsiidide, orgaanilise süsiniku ja hõljuvaine sisaldus määrata näiteks iga kuue kuu järel. Lahjendusvee mõned nõutavad keemilised omadused on esitatud 2. liites. Vee pH peaks olema vahemikus 6,5–8,5, kuid ei tohiks ühe katse jooksul muutuda rohkem kui $\pm 0,5$ pH-ühikut.

Kokkupuutesüsteem

13. Kokkupuutesüsteemi konstruktsiooni ja selles kasutatavaid materjale ei ole täpsustatud. Katsesüsteemi ehitamiseks tuleks kasutada klaasi, roostevaba terast või muid keemiliselt inertseid materjale, mis ei ole varasemate katsete käigus saastunud. Käesolevas katses

kasutamiseks sobiv kokkupuutesüsteem võib koosneda pideva läbivooluga süsteemist (4–13).

Katselahused

14. Uuritava kemikaali põhilahus tuleks viia kokkupuutesüsteemi sobiva pumba abil. Põhilahuse vooluhulka tuleb kalibreerida enne kokkupuute algust põhilahuse kohta tehtava analüüsi tulemuste põhjal ning seda tuleb katse jooksul regulaarselt volumetriliselt kontrollida. Igas kambri oleval uuritaval lahust värskendatakse piisaval määral (nt vähemalt 5 ja kuni 16 kambri mahu värskendust päevas või voolukiirus kuni 20 ml/min) olenevalt uuritava kemikaali püsivusest ja vee kvaliteedist.
15. Valitud kontsentratsiooniga katselahused valmistatakse põhilahuse lahjendamise teel. Põhilahuse valmistamiseks tuleks uuritavat kemikaali lahjendusvees mehaaniliselt teel (nt segamine ja/või ultrahelitoetus) soovitatavalt lihtsalt segada või loksutada. Sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse saamiseks võib kasutada küllastuskolonne/-süsteeme või passiivse doseerimise meetodeid (14). Lahustite ja kandeainete kasutamist tuleks kõigi vahenditega vältida, sest 1) teatud lahustid võivad ise põhjustada mürgisust ja/või soovimatuid või ootamatuid reaktsioone; 2) kemikaalide uurimine nende vees lahustuvusest kõrgemal kontsentratsioonil (nagu lahustite kasutamise puhul sageli juhtub) võib raskendada toimet avaldava kontsentratsiooni täpset kindlakstegemist; 3) lahustite kasutamine pikaajalistes katsetes võib põhjustada mikroobide tegevusega seotud märkimisväärset bioloogilist määrdumist, mis võib mõjutada keskkonnatingimusi ja kokkupuutekontsentratsioonide säilitamise võimet ning 4) kui puuduvad varasemad andmed, mille kohaselt lahusti ei moonuta uuringu tulemust, tuleb lahusti kasutamiseks teha lahustiga kontroll, mis aga mõjutab loomade heaolu, kuna katse jaoks on sel juhul vaja rohkem loomi. Raskesti uuritava kemikaali puhul võib lahustit kasutada viimase võimalusena ning parima meetodi kindlakstegemisel tuleb arvesse võtta OECD juhendit nr 23 raskesti uuritavate ainete ja segude veekeskkonna suhtes avalduva mürgisuse uurimise kohta (15). Lahusti valiku määravad uuritava kemikaali keemilised omadused ja olemasolevad varasemad andmed lahusti kasutamise kohta. Lahusti kandeainete kasutamise korral tuleb lisaks ilma lahustita (negatiivsetele) kontrollidele (üksnes lahjendusvesi) hinnata ka sobivaid lahustiga kontrole. Kui lahusti kasutamine on vältimatu ja tekib mikroobne aktiivsus (bioloogiline määrdumine), on soovitatav iga paagi bioloogiline määrdumine kogu katse jooksul (vähemalt kord nädalas) registreerida/protokollida. Ideaaljuhul peaks lahusti kontsentratsioon olema lahustiga kontrollis ja kõigis katseproovides pidevalt ühtlane. Kui lahusti kontsentratsioon ei ole pidevalt ühtlane, tuleks lahustiga kontrolliks kasutada katseproovide kõige suuremat lahusti kontsentratsiooni. Lahusti kandeaine kasutamise korral ei tohiks lahusti suurim kontsentratsioon ületada 100 µl/l või 100 mg/l (15) ja soovitatavalt tuleks hoida lahusti kontsentratsioon võimalikult madalal (nt < 20 µl/l), et vältida lahusti võimalikku mõju mõõdetavatele lõppnäitajatele (16).

Katseloomad

Kalade valimine ja pidamine

16. Katses kasutatav liik on jaapani riisikala *Oryzias latipes*, kuna sellel on lühike elutsükkel ja võimalus teha kindlaks geneetilist sugu. Kuigi sarnase katse-eeskirja jaoks võivad sobida ka muud väikesed kalaliigid, on käesolevas katsemeetodis kirjeldatud konkreetsed katsemeetodid ja vaatluste lõppnäitajad kohaldatavad üksnes jaapani riisikala suhtes (vt punkt 1). Riisikala paljunemist vangistuses on lihtne esile kutsuda; on olemas selle kasvatamist käsitlevad avaldatud meetodid (17–19), samuti andmed lühiajalise letaalsuse, varase elujärgu ja kogu elutsükli katsete kohta (5–6, 8–9, 20). Kõigi kalade puhul kasutatakse valgustusperioodi 16 h valgust ja 8 h pimedust. Kalu söödetakse soolase vee krevettide (*Artemia* spp.) elusate noorjärgus isenditega, millele võib vajadusel lisada kaubanduslikult müüdavat helvessöötta. Kaubanduslikult müüdavat helvessöötta tuleb korrapäraselt analüüsida saasteainete suhtes.
17. Sobivate kasvatusmeetodite järgimise korral ei ole kohustuslik rakendada konkreetset kasvatuseskirja. Näiteks võib riisikala kuni 4. viljastamisjärgse nädalani kasvatada 2 l proovinõudes tihedusega 240 kalavastset nõu kohta, seejärel kuni 8. viljastamisjärgse nädalani 2 l nõudes tihedusega 10 kala nõu kohta. Pärast seda paigutatakse kalad sigimispaaridena 2 l nõudesse.

Kalade kohandamine ja valimine

18. Katsealused kalad tuleks valida ühest laboriparvest, mida on vähemalt kahe nädala vältel enne katset kohandatud selliste veekvaliteedi ja valgustustingimustega, mis sarnanevad katses kasutatavatele tingimustele (märkus: nimetatud kohanemisperiood ei asenda kokkupuute-eeset perioodi). Soovitavalt tuleks katsealused kalad soetada kohalikust kasvandusest, sest täiskasvanud kalade transportimine põhjustab stressi ja võib häirida kudemist. Pidamisperioodil tuleks kalu kaks korda päevas sööta soolase vee krevettidega ning kokkupuute etapil tuleks sellele vajaduse korral lisada kaubanduslikult müüdavat helvessöötta. Piisava replitseeritavuse tagamiseks peetakse katse alustamise eeltingimuseks vähemalt 42 sigimispaari olemasolu (54 sigimispaari juhul, kui on vaja teha lahustiga kontroll, kuna puuduvad piisavad varasemad andmed, mis võimaldaks kasutada ainult lahustit). Lisaks tuleb põlvkonna F0 iga sigimispaari puhul kontrollida XX-XY kromosoomide (st kummagi soo sugukromosoomide normaalkomplekti) olemasolu, et vältida spontaansete XX isaste kaasamist (vt punkt 39).
19. Kohanemise etapil tuleb registreerida kasvukalade seas esinev suremus ning pärast 48-tunnist rahunemisperioodi kohaldatakse järgmisi kriteeriume.
 - Kui suremus kasvupopulatsioonis on seitsme päeva jooksul enne katsesüsteemi üleviimist suurem kui 10 %, jäetakse kogu partii kõrvale.

- Kui suremus populatsioonis on seitsme päeva jooksul enne katsesüsteemi üleviimist suurem kui 5–10 %, lastakse kaladel veel seitse päeva kohaneda nii, et kohanemisperiood on kokku kaks nädalat. Kui kõnealuse järgmise seitsme päeva jooksul on suremus suurem kui 5 %, jäetakse kogu partii kõrvale.
 - Kui suremus populatsioonis on seitsme päeva jooksul enne katsesüsteemi üleviimist väiksem kui 5 %, loetakse partii vastuvõetavaks.
20. Katsele eelneva kahenädalase kohanemisperioodi vältel ja kokkupuute ajal ei tohiks kaladel haigusi ravida ning võimaluse korral tuleks haiguste ravi täielikult vältida. Kliiniliste haigustunnustega kalu ei tohiks uuringus kasutada. Katsele eelnenud perioodil tehtud vaatlused ning haiguste ennetamiseks ja raviks kasutatud meetodid tuleks dokumenteerida.
21. Kokkupuuteperioodi tuleks alustada eristatavate sootunnuste ja geneetiliselt kindlaks tehtud sooga täiskasvanud kaladega, kes pärinevad temperatuuril 25 ± 2 °C kasvatatud labori suguküpsete loomade varudest. Kalade sigimisvõime (st varasem eluvõimeliste järglaste saamine) peaks olema kokkupuutele eelneva nädala jooksul kontrollitud. Katses kasutatavas kalade rühmas peaks kõikide kalade kehamass soo järgi jääma katse alguses vahemikku ± 20 % samasooliste kalade massi aritmeetilisest keskmisest. Hinnangulise keskmise kehamassi leidmiseks tuleks enne katset kalu osaliselt kaaluda. Valitud kalad peaksid olema vähemalt 12 nädalat vanad (alates viljastamisest) ning nende kehamass peaks olema emastel ≥ 300 mg ja isastel ≥ 250 mg.

KATSEPLAAN

Katsekontsentratsioonid

22. Soovitavalt tuleks kasutada kemikaali viit kontsentratsiooni ja kontrolli/kontrolle. Katsekontsentratsioonide vahemiku valimisel tuleks arvesse võtta kõiki teabeallikaid, sealhulgas kvantitatiivseid struktuur-aktiivsussõltuvusi (QSAR), analoogmeetodeid, kaladega tehtud muude katsete, näiteks ägeda mürgisuse katsete (käesoleva lisa peatükk C.1), kalade paljunemise lühiajaliste katsete (käesoleva lisa peatükk C.48) ja muude katsemeetoditega (nt käesoleva lisa peatükid C.15, C.37, C.41, C.47 või C.49; (21–26) saadud tulemusi, kui need on kättesaadavad, ning vajaduse korral ka vahemiku leidmise katsega (mis võib hõlmata sigimisetappi) kogutud andmeid. Vajaduse korral võib vahemiku leidmise katse läbi viia lõpliku katsega sarnastel tingimustel (veekvaliteet, katsesüsteem, loomade biomass). Kui tuleb kasutada lahustit, mille kohta puuduvad varasemad andmed, saab vahemiku leidmise katse abil kontrollida lahusti sobivust. Suurim katsekontsentratsioon ei tohiks ületada vees lahustuvuse taset 10 mg/l või ühte kümnnendikku 96h-LC50 väärtusest (27). Vähim kontsentratsioon peaks olema 10–100 korda väiksem kui suurim kontsentratsioon. Lisaks annuse-toime seoste mõõtmisele võimaldab käesolevas katses viie kontsentratsiooni kasutamine kindlaks määrata ka vähima täheldatavat toimet

avaldava kontsentratsiooni (LOEC) ja toimet mitte avaldava kontsentratsiooni (NOEC), mis on mõnes regulatiivses kavas või jurisdiktsioonis nõutavad riskihindamise jaoks. Üldiselt peaks uuritava kemikaali järjestikuste nominaalsete kontsentratsioonide vahe kordaja olema $\leq 3,2$.

Katse- ja kontrollrühmades kasutatavad paralleelnõud

23. Iga katsekontsentratsiooni kohta tuleks kasutada vähemalt kuut paralleelnõud (vt 7. liide). Sigimisetapil (välja arvatud põlvkonna F0 puhul) tuleks paralleelnõude arv viljakuse hindamiseks kahekordistada ning iga paralleelnõu peab sisaldama üksnes ühte sigimispaari (vt punkt 42).
24. Lisaks katsekontsentratsioonidele tuleks kasutada ka lahjendusveega kontrolli ja vajaduse korral lahustiga kontrolli. Piisava statistilise võimsuse tagamiseks tuleks kontrollide puhul kasutada kahekordset paralleelkambrite arvu (st vähemalt 12 paralleelnõud). Sigimisetapil kontrollrühma paralleelnõude arv kahekordistatakse (st vähemalt 24 paralleelnõud, millest igaüks sisaldab üksnes ühte sigimispaari). Pärast sigimist peaksid kontrollrühma paralleelnõud sisaldama kuni 20 embrüot (kala).

KATSE KÄIK

Katse alustamine

25. Katse põlvkonnana F0 kasutatakse suguliselt aktiivseid täiskasvanud kalu, kes valitakse kahe kriteeriumi põhjal: vanus (üldjuhul rohkem kui 12. viljastamisjärgne nädal, aga soovitatavalt mitte rohkem kui 16. viljastamisjärgne nädal) ja kehamass (emastel ≥ 300 mg ja isastel ≥ 250 mg).
26. Nimetatud tingimustele vastavad emase-isase paarid paigutatakse eraldi paralleelnõudesse: katse alguses 12 paralleelnõud kontrollrühmas ja kuus paralleelnõud kemikaaliga töödeldavates rühmades. Proovinõud jaotatakse juhuslikkuse alusel kontsentratsioonirühma (nt T1–T5 ja kontroll) ja paralleelrühma (nt kontrollid A–L ja kontsentratsiooniproovid A–F) ning asetatakse seejärel kokkupuutesüsteemi, kus igas nõus kasutatakse sellele ette nähtud vooluhulka.

Kokkupuutetingimused

27. Katse parameetrite ja tingimuste täielik ülevaade on esitatud 3. liites. Nende nõuete järgimise korral peaksid kontrollrühma kalade lõppnäitajad olema sarnased 4. liites loetletud väärtustele.
28. Katse ajal tuleks iga kontsentratsioonirühma ja kontrollrühma kohta vähemalt ühes katsenõus mõõta lahustunud hapniku sisaldust, pH-d ja temperatuuri. Nimetatud mõõtmisi (v.a temperatuur) tuleks teha kokkupuuteperioodi vältel vähemalt kord nädalas. Keskmise veetemperatuur peaks olema kogu uuringu vältel vahemikus 24–26 °C. Temperatuuri

tuleks mõõta kokkupuuteperioodi vältel iga päev. Vee pH peaks olema vahemikus 6,5–8,5, kuid ei tohiks ühe katse jooksul muutuda rohkem kui $\pm 0,5$ pH-ühikut. Ühe kontsentratsioonirühma paralleelnõude ega katse kontsentratsioonirühmade vahel ei tohiks olla statistilisi erinevusi vee temperatuuris (igapäevaste temperatuurimõõtmiste põhjal; välja arvatud põgusad kõrvalekalded).

Kokkupuute kestus

29. Katses viiakse põlvkonna F0 sigimisvõimelised kalad kemikaaliga kokkupuutesse kolmeks nädalaks. Neljandal nädalal (u 24. katsepäeval) moodustatakse põlvkond F1, põlvkonna F0 sigimispaarid surmatakse humaansel viisil ning nende kehamass ja pikkus registreeritakse (vt punkt 34). Seejärel viiakse põlvkond F1 veel 14 nädalaks kemikaaliga kokkupuutesse (põlvkonna F1 kokkupuuteaeg on kokku 15 nädalat) ja põlvkond F2 jääb kokkupuutesse kaheks nädalaks kuni koorumiseni. Katse põhiosa kogukestus on 19 nädalat (st kuni põlvkonna F2 koorumiseni). Katse ajakava on esitatud tabelis 2 ja seda on täpsemalt selgitatud 9. liites.

Söötmisrežiim

30. Kalu võib sööta piiramatus koguses soolase vee krevettide (*Artemia* spp.) 24 tunni vanuste noorjärgus isenditega, millele võib vajadusel lisada kaubanduslikult müüdavat helvessööta. Kaubanduslikult müüdavat helvessööta tuleks regulaarselt analüüsida saasteainete, näiteks kloororgaaniliste pestitsiidide, polütsükliliste aroomaatsete süsivesinike ja polüklooritud bifenüülide sisalduse suhtes. Suures koguses endokriinse toimega aineid (nt fütoöstrogeenid) sisaldavat sööta, mis võib katses tekkivat reaktsiooni mõjutada, ei tohiks kasutada. Sööda ülejäägid ja väljaheited tuleks eemaldada katsenõudest vastavalt vajadusele, näiteks iga nõu põhja ettevaatliku puhastamisega sifooni abil. Üks või kaks korda nädalas tuleks puhastada ka iga nõu külgi ja põhja (nt spaatliga kaapimise teel). Üks söötmisgraafiku näide on esitatud 5. liites. Söödaratsioon sõltub kalade arvust paralleelnõus. Seetõttu vähendatakse söödaratsiooni juhul, kui paralleelnõus esineb kalade suremust.

Analüüsid ja mõõtmised

31. Enne kokkupuuteperioodi algust tuleks tagada kemikaali lisamise süsteemi nõuetekohane toimimine. Tuleks kindlaks teha kõik vajalikud analüüsimeetodid, sealhulgas peaks olema piisavalt teavet uuritava kemikaali püsivuse kohta katsesüsteemis. Katse ajal määratakse uuritava kemikaali kontsentratsioonid sobivate ajavahemike järel, soovitatavalt vähemalt igal nädalal iga kontsentratsioonirühma ühes paralleelnõus, jälgides, et eri nädalatel kasutataks samas kontsentratsioonirühmas erinevaid paralleelnõusid.
32. Katse ajal tuleks ettenähtud ajavahemike järel (nt vähemalt kolm korda nädalas) kontrollida lahjendusvedeliku ja põhilahuse vooluhulka. Tulemused peaksid soovitatavalt põhinema mõõdetud kontsentratsioonidel. Ent kui uuritava kemikaali kontsentratsiooni

lahuses on suudetud kogu katse jooksul säilitada rahuldavalt vahemikus $\pm 20\%$ keskmisest mõõdetud väärtusest, võivad tulemused põhineda kas nominaalsetel või mõõdetud väärtustel. Olulisel määral kaladesse kogunevate uuritavate kemikaalide puhul võivad katsekontsentratsioonid kalade kasvades väheneda. Sellisel juhul soovitatakse kohandada iga kambri katselahuse värskendamise sagedust, et hoida katsekontsentratsioone võimalikult ühtlasena.

Vaatlused ja mõõdetavad lõppnäitajad

33. Populatsiooni tasemel ilmneva võimaliku toime hindamiseks mõõdetavad lõppnäitajad on sigivus, viljakus, koorumine, kasv ja ellujäämus. Lisaks tuleks iga päev vaadelda kalade käitumist ja registreerida ebatavaline käitumine. Muud mehhanistlikud lõppnäitajad on maksa vitellogeniini (*vtg*) mRNA või vitellogeniini valgu (VTG) tase, mis määratakse immuunanalüüsiga (28), fenotüübilised soomarkerid (nt isaskaladele iseloomulikud pärakuuime papillaarjätked), sugunäärmete koeanalüüsi põhjal määratud sugu ning neerude, maksa ja sugunäärmete histopatoloogiline hindamine (vt tabelis 1 esitatud lõppnäitajate loendit). Kõikide nimetatud konkreetsete lõppnäitajate hindamisel lähtutakse isendi geneetilise soo kindlakstegemisest riisikala isassugu määrava geeni *dmy* esinemise või puudumise põhjal (vt punkt 41). Lisaks hinnatakse kudemise aega. Peale selle võib pärakuuime papillaarjätkede loendamise teel kogutud andmete põhjal kindlaks teha lihtsa fenotüüpse soolise jagunemise, et liigitada riisikala isendid fenotüübi järgi isaseks või emaseks. Käesoleva katsemeetodi puhul ei eeldata, et sellega on võimalik tuvastada mõõdukaid kõrvalekaldeid eeldatavast soolisest jagunemisest, kuna kalade suhteliselt väike arv proovi kohta ei taga piisavat statistilist võimsust. Pelegi uuritakse histopatoloogilise hindamise käigus sugunääret ja viiakse läbi palju põhjalikumad analüüsid sugunäärme fenotüübi hindamiseks geneetilise soo kontekstis.
34. Käesoleva katsemeetodi peamine eesmärk on hinnata uuritava kemikaali võimalikku toimet populatsioonile. Lisaks aitavad mehhanistlikud lõppnäitajad (vitellogeniin, teisesed sootunnused ja mõned sugunäärmete histopatoloogiaga seotud toimed) kindlaks teha, kas mõni toime avaldub endokriinfunktsiooni vahendusel. Samas võivad kõnealuseid mehhanistlikke lõppnäitajaid mõjutada ka süsteemsed või muud mürgised toimed. Seetõttu võidakse üksikasjalikult hinnata ka maksa ja neerude histopatoloogiat, et mehhanistlikes lõppnäitajates avalduvaid reaktsioone paremini mõista. Ent juhul, kui nimetatud üksikasjalikke hindamisi ei tehta, tuleks siiski tähele panna ja aruannetes kajastada histopatoloogilise hindamise käigus juhuslikult avastatud suuri kõrvalekaldeid.

Kalade humaanne surmamine

35. Põlvkondade F0 ja F1 kokkupuute lõpetamisel, kui võetakse noorkalade osaproove, tuleks kalad surmata vajaliku koguse anesteetikumilahusega (nt trikaiinmetaansulfonaat, MS-222, CASi nr 886-86-2, kontsentratsiooniga 100–500 mg/l), mis on limaskestast ärrituse vähendamiseks puhverdatud NaHCO₃-ga (naatriumvesinikkarbonaat, CASi nr 144-55-8)

kontsentratsioonis 300 mg/l. Kui kaladel ilmneb märkimisväärsete kannatuste tunnuseid (mis on väga raskekujulised ja kalade surm on usaldusväärselt prognoositav) ja nad on surmaeelses seisundis, tuleks nad tuimastada ja surmata ning arvestada nende andmetega suremuse analüüsimisel. Haigestunud kalade surmamise juhud tuleb üles märkida ja neid aruannetes kajastada. Olenevalt sellest, millisel uuringu etapil kalad surmatakse, võidakse kalu säilitada histopatoloogiliseks analüüsiks (kalade fikseerimine võimalikuks histopatoloogia uuringuks).

Marja ja kalavastsete käitlemine

Sigimispaaride marjaterade kogumine järgmise põlvkonna paljundamiseks

36. Põlvkondade F0 ja F1 vahel kogutakse marja 4. katsenädala esimesel päeval (või vajadusel esimesel kahel päeval) ning põlvkondade F1 ja F2 vahel 18. katsenädala esimesel päeval. Põlvkond F1 on 18. katsenädalaks täiskasvanud ja elanud viljastamisest alates 15 nädalat. Kõik marjaterad tuleb eemaldada nõust üks päev enne nende kogumist tagamaks, et kõik sigimispaarilt kogutud marjaterad pärinevad samast kudust. Mõnikord kannavad emased riisikalad oma marjaterasid pärast kudemist pärakuava juures, et paigutada need substraadile. Kuna nõus substraati ei ole, võib marjaterad leida emase kala küljest või nõu põhjast. Olenevalt asukohast eemaldatakse marjaterad ettevaatlikult emase kala küljest või kogutakse põhjast sifooniga 4. katsenädalal (põlvkond F0) või 18. katsenädalal (F1). Kõigist samast kontsentratsioonirühmast kogutud marjateradest moodustatakse enne inkubatsioonikambritesse paigutamist üks koondkogum.
37. Marjaterasid koos hoidvad kuduniidid eemaldatakse. Igalt sigimispaarilt (üks paar paralleelnõu kohta) kogutakse viljastatud marjaterad (kuni 20), millest moodustatakse kontsentratsioonirühmade lõikes koondkogumid, mis jaotatakse süstemaatilisel sobivatesse inkubatsioonikambritesse (6. ja 7. liide). Kvaliteetse stereomikroskoobi all on võimalik näha esimesi viljastamise/arengu tunnuseid, näiteks kõldkesta (koorioni) kerkimist, rakkude jagunemist või blastula kujunemist. Inkubatsioonikambrid võib paigutada iga kontsentratsioonirühma jaoks valmis pandud eraldi inkubatsiooniakvaariumidesse (sel juhul tuleb nendes mõõta veekvaliteedi näitajaid ja uuritava kemikaali kontsentratsioone) või paralleelakvaariumisse, mis hakkab sisaldama koorunud vastseid (*nt* eelvastseid). Kui vaja on ka teist kogumispäeva (katse 23. päev), tuleb mõlemal päeval kogutud marjateradest moodustada koondkogum, mis jaotatakse seejärel süstemaatilisel kontsentratsioonirühma paralleelnõudesse.

Marjaterade kasvatamine koorumiseni

38. Viljastatud marjaterasid loksutatakse näiteks marjainkubaatoris pidevalt õhumullide abil või marjainkubaatori üles-alla liigutamise teel. Viljastatud marjaterade (embrüote) suremust kontrollitakse ja registreeritakse iga päev. Surnud marjaterad eemaldatakse inkubaatoritest (9. liide). Seitsmendal viljastamisjärgsel päeval loksutamine lõpetatakse või seda vähendatakse, et viljastatud marjaterad sadestuksid inkubaatori põhja. See soodustab

koorumist, mis tavaliselt toimub järgmise ühe kuni kahe päeva jooksul. Igas menetlus- ja kontrollrühmas loendatakse (paralleelnõude lõikes koondatult) vastkoorunud isendid (noored vastsed; eelvastsed). Viljastatud marjaterad, mis ei ole koorunud kontrollrühma koorumispäeva mediaaniga võrreldes kaks korda pikema aja jooksul (tavaliselt 16 või 18 päeva pärast viljastamist), tunnistatakse eluvõimetuks ja jäetakse kõrvale.

39. Igasse paralleelnõusse pannakse 12 vastkoorunud isendit. Inkubatsioonikambritest kogutud vastkoorunud isenditest moodustatakse koondkogum, mis jaotatakse süstemaatiliselt paralleelnõudesse (7. liide). Selleks võib valida kontsentratsioonirühmast juhuslikult ühe vastkoorunud isendi ning lisada selle üksteise järel juhuslikult valitud paralleelakvaariumisse. Iga nõu peaks sisaldama võrdse arvul ($n = 12$) koorunud vastseid (mitte rohkem kui 20 vastset nõu kohta). Kui vastsete arv ei ole kontsentratsiooni rühma kõikide paralleelnõude täitmiseks piisav, soovitakse moodustada võimalikult palju 12 vastsega paralleelnõusid. Vastsete ohutuks käitlemiseks saab kasutada suure avaga klaasipipetti. Kõik üle jäävad vastsed surmatakse humaanselt anesteetikumi abil. Mõne nädala jooksul enne sigimispaaride ettevalmistamist tuleks iga paralleelnõu puhul registreerida esimese kudemissündmuse päev.

Sigimispaaride ettevalmistamine

Uimede lõikamine ja genotüübilise soo kindlakstegemine

40. Genotüübiline sugu tehakse uimest lõigatud tükkide abil kindlaks 9.–10. viljastamisjärgsel nädalal (st põlvkonna F1 puhul 12.–13. katsenädalal). Kõik nõus olevad kalad tuimastatakse (kasutades heakskiidetud meetodit, nt IACUC) ning iga kala sabauime selja- või kõhupoolsest otsast võetakse väike koeproov, et teha kindlaks isendi genotüübiline sugu (29). Paralleelrühma kalu võib hoida paralleelnõus väikestes puurides (võimaluse korral üks kala puuri kohta). Teise variandina võib igas puuris hoida kahte kala, kui need on üksteisest eristatavad. Üks eristamise meetod on teha koeproovi võtmisel sabauime erinevad lõiked (*nt* ühel kalal seljapoolsest ja teisel kõhupoolsest otsast).
41. Riisikala genotüübiline sugu määratakse Y-kromosoomis asuva tuvastatud järjestusega geeni (*dmy*) põhjal. *Dmy* olemasolu näitab, et tegemist on XY-isendiga, olenemata kala fenotüübist, samas kui *dmy* puudumine osutab XX-isendile, olenemata fenotüübist (30, 31). Igast uimetükist eraldatakse desoksüribonukleiinhape (DNA) ja *dmy* olemasolu või puudumise kindlakstegemiseks saab kasutada polümeraasi ahelereaktsiooni (PCR) meetodeid (vt käesoleva lisa peatüki C.41 9. liide või (29) 3. ja 4. liide).

Sigimispaaride moodustamine

42. Genotüübilise soo andmete põhjal moodustatakse XX-XY sigimispaarid, olenemata välisest fenotüübist, mis võib uuritava kemikaaliga kokku puutudes muutuda. Iga kala genotüübilise soo kindlakstegemisele järgneval päeval valitakse igast paralleelnõust juhuslikult kaks XX-kala ja kaks XY-kala ning neist moodustatakse kaks XX-XY

sigimispaari. Kui paralleelnõu ei sisalda kahte XX- või XY-kala, tuleb vastavad kalad võtta sama kontsentratsioonirühma teistest paralleelnõudest. Eesmärk on saada soovitud arvul paralleelseid sigimispaare nii igasse kontsentratsioonirühma (12 paari) kui ka kontrollrühma (24 paari). Sigimispaaride moodustamisel tuleks välistada ilmsete kõrvalekalletega kalad (probleemid ujupõiega, deformeerunud selgroog, äärmuslikult suur või väike kasv jne). Põlvkonna F1 sigimisetapil peaks iga paralleelnõu sisaldama üksnes ühte sigimispaari.

Noorkalade proovide võtmine ja lõppnäitajate hindamine

Sigimispaaridesse mittekuuluvate kalade proovide võtmine

43. Pärast sigimispaaride moodustamist surmatakse valimata jäänud kalad humaanselt 12.–13. katsenädalal (põlvkond F1), et mõõta noorkalade lõppnäitajaid. Äärmiselt oluline on käidelda kalu nii, et säiliks sigimispaaride valimise eesmärgil kindlaks tehtud genotüübilise soo tuvastamise võimalus. Kõigi kogutud andmeid analüüsitakse konkreetse kala genotüübilisest soost lähtudes. Iga kala kasutatakse erinevates lõppnäitajate mõõtmistes, mis hõlmavad järgmist: noorkalade ellujäämismäärad (7.–12./13. katsenädal, põlvkond F1), pikkuse (kui sabauime on geneetilise soo analüüsiks kasutatud proovide võtmise tõttu lühendatud, võib mõõta standardpikkust; kui *dmy* määramiseks on sabauime selja või kõhu poolt üksnes osaliselt kärbitud, võib mõõta üldpikkust) ja kehamassi (st märgmass, kuivatuspaberiga kuivatatult) juurdekasv, maksa *vtg* mRNA (või VTG) ja pärakuuime papillaarjätked (vt tabelid 1 ja 2). Pange tähele, et kontsentratsioonirühma keskmise juurdekasvu arvutamiseks tuleb mõõta ka sigimispaaride massid ja pikkused.

Koeproovide võtmine ja vitellogeniinisalduse mõõtmine

44. Maks eraldatakse ning säilitatakse temperatuuril ≤ -70 °C kuni *vtg* mRNA (või VTG) mõõtmiseni. Kala saba koos pärakuuimega konserveeritakse sobivas (nt Davidsoni) fiksaatoris või pildistatakse nii, et hiljem oleks võimalik loendada pärakuuime papillaarjätkeid. Soovi korral võib sellel etapil konserveerimiseks proove võtta ka muudest kudedest (nt sugunäärmed). Maksa VTG kontsentratsioon tuleks määrata homoloogse ELISA meetodiga (riisikala puhul soovitatav menetlus on esitatud käesoleva lisa peatüki C.48 6. liites). Teise variandina on USA Keskkonnakaitseamet kirjeldanud *vtg* mRNA kvantitatiivse määramise meetodeid: *vtg I* geeni mRNA eraldamine maksaproovist ja *vtg I* geeni koopiate loendamine (ühe nanogrammi mRNA üldkoguse kohta) kvantitatiivse PCR-meetodiga (29). Selle asemel, et loendada *vtg* geeni koopiaid nii kontrollrühmas kui ka kontsentratsioonirühmades, võib vähem ressursinõudliku ja tehniliselt lihtsama meetodina uurida *vtg I* ekspressiooni suhtelist muutust kontrollrühma ja kontsentratsioonirühmade võrdluses.

Teised sootunnused

45. Tavaoludes on ainult suguküpsedel isastel riisikaladel papillaarjätked, mis kasvavad teiseste sootunnustena mõnedele pärakuuime kiirelülidele ning mida saab kasutada

endokriinfunktsiooni kahjustava toime biomarkerina. Pärakuuime papillaarjätmete (papillaarjätmetega kiirelülide) loendamise meetod on esitatud 8. liites. Isendi pärakuuime papillaarjätmete arvu kasutatakse ka selleks, et liigitada isendid välise fenotüübi järgi isaseks või emaseks ning arvutada selle põhjal sooline jaotumine igas paralleelnõus. Rohkem kui 0 papillaarjätkega riisikala liigitatakse isaseks; 0 papillaarjätkega riisikala liigitatakse emaseks.

Sigivuse ja viljakuse hindamine

46. Sigivust ja viljakust hinnatakse põlvkonna F0 puhul 1.–3. katsenädalal ning põlvkonna F1 puhul 15.–17. katsenädalal. Igalt sigimispaarilt kogutakse 21 järjestikusel päeval marjaterasid. Igal hommikul eemaldatakse marjaterad ettevaatlikult võrku püütud emaste küljest ja/või kogutakse sifooni abil akvaariumi põhjast. Iga päev registreeritakse kõigi paralleelsete sigimispaaride sigivuse ja viljakuse näitajad. Sigivuse näitajana käsitatakse koetud marjaterade arvu ning viljakust mõõdetakse loendamise hetkeks viljastatud ja eluvõimeliste marjaterade arvu põhjal. Marjaterad tuleks loendada võimalikult kiiresti pärast kogumist.
47. Sigivuse registreerimiseks märgitakse iga päev üles iga paralleelse sigimispaaari marjaterade arv, mida analüüsitakse soovitud statistiliste meetoditega, kasutades paralleelnõude keskmisi väärtusi. Sigimispaaari viljakuse näitaja on sellelt paarilt pärit viljastatud marjaterade arv, mis on jagatud sellelt paarilt pärit marjaterade koguarvuga. Statistiliselt analüüsitakse viljakust suhtarvuna iga paralleelnõu kohta. Kooruvuse näitaja on vastkoorunud isendite arv, mis on jagatud paralleelnõusse pandud embrüote arvuga (tavaliselt 20). Statistiliselt analüüsitakse kooruvust suhtarvuna iga paralleelnõu kohta.

Täiskasvanud kalade proovide võtmine ja lõppnäitajate hindamine

Sigimispaaridesse kuuluvate kalade proovide võtmine

48. Pärast 17. katsenädalat (st pärast põlvkonna F2 edukat sigitamist) surmatakse põlvkonna F1 täiskasvanud kalad humaansel viisil ja hinnatakse nende erinevaid lõppnäitajaid (vt tabelid 1 ja 2). Pärakuuime papillaarjätmete loendamiseks (vt 8. liide) tehakse pärakuuimedest pildid ja/või eemaldatakse saba vahetult pärakuava tagant tehtava lõikega ning fikseeritakse see hilisemaks papillaarjätmete loendamiseks. Soovi korral võib sellel etapil võtta arhiveerimiseks proovi sabauimest, mis võimaldab kontrollida geneetilist sugu (*dmy*). Vajadusel võib võtta koeproovi, et kontrollida konkreetsete kalade sugu korduva *dmy* analüüsi abil. Enne kogu keha sobivasse (nt Davidsoni) fiksaatorisse asetamist avatakse kehaõõnsus, et võimaldada selle perfusiooni fiksaatoriga. Ent kui enne fikseerimist kasutatakse sobivat fiksaatori sissepääsu soodustavat meetodit, siis ei ole vaja kehaõõnsust avada.

Histopatoloogiline analüüs

49. Iga kala analüüsitakse histoloogiliselt, et leida võimalikke patoloogiaid sugunäärmete koes (30, 29). Nagu on osutatud punktis 33, võivad süsteemsed või muud mürgised toimed mõjutada käesoleva katsemeetodiga hinnatavaid muid mehhanistlikke lõppnäitajad (VTG, teisesed sootunnused ja mõned sugunäärmete histopatoloogiaga seotud toimed). Seetõttu võidakse üksikasjalikult hinnata ka maksa ja neerude histopatoloogiat, et mehhanistlikes lõppnäitajates avalduvaid reaktsioone paremini mõista. Ent juhul, kui nimetatud üksikasjalikke hindamisi ei tehta, tuleks siiski tähele panna ja aruannetes kajastada histopatoloogilise hindamise käigus juhuslikult avastatud suuri kõrvalekaldeid. Kaaluda võib meetodit, mille puhul alustatakse analüüsi suurima kemikaalikontsentratsiooniga rühmast (võrreldes kontrollrühmaga) ja jätkatakse allapoole liikudes kontsentratsioonirühmani, kus toimet ei avaldu, kuid soovitatav on tutvuda asjakohaste histopatoloogia juhenditega (29). Üldjuhul töödeldakse kõiki proove / tehakse proovidest lõiked, mida patoloog seejärel analüüsib. Seoses allapoole liikumise meetodi kasutamisega tuleb märkida, et Rao-Scotti kohandusega Cochran'e-i-Armitage'i lõiktestis (RSCABS) lähtutakse eeldusest, et dooside kasvades suureneb ka bioloogiline toime (patoloogia). Seetõttu on järelduste statistiline võimsus väiksem, kui vaadeldakse üksnes ühte suurt doosi ilma vahepealsete doosideta. Selline meetodi võib olla vastuvõetav juhul, kui suure doosi toime puudumises veendumiseks ei ole vaja teha statistilist analüüsi. Kõnealuse hindamise käigus selgitatakse välja ka sugunäärme fenotüüp.

Muud tähelepanekud

50. MEOGRTga saadavate andmete abil saab samaaegselt hinnata (nt tõendite kaalukuse meetodiga) vähemalt kahte liiki kahjuliku toime radasid, mis viivad sigimisvõime häireni: a) endokriinse toime rajad, mille puhul esinevad endokriinfunktsiooni häired hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete (HAS) teljel, ja b) muu kui endokriinse mürgisuse kaudu ellujäämist, kasvamist (pikkuses ja massis) ja sigimist pärssivad rajad. Käesolev katse hõlmab ka tavaliselt kroonilise mürgisuse katsetes (nt kogu elutsükli ja varase elujärgu katsed) mõõdetavaid lõppnäitajaid, mille abil saab hinnata nii endokriinse mürgisuse radasid kui ka muu kui endokriinse mehhanismi kaudu avalduvat mürgisust. Katse ajal tuleks iga päev vaadelda kalade käitumist ja registreerida ebatavaline käitumine. Lisaks tuleks registreerida suremuse näitajad ja arvutada kalade ellujäämus kuni väljapraakimise etapini (6./7. katsenädal), väljapraakimisest kuni noorkalade proovide võtmiseni (9.–10. viljastamisjärgne nädal) ning paaride moodustamisest kuni täiskasvanud kalade proovide võtmiseni.

Tabel 1. Ülevaade MEOGRT lõppnäitajatest*

Arengujärk	Lõppnäitaja	Põlvkond
Embrüo (2. viljastamisjärgne nädal)	Koorumine (% ja koorumiseni kulunud aeg)	F1, F2

Maim (4. viljastamisjärgne nädal)	Ellujäämus	F1
Noorkala (9. või 10. viljastamisjärgne nädal)	Ellujäämus	F1
	Kasv (pikkus ja mass)	
	Vitellogeniin (mRNA või valk)	
	Teisesed sootunnused (pärakuuime papillaarjätked)	
	Sooline jaotumine välistunnuste järgi	
	1. kudemiseni kulunud aeg	
Täiskasvanu (12.-14. viljastamisjärgne nädal)	Paljunemine (sigivus ja viljakus)	F0, F1
Täiskasvanu (15. viljastamisjärgne nädal)	Ellujäämus	F1
	Kasv (pikkus ja mass)	
	Teisesed sootunnused (pärakuuime papillaarjätked)	
	Histopatoloogiline analüüs (sugunääre, maks, neerud)	

* Neid lõppnäitajaid tuleb statistiliselt analüüsida.

AJAKAVA

51. MEOGRT näitlik ajakava on esitatud tabelis 2. MEOGRT hõlmab 4-nädalast põlvkonna F0 täiskasvanud isendite ja 15-nädalast põlvkonna F1 kokkupuudet ning teise põlvkonna (F2) kokkupuuteperioodi, mis kestab kuni kooremiseni (2. viljastamisjärgne nädal). Kokkuvõtte MEOGRT käigus läbi viidavatest tegevustest on esitatud 9. liites.

Tabel 2. MEOGRT kokkupuute ja mõõtmise lõppnäitajate ajakava

MEOGRT kokkupuute ja lõppnäitajate ajakava																			
F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																	1	2	
Katsenädal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Arengujärk					Embrüo				Vastne				Maim			Noorkala		Täiskasvanu	
Lõppnäitajad																			
Sigivus	F ₀													F ₁					• Katseplaani hõlmab 7 paralleelrühma: ○ 5 rühma, mida mõjutatakse uuritava kemikaaliga; ○ 2 kontrollrühma (lahusti kasutamise korral 4). • Rühmade koosseis: ○ 12 paralleelnõud sigivuse, täiskasvanu isendite patoloogia ja SSC uurimiseks (10.–18. nädalat); ○ 6 paralleelnõud koorumise, ellujäämise, vtg ning noorkalade SSC ja kasvu uurimiseks (1.–9. nädal) SSC – teisesed sootunnused; näd – nädalat; vtg – vitellogeniin
Viljakus	F ₀													F ₁					
Koorumine					F ₁													F ₂	
Ellujäämus						F ₁						F ₁						F ₁	
Kasv				F ₀								F ₁						F ₁	
Vitellogeniin												F ₁							
Teisesed sootunnused												F ₁						F ₁	
Histopatoloogiline analüüs																		F ₁	
Katsenädal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

ANDMETE ESITAMINE

Statistiline analüüs

52. Kuna genotüübiline sugu tehakse kindlaks kõikide katsealuste kalade puhul, tuleks andmeid analüüsida mõlema genotüübilise soo (XY-isased ja XX-emased) kohta eraldi. Selle tegemata jätmise vähendab oluliselt mis tahes analüüsi statistilist võimsust. Andmete statistiline analüüs peaks eelistatavalt toimuma vastavalt meetoditele, mida on kirjeldatud OECD koostatud juhendis ökotoksilisuse andmete statistilise analüüsi kaasaegsete meetodite rakendamise kohta (32). Täiendavaid juhiseid statistilise analüüsi tegemiseks on esitatud 10. liites.

53. Katseplaani ja valitud statistilised testid peaksid tagama piisava statistilise võimsuse, et tuvastada bioloogiliselt olulisi lõppnäitajate muutusi katses, mille puhul tuleb esitada täheldatava toime puudumise kontsentratsioon (NOEC) (32). Konkreetsetest toime avaldumise kontsentratsioonidest aru andmine võib sõltuda asjaomastest õigusraamistikust. Kindlaks tuleks teha iga olulise tuvastatava või hinnatava lõppnäitaja protsentuaalne muutus. Katseplaani tuleks sellest lähtuvalt kohendada. On vähetõenäoline, et kõikide lõppnäitajate puhul täheldatakse sama protsentuaalset muutust ning et on võimalik

koostada selline katseplaan, kus kõnealused kriteeriumid on täidetud kõikide lõppnäitajate puhul; seepärast on tähtis keskenduda nõuetekohase katse kavandamisel lõppnäitajatele, mis on asjaomase katse puhul olulised. Andmete töötlemise ja sobivaima statistilise testi või mudeli valimise lihtsustamiseks on 10. liites esitatud statistiline vooskeem ja juhised. Võib kasutada ka muid statistilisi meetodeid, kui need on teaduslikult põhjendatud.

54. Igas paralleelide rühmas on vaja analüüsida varieeruvust dispersioonanalüüsi või sagedustabeli abil ning kasutada selle analüüsi alusel valitud piisavaid ja asjakohaseid statistilisi analüüsimeetodeid. Igal eraldi kontsentratsioonil ja kontrollrühmas saadud tulemuste mitmeseks võrdlemiseks soovitakse pideva tunnuse puhul kasutada muutujate sammuviisilise elimineerimisega meetodit (nt Jonckheere'i-Terpstra testi). Kui andmete puhul ei täheldata monotoonset kontsentratsioonist sõltuvust, tuleks kasutada Dunnetti või Dunni testi (pärast andmete sobivat teisendamist, kui see on vajalik).
55. Sigivuse puhul tuleks marjaterasid loendada iga päev, kuid analüüsis võib kasutada marjaterade koguarvu või kordusmõõtmise näitajaid. Kõnealuse lõppnäitaja analüüsimist on täpsemalt selgitatud 10. liites. Raskusastme kujul esitatavate histopatoloogia andmete jaoks on välja töötatud uus statistiline test: Rao-Scotti kohandusega Cochran'e'i-Armitage'i lõiktest (RSCABS) (33).
56. Protokollis tuleks kajastada kõik kemikaaliga kontsentratsioonirühmades ilmnenud lõppnäitajad, mis erinevad oluliselt vastavatest kontrollrühma väärtustest.

Andmete analüüsiga seotud kaalutlused

Ebaõnnestunud kokkupuutetasemekatsete andmete kasutamine

57. Kui otsustatakse, et kas ühe paralleelrühma või terve kokkupuutetaseme puhul võib avalduda selge mürgisus ja see tuleks analüüsist kõrvale jätta, tuleb arvestada mitut tegurit. Määratluse kohaselt esineb selge mürgisus juhul, kui 3. ja 9. viljastamisjärgse nädala vahel mis tahes paralleelrühmas esinenud surmajuhtumite arv on > 4 ja see ei saa olla tingitud tehnilisest veast. Muud selge mürgisuse nähud on järgmised: veritsemine, ebatavaline käitumine, ebatavaline ujumisviis, isutus ja muud kliinilised haigustunnused. Subletaalse mürgisuse puhul võib olla vajalik kvalitatiivne hindamine; selle tegemisel peaks alati olema aluseks võrdlus lahjendusveega (üksnes puhas vesi) kontrollrühmaga. Kui suurima kontsentratsiooniga rühma(de)s esineb selge mürgisus, soovitakse need rühmad analüüsist välja jätta.

Lahustiga kontrollid

58. Lahusti kasutamist tuleks kaaluda üksnes viimase abinõuna, kui kõik muud kemikaali lisamise võimalused on läbi vaadatud. Kui kasutatakse lahustit, tuleb samal ajal teha kontrollkatse lahjendusveega. Katse lõpetamisel tuleb hinnata lahusti võimalikku mõju.

Seda tehakse lahustiga kontrollrühma ja lahjendusveega kontrollrühma statistilise võrdlemisega. Kõige asjakohasemad lõppnäitajad, mida tuleks kõnealuses analüüsis arvesse võtta, on kasvuga (massiga) seotud tegurid, kuna neid võib mõjutada üldine mürgisus. Kui nende lõppnäitajate puhul tuvastatakse lahjendusveega kontrollrühma ja lahustiga kontrollrühma vahel statistiliselt olulisi erinevusi, tuleb parimatest erialateadmistest lähtudes hinnata, kas see ohustab katse nõuetekohasust. Kui kahe kontrollrühma näitajad erinevad, tuleks kemikaaliga kokku puutunud rühmi võrrelda lahustiga kontrollrühmaga, välja arvatud juhul, kui on teada, et eelistada tuleb võrdlust lahjendusveega kontrollrühmaga. Kui kahe kontrollrühma vahel statistiliselt olulisi erinevusi ei ole, soovitatakse võrrelda uuritava kemikaaliga kokku puutunud rühmi mõlema kontrollrühma (lahustiga ja lahjendusveega) ühendatud näitajatega, välja arvatud juhul, kui on teada, et eelistada tuleb võrdlust ainult lahjendusveega või ainult lahustiga kontrollrühmaga.

Katseprotokoll

59. Katseprotokoll peaks sisaldama järgmist teavet.

Uuritav kemikaal:

- füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused;
- kemikaali identimisandmed;

ühest koostisosast koosnev aine:

- füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased andmed füüsikalis-keemiliste omaduste kohta;
- kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne, sealhulgas vajaduse korral orgaanilise süsiniku sisaldus;

mitmest koostisosast koosnev aine, tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal või segu:

- võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohaseid füüsikalis-keemilisi omadusi käsitlevatest andmetest.

Katsealune liik:

- teaduslik nimetus, liin (kui on), päritolu ning viljastatud marjaterade kogumise ja järgneva käitlemise meetod.

Katsetingimused:

- valgustusperiood(id);

- katseplaan (nt kambrite suurus, materjal ja veesisaldus, katsekambrite ja paralleelrühmade arv, vastkoorunud isendite arv paralleelnõu kohta);
- põhilahuste valmistamise meetod ja uuendamise sagedus (lahusti kasutamise korral tuleks esitada selle nimetus ja kontsentratsioon);
- uuritava kemikaali annustamismeetod (nt pump, lahjendussüsteem);
- meetodiga saavutatav tuvastamise tõhusus ja nominaalsed katsekontsentratsioonid, määramispiir, katsenõudes mõõdetud väärtuste keskmised ja standardhälbed ja nende arvutamise meetod ning tõendid selle kohta, et mõõtmistulemused kajastavad uuritava kemikaali sisaldust tõelises lahuses;
- lahjendusvee omadused: pH, karedus, temperatuur, lahustunud hapniku sisaldus, kloorijääkide sisaldus (kui on mõõdetud), orgaanilise süsiniku üldsisaldus (kui on mõõdetud), hõljuvaine sisaldus (kui on mõõdetud), katselahuse soolsus (kui on mõõdetud) ja kõik muud mõõdetud näitajad;
- nominaalsed katsekontsentratsioonid, mõõdetud väärtuste keskmised ja nende standardhälbed;
- vee kvaliteet katsenõudes: pH, temperatuur (iga päev) ja lahustunud hapniku sisaldus;
- üksikasjalik teave söötmise kohta (nt sööda liik, päritolu, lisatud kogus ja söötmissagedus).

Tulemused:

- tõendid selle kohta, üldised nõuetekohasuse kriteeriumid on kontrollrühmades täidetud;
- järgmised andmed kontrollrühma (ja selle kasutamise korral lahustiga kontrollrühma) ja kontsentratsioonirühmade kohta: koorumine (kooruvus ja koorumiseni kulunud aeg) põlvkondades F1 ja F2, koorumisjärgne ellujäämus põlvkonnas F1, kasv (pikkus ja kehamass) põlvkonnas F1, genotüübiline sugu ja sooline eristumine (nt pärakuuime papillaarjätmete ja sugunäärme histoloogia põhjal kindlaks tehtud teisesed sootunnused) põlvkonnas F1, fenotüübiline sugu põlvkonnas F1, teisesed sootunnused (pärakuuime papillaarjätmed) põlvkonnas F1, vtg mRNA (või VTG valk) põlvkonnas F1, põlvkonna F1 histopatoloogiline analüüs (sugunäärme, maks ja neerud) ning põlvkondade F0 ja F1 paljunemise näitajad (sigivus ja viljakus); (vt tabelid 1 ja 2);
- statistilise analüüsi puhul kasutatud meetod (regressioonianalüüs või dispersioonianalüüs) ja andmetöötlusviis (kasutatud statistilised testid ja mudelid);
- täheldatava toime puudumise kontsentratsioon (NOEC) iga hinnatud näitaja puhul;
- vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsioon (LOEC) iga hinnatud näitaja puhul (tasemel $p = 0,05$); vajaduse korral EC_x iga hinnatud näitaja puhul koos usaldusvahemikuga (nt usaldusnivoo 90 % või 95 %) ja graafik selle arvutamiseks kasutatud lähendatud kõveraga, kontsentratsioonist sõltuvuse kõvera tõus, regressioonimudeli võrrand ning mudeli hinnangulised parameetrid ja nende standardviga;

- kõik kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist ja nõuetekohasuse kriteeriumidest ning nende võimalik mõju katse tulemustele.

60. Lõppnäitajate mõõtmistulemuste puhul tuleb esitada keskvaärtused ja nende standardhälbed (võimaluse korral nii paralleelrühmade kui ka kontsentratsioonide lõikes).

KIRJANDUS

- (1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (2) Padilla, S., Cowden, J., Hinton, D.E., Yuen, B., Law, S., Kullman, S.W., Johnson, R., Hardman, R.C., Flynn, K. ja Au, D.W.T. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. *Current Protocols in Toxicology* 39: 1–36.
- (3) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (4) Benoit, D.A., Mattson, V.R. ja Olson, D.L. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. *Water Research* 16: 457–464.
- (5) Yokota, H., Tsuruda, Y., Maeda, M., Oshima, Y., Tadokoro, H., Nakazono, A., Honjo, T. ja Kobayashi, K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 1925–1930.
- (6) Yokota, H., Seki, M., Maeda, M., Oshima, Y., Tadokoro, H., Honjo, T. ja Kobayashi, K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2552–2560.
- (7) Kang, I.J., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Yamaguchi, T., Maeda, M., Imada, N., Tadokoro, H. ja Honjo, T. (2002). Effects of 17 β -Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Chemosphere* 47: 71–80.
- (8) Seki, M., Yokota, H., Matsubara, H., Tsuruda, Y., Maeda, M., Tadokoro, H. ja 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.
- (9) Seki, M., Yokota, H., Matsubara, H., Maeda, M., Tadokoro, H. ja 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.
- (10) Hirai, N., Nanba, A., Koshio, M., Kondo, T., Morita, M. ja 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.

- (11) Hirai, N., Nanba, A., Koshio, M., Kondo, T., Morita, M. ja 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.
- (12) Nakamura, A., Tamura, I., Takanobu, H., Yamamuro, M., Iguchi, T. ja 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.
- (13) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Kättesaadav aadressil <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html>.
- (14) Adolfsson-Erici, M., Åkerman, G., Jahnke, A., Mayer, P. ja 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.
- (15) 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.), Majanduskoostöö ja Arengu organisatsioon, Pariis.
- (16) Hutchinson, T.H., Shillabeer, N., Winter, M.J. ja Pickford, D.B. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. *Aquatic Toxicology* 76: 69–92.
- (17) Denny, J.S., Spehar, R.L., Mead, K.E. ja Yousuff, S.C. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.
- (18) Koger, C.S., Teh, S.J. ja Hinton, D.E. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Biology of Reproduction* 61: 1287–1293.
- (19) Kinoshita, M., Murata, K., Naruse, K. ja Tanaka, M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.
- (20) Gormley, K. ja 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.
- (21) Käesoleva lisa peatükk C.15 „Kala embrüo ja rebukotiga vastsetega tehtav lühiajaline toksilisuse katse“.

- (22) Käesoleva lisa peatükk C.37 „21-päevane katse kaladega: lühiajaline sõelkatse östrogeense ja androgeense toime ning aromataasi inhibeerimise kontrollimiseks“.
- (23) Käesoleva lisa peatükk C.41 „Kalade sugulise arengu katse“.
- (24) Käesoleva lisa peatükk C.48 „Lühiajaline kalade paljunemise katse“.
- (25) Käesoleva lisa peatükk C.47 „Varases arengujärgus kaladele avalduva mürgisuse katse“.
- (26) Käesoleva lisa peatükk C.49 „Ägeda mürgisuse katse kalaembrüotega“.
- (27) Wheeler, J.R., Panter, G.H., Weltje, L. ja Thorpe, K.L. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. *Chemosphere* 92: 1067–1076.
- (28) Tatarazako, N., Koshio, M., Hori, H., Morita, M. ja Iguchi, T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50: 301–308.
- (29) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (30) Nanda, I., Hornung, U., Kondo, M., Schmid, M. ja Scharf, M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. *Genetics* 163: 245–251.
- (31) Shinomiya, A., Otake, H., Togashi, K., Hamaguchi, S. ja Sakaizumi, M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations. *Zoological Science* 21: 613–619.
- (32) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (väljaande lisad on avaldatud eraldi dokumendina), OECD Publishing, Pariis.
- (33) Green, J.W., Springer, T.A., Saulnier, A.N. ja Swintek, J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1108–1116.

1. liide

MÕISTED

Asustustihedus – kalade arv vee ruumalaühiku kohta.

Biomassisisaldus – kalade märgmass vee ruumalaühiku kohta.

EC_x (kontsentratsioon, mille puhul mõju ulatus on x %) – kontsentratsioon, mille juures teatava kokkupuuteperioodi vältel katseorganismidele avalduva mõju ulatus on x % kontrollrühma asjaomase näitaja väärtusest. Näiteks EC₅₀ on kontsentratsioon, mille puhul kindlaksmääratud kokkupuuteperioodi vältel avaldub kemikaali mõju katses uuritavale näitajale 50 protsendil kemikaaliga kokku puutuvast populatsioonist.

ELISA – ensüümimmuunsorptsioonanalüüs.

HAS-telg – hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete telg.

IACUC – Institutional Animal Care and Use Committee (institutsionaalne loomade hooldamise ja kasutamise komitee).

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry (Rahvusvaheline Puhta Keemia ja Rakenduskeemia Liit).

Kemikaal – aine või segu.

Kooruvus – vastkoorunud isendite arv : inkubaatorisse pandud embrüote arv.

Letaalne mediaankontsentratsioon (LC₅₀) – uuritava kemikaali hinnanguline kontsentratsioon, mille juures kemikaal on katse vältel letaalne 50 %-le katseorganismidest.

Läbivoolukatse – katse, mille puhul katselahused voolavad kokkupuuteperioodi vältel pidevalt läbi katsesüsteemi.

Pikkus sabauime hargnemiskohani – kala pikkus ninamiku tipust kuni sabauime keskmiste kiirte otsani; kasutatakse kalade puhul, kelle selgroo lõppemiskohta on keeruline kindlaks teha (www.fishbase.org).

Sigivus – marjaterade arv.

SMILES – Simplified Molecular Input Line Entry Specification (lihtsustatud molekulaarse sisendrea sisestamissüsteem).

Standardpikkus – kala pikkus ninamiku tipust viimase selgroolüli tagaotsani või hüpuraalplaadi külje keskosa tagaotsani. Lihtsamalt öeldes ei hõlma see pikkus sabauime pikkust (www.fishbase.org).

Täheldatava toime puudumise kontsentratsioon (NOEC) – uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures ei täheldata kindlaksmääratud kokkupuuteperioodi jooksul

kontrolliga võrreldes statistiliselt olulist ($p < 0,05$) toimet ja mis on kasutatud kontsentratsioonide jadas vahetult allpool vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsiooni.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

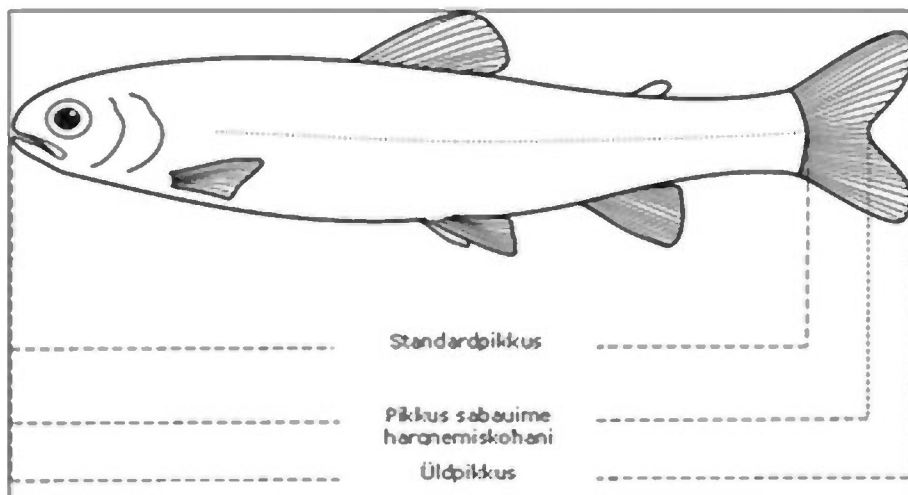
UVCB – tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

Viljakus – eluvõimeliste marjaterade arv : sigivus.

VTG – vitellogeniin on fosfolipoglükoproteiin, mis on munarebu valkude eelkäija ja mida tavaliselt leidub kõikide ovipaarsete liikide seksuaalselt aktiivsetes emasloomades.

Vähima täheldatud toime avaldumise kontsentratsioon (LOEC) – uuritava kemikaali väikseim kasutatud kontsentratsioon, mille puhul täheldatakse kemikaali statistiliselt olulist ($p < 0,05$) mõju võrdluses kontrolliga. Kemikaal peaks kõikidel kõnealusest kontsentratsioonist suurematel kontsentratsioonidel avaldama vähemalt sama tugevat kahjulikku mõju kui kõnealusel kontsentratsioonil. Kui nimetatud kahte tingimust ei ole võimalik täita, tuleks lisada ammendav selgitus, kuidas kõnealune kontsentratsioon (ja sellest lähtuvalt ka täheldatava toime puudumise kontsentratsioon) on valitud. Sellekohased juhised on esitatud 5. ja 6. liites.

Üldpikkus – kala pikkus ninamiku tipust sabauime pikema hõlma tipuni; tavaliselt surutakse hõlmad mõõtmiseks keskjooele kokku. Seda pikkust mõõdetakse piki sirgjoont, mitte mööda keha kumerust (www.fishbase.org).



Joonis 1. Kasutatavate eri pikkuste kirjeldus

2. liide

MÕNED NÕUETEKOHASE LAHJENDUSVEE KEEMILISED OMADUSED

Koostisosa	Piirsisaldus
Tahked osakesed	5 mg/l
Orgaanilise süsiniku üldsisaldus	2 mg/l
Ioniseerimata ammoniaak	1 µg/l
Kloorijäägid	10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus	50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide summaarne üldsisaldus	50 ng/l
Orgaanilistes ühendites sisalduva kloori üldsisaldus	25 ng/l
Alumiinium	1 µg/l
Arseen	1 µg/l
Kroom	1 µg/l
Koobalt	1 µg/l
Vask	1 µg/l
Raud	1 µg/l
Plii	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Tsink	1 µg/l
Kaadmium	100 ng/l
Elavhõbe	100 ng/l
Hõbe	100 ng/l

3. liide

MEOGRT PUHUL KASUTATAVAD KATSETINGIMUSED

- | | |
|---|--|
| 1. Soovitatav liik | Jaapani riisikala (<i>Oryzias latipes</i>) |
| 2. Katse tüüp | Pideva läbivooluga katse |
| 3. Vee temperatuur | Nominaalne katsetemperatuur on 25 °C. Kogu katseperioodi keskmine temperatuur igas nõus on 24–26 °C. |
| 4. Valgustuse kvaliteet | Luminofoorlambid (laia spektriga ja valgusvooga ~150 lm/m ²) (valgustihedusega ~150 lx).

16 tundi valgust, 8 tundi pimedust |
| 6. Biomassisisaldus | F0: 2 täiskasvanut paralleelnõu kohta; F1: alguses kuni 20 marjatera (embrüot) paralleelnõu kohta, pärast koorumist 12 embrüot paralleelnõu kohta, seejärel sigimisetapis 9.–10. viljastamisjärgsel nädalal 2 täiskasvanut (XX-XY sigimispaar) |
| 7. Katsekambri minimaalne kasutatav ruumala | 1,8 l (nt katsekamber suurusega 18 x 9 x 15 cm) |
| 8. Katselahuse uuendamine kogu ruumala ulatuses | Vähemalt 5 ja kuni 16 lahuse uuendamist päevas (või vooluhulk 20 ml/min) |
| 9. Katseorganismide vanus katse alguses | F0: > 12. viljastamisjärgne nädal, aga soovitatavalt mitte rohkem kui 16. viljastamisjärgne nädal |
| 10. Organismide arv paralleelnõu kohta | F0: 2 kala (isase ja emase paar); F1: kuni 20 kala (marjatera) paralleelnõu kohta (saadud põlvkonna F0 või F1 sigimispaaridelt) |
| 11. Kontsentratsioonirühmade arv | 5 uuritava kemikaaliga töödeldavat kontsentratsioonirühma ja vajalikud kontrollrühmad |
| 12. Paralleelnõude arv kontsentratsioonirühma kohta | Vähemalt 6 paralleelnõud uuritava kemikaali kontsentratsioonirühma kohta ja vähemalt 12 paralleelnõud kontrollrühma ja lahustiga kontrollrühma (kui kasutatakse) kohta (põlvkonna F1 sigimisetapil paralleelnõude arv kahekordistatakse) |
| 13. Organismide arv katses | Vähemalt 84 kala põlvkonnas F0 ja 504 kala põlvkonnas F1. (Lahustiga kontrolli kasutamise korral 108 kala põlvkonnas F0 ja 648 kala põlvkonnas F1.) Loendatav üksus on eelvastsejärgule järgnevas arengujärgus olev vastne. |
| 14. Söötmisrežiim | Kaladele söödetakse piiramatus koguses soolase vee krevettide (<i>Artemia</i> spp.) 24 tunni vanuseid noorjargus isendeid, millele vajadusel lisatakse kaubanduslikult müüdavat helvessööta (tõhusat paljunemist toetava kasvu ja arengu tagamiseks sobiva söötmisgraafiku näide on esitatud 6. |

	liites).
15. Aereerimine	Üksnes siis, kui lahustunud hapniku sisaldus hakkab langema alla 60 % küllastuskontsentratsioonist
16. Lahjendusvesi	Puhas pinnavesi, kaevuvesi, taastatud vesi või dekllooritud kraanivesi
17. Kokkupuuteaeg	Esmaselt 19 nädalat (põlvkonnast F0 kuni põlvkonna F2 koorumiseni)
18. Bioloogilised lõppnäitajad (esmased)	Kooruvus (F1 ja F2); ellujäämus (F1, koorumisest kuni 4. viljastamisjärgse nädalani (vastsejärgu lõpp / maimujärgu algus), 4. kuni 9. (või 10.) viljastamisjärgse nädalani (maimust noorkalaks) ja 9. kuni 15. viljastamisjärgse nädalani (noorkalast kuni täiskasvanud kalade surmamiseni)); kas (F1, pikkus ja mass 9. ja 15. viljastamisjärgsel nädalal); teised sootunnused (F1, pärakuuime papillaarjätked 9. ja 15. viljastamisjärgsel nädalal); vitellogeniin (F1, <i>vgt</i> mRNA või VTG valk 15. viljastamisjärgsel nädalal); fenotüübiline sugu (F1, sugunäärme histoloogia põhjal 15. viljastamisjärgsel nädalal); paljunemine (F0 ja F1, sigivus ja viljakus 21 päeva vältel); aeg kudumiseni (F1); histopatoloogia (F1, sugunääre, maks ja neerud 15. viljastamisjärgsel nädalal)
19. Katse nõuetekohasuse kriteeriumid	Lahustunud hapniku sisaldus ≥ 60 % õhu küllastuskontsentratsioonist; vee keskmine temperatuur kogu katse vältel 24–26°C; sigimise õnnestumine ≥ 65 % kontrollrühma(de) emaste puhul; keskmine päevane sigivus kontrollrühma(de)s ≥ 20 marjatera; keskmine kooruvus kontrollrühmades ≥ 80 % (nii põlvkonnas F1 kui ka põlvkonnas F2); kontrollrühmades keskmine koorumisjärgne ellujäämus 3. viljastamisjärgse nädalani ≥ 80 % ja 3. viljastamisjärgsest nädalast kuni surmamiseni ≥ 90 % (F1); uuritava kemikaali kontsentratsioon lahuses peab olema püsivalt vahemikus ± 20 % keskmisest mõõdetud väärtusest.

4. liide

TÜÜPILISTE KONTROLLVÄÄRTUSTEGA SEOTUD JUHISED

Tuleb arvestada, et nimetatud kontrollväärtused põhinevad vähesel arvul valideerimisuuringutel ja neid võidakse täiendavate kogemuste valguses muuta.

Kasv

Kõigi proovis sisalduvate kalade massi ja pikkust mõõdetakse 9. (või 10.) ja 15. viljastamisjärgsel nädala. Kirjeldatud katse-eeskirjast lähtuvalt peaks kalade eeldatav märgmass 9. viljastamisjärgsel nädala olema isaste puhul 85–145 mg ja emaste puhul 95–150 mg. Eeldatav mass 15. viljastamisjärgsel nädalal peaks olema isaste puhul 250–330 mg ja emaste puhul 280–350 mg. Üksikisendite puhul võib küll esineda märkimisväärseid kõrvalekaldeid esitatud vahemikest, aga kui mõne kontrollrühma kaalutud keskmine näitaja peaks jääma nendest vahemikest oluliselt väljapoole, siis võib see osutada probleemidele, mis on tingitud söötmisest, temperatuuri reguleerimisest, vee kvaliteedist, haigustest või nende tegurite mis tahes kombinatsioonist.

Koorumine

Koorumise edukuse määr kontrollrühmades on üldjuhul 90 % kandis, kuid ka 80 % tase ei ole ebatavaline. Kui koorumise edukus jääb alla 75 %, võib see osutada arenevate marjaterade puudulikule loksutamisele või marjaterade hooletule käitlemisele (nt surnud marjaterade õigel ajal eemaldamata jätmine, mis põhjustab seentega saastumist).

Ellujäämus

Ellujäämus koorumisest kuni 3. viljastamisjärgse nädalani ja sealt edasi on kontrollrühmades tavaliselt vähemalt 90 %, kuid ka 80 % ellujäämus kontrollrühma kalade varastes elujärgudes ei ole veel probleem. Muret tuleks tunda juhul, kui kontrollrühmades jääb ellujäämus alla 80 %, sest see võib osutada akvaariumide puudulikule puhastamisele, mis põhjustab kalavastsete surma haiguste või vähese lahustunud hapniku sisaldusest tingitud lämbumise tõttu. Suremust võivad põhjustada ka katsenõu puhastamise käigus tekitatud vigastused ja kalavastsete sattumine nõu äravoolusüsteemi.

Vitellogeniini geen

Kui *vitellogeniini* (*vtg*) geeni absoluuttasemed, mida väljendatakse koopiate arvuna ühe nanogrammi mRNA üldkoguse kohta, võivad erinevate kasutatavate menetluste või seadmete tõttu laborite vahel suuresti erineda, siis suhtarvuna peaks kontrollrühmades emaste kalade *vtg* tase olema ligi 200 korda kõrgem kui isastel. Vahel võivad emaste ja isaste näitajad erineda lausa 1 000–2 000 korda, aga alla 200 jääv suhtarv võib osutada probleemidele proovi saastumisega või kasutatud menetluse ja/või reaktiividega.

Teised sootunnused

Isaste kalade puhul on teiseste sootunnuste (papillaarjätketega lülide arv pärakuuime kiirtel)

normaalvahemik 9.–10. viljastamisjärgsel nädalal 40–80 papilaarjätketega lüli. 15. viljastamisjärgseks nädalaks peaks see näitaja kontrollrühma isastel olema vahemikus 80–120 ja emastel 0. Teadmata põhjustel võivad mõnel üksikul isasel papilaarjätked puududa 9. viljastamisjärgsel nädalal, aga kuna kõigil kontrollrühma isastel kujunevad need välja 15. viljastamisjärgseks nädalaks, siis on see kõige tõenäolisemalt tingitud hilisest arengust. Kui papilaarjätkeid leitakse ka kontrollrühma emastelt, siis osutab see XX-isaste esinemisele populatsioonis.

XX-isased

XX-isaste tavapärane esinemissagedus temperatuuril 25 °C kasvatatud kalade seas näib olevat kuni 4 % ning kõrgematel temperatuuridel see suureneb. Tuleks rakendada sobivaid meetmeid, et XX-isaste osakaalu populatsioonis vähendada. Kuna XX-isaste esinemine on arvatavasti seotud geneetiliste ja pärilike põhjustega, saab nende esinemist populatsioonis tõhusalt vähendada kasvatatava kalavaru jälgimisega ja XX-isaste väljapraakimisega kalade paljundamisel.

Kudemisaktiivsus

Enne sigivuse hindamist tuleks kudemisaktiivsust kontrollrühma paralleelnõudes iga päev jälgida. Kudemisaktiivsuse tundemärkide esinemist saab kontrollrühma paaridel vaatluse teel kvalitatiivselt hinnata. Enamik kontrollrühma paare peaks olema alustanud kudemist 12.–14. viljastamisjärgseks nädalaks. Kui selleks ajaks tekkinud kudevate paaride arv on väike, osutab see probleemidele kalade tervise, suguküpsuse või heaoluga.

Sigivus

Terved ja hästi söödetud riisikalad koevad 12.–14. viljastamisjärgsel nädalal üldjuhul iga päev, andes päevas 15–50 marjatera. Kontrollrühma soovituslikust 24 sigimispaarist 16 (> 65 %) peaks väljutama päevas rohkem kui 20 marjatera paari kohta ning see näitaja võib tõusta ka ligi 40 marjaterani päevas. Osutatud tasemest väiksem sigivus võib osutada sigimispaaride ebaküpsusele, alatoitumisele või haigustele.

Viljakus

Kontrollrühmas on viljastatud marjaterade osakaal tavaliselt 90 % kandis, aga haruldane ei ole ka 95 % või sellest kõrgem määr. Kui kontrollrühma marjaterade viljakus jääb alla 80 %, võib see osutada isendite haigustele või ebasoodsatele kasvatustingimustele.

5. liide

SÖÖTMISGRAAFIKU NÄIDE

Tabelis 1 on esitatud kalade tõhusat paljunemist toetava kasvu ja arengu tagamiseks sobiva söötmisgraafiku näide. Kõrvalekalded esitatud söötmisgraafikust võivad olla lubatud, aga soovitatavalt tuleks sel juhul katseliselt kontrollida, kas kasvu ja paljunemise näitajad jäävad nõutud tasemele. Soovitatud söötmisgraafiku järgimiseks tuleb enne katse algust kindlaks teha soolase vee krevettide kuivmass seda sisaldava vedelsööda mahuühiku kohta. Selleks võib kaaluda kindlaksmääratud koguse soolase vee krevette sisaldavat vedelsööta, mida on teadaoleva kaaluga alustel 60 °C juures 24 tundi kuivatatud. Vedelsöödas sisalduvate soolade massi arvessevõtmiseks kuivatatakse ka sama kogus vedelsööda valmistamiseks kasutatud soolalahust, mille kuivatamisjärgne mass lahutatakse soolase vee krevette sisaldava vedelsööda kuivatamisjärgsest massist. Teise variandina võib soolase vee krevette enne kuivatamist filtreerida ja destilleeritud veega loputada, et poleks vaja mõõta puhta soolalahuse massi. Saadud andmete põhjal teisendatakse soolase vee krevettide kuivmass tabeli järgi iga kala kohta arvestatud, soolase vee krevette sisaldava vedelsööda koguseks. Lisaks soovitatakse soolase vee krevette sisaldava vedelsööda alikvoote igal nädalal uuesti kaaluda, et kontrollida söödetava krevetikoguse kuivmassi õigsust.

Tabel 1. Söötmisgraafiku näide

Aeg (pärast koorumist)	Soolase vee krevettide kogus (kuivmassi mg kala kohta päevas)
1. päev	0,5
2. päev	0,5
3. päev	0,6
4. päev	0,7
5. päev	0,8
6. päev	1,0
7. päev	1,3
8. päev	1,7
9. päev	2,2
10. päev	2,8
11. päev	3,5
12. päev	4,2
13. päev	4,5
14. päev	4,8
15. päev	5,2
16.–21. päev	5,6
4. nädal	7,7
5. nädal	9,0
6. nädal	11,0
7. nädal	13,5
8. nädal – surmamine	22,5

6. liide

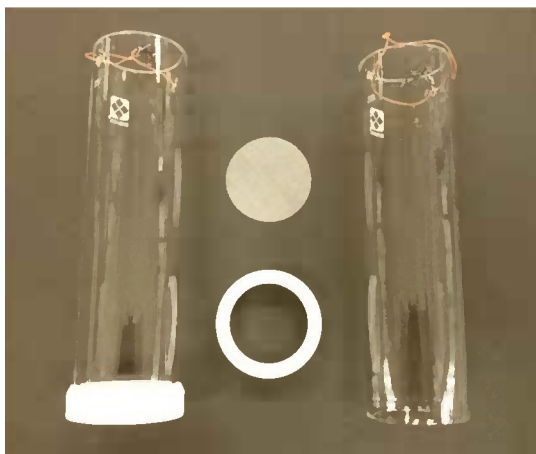
MARJATERADE INKUBATSIOONIKAMBRI NÄIDISED

Näidis A



See inkubaator koosneb ristuva kinnitusega tsentrifuugiklaasist, mida ühendab roostevabast terasest hülss ja hoiab paigal keeratav tsentrifuugikork. Korki läbib väike klaasist või roostevabast terasest toru, mis ulatub peaaegu tsentrifuugiklaasi ümara põhjani ning mille kaudu puhutakse õhumulle marjaterade suspendeerimiseks, saprofüütiliste seennakkuste leviku tõkestamiseks ning ka kemikaalide vahetamiseks inkubaatori ja seda sisaldava nõu vahel.

Näidis B



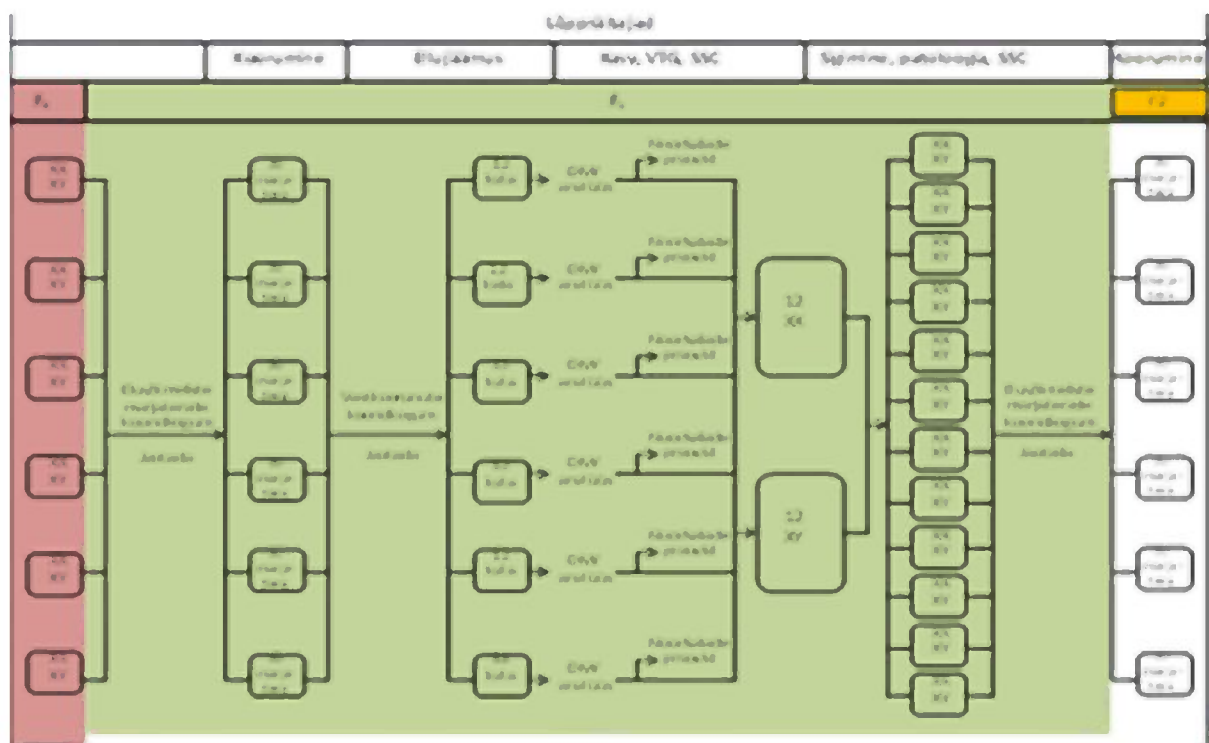


See inkubaator koosneb klaassilindrist (läbimõõt 5 cm ja pikkus 10 cm) ja roostevabast sõelast (sõelumiskoeffitsient 0,25 ϕ ja tihedus 32), mis kinnitatakse silindri põhja külge PTFE-võru abil. Tõstelati külge kinnitatud inkubaatorid langetatakse katsenõudesse ja neid loksutatakse vertikaalselt (u 5 cm amplituudiga) riisikala marjaterade jaoks sobiva sagedusega (u üks kord 4 s jooksul).

7. liide

MEOGRT PUHUL KASUTATAV PARALLEELPROOVIDE KOONDAMISE JA MOODUSTAMISE SKEEM

Joonis 1. Paralleelproovide koondamine ja moodustamine MEOGRT puhul. Joonisel kujutatud vastab ühele kontsentratsioonirühmale või poolele kontrollrühmast. Koondamise tõttu ei ole paralleelproovid kogu katse vältel pidevalt eraldi jälgitavad. Mõistet „marjatera“ kasutatakse eluvõimelise viljastatud marjatera tähenduses (samaväärne embrüoga)



Kontsentratsioonirühmad ja paralleelproovid

Katsemeetodis soovitatakse kasutada tehniliselt puhaste materjalidega viit uuritava kemikaali kontsentratsioonirühma ja negatiivset kontrolli. Paralleelproovide arv kontsentratsioonirühma kohta ei ole MEOGRTs alati ühetaoline ja kontrollrühma paralleelproovide arv peaks olema kaks korda suurem kui uuritava kemikaali ühes kontsentratsioonirühmas. Põlvkonnas F₀ on uuritava kemikaali igas kontsentratsioonirühmas kuus paralleelproovi ja negatiivse kontrolli rühmas 12 paralleelproovi. Lahustite kasutamist soovitatakse võimalusel alati vältida, aga nende kasutamise korral tuleb MEOGRT protokollis esitada nii lahusti kasutamise kui ka kasutatud lahusti valiku põhjendus. Lisaks on lahusti kasutamise korral vaja kahte liiki kontrollrühmasid: a) lahustiga kontroll ja b) negatiivne kontroll. Mõlemas kontrollrühmas peaks olema MEOGRT kõigis etappides täiskomplekt paralleelproove. Kirjeldatud paralleelproovide struktuur jääb samaks põlvkonna F₁ katseorganismi kogu kasvuperioodi vältel (ja põlvkonnas F₂ kuni selle kooremiseni). Ent täiskasvanud põlvkonna F₁ sigimispaaride moodustumise ajal tuleks paralleelsete sigimispaaride arv igas

kontsentratsioonirühmas võimaluse korral kahekordistada. See tähendab, et igas uuritava kemikaali kontsentratsioonirühmas oleks 12 paralleelset paari ja kontrollrühmas oleks 24 paralleelset paari (lisaks vajaduse korral 24 paralleelset paari lahusti kontrollrühmas). Generatsiooni F1 paaride koetud embrüote koorumine tehakse kindlaks sama paralleelproovide struktuuri alusel nagu põlvkonna F0 koetud embrüote koorumisel, s.t algselt kuus paralleelproovi uuritava kemikaali iga kontsentratsioonirühma kohta ja 12 paralleelproovi kontrollrühma(de)s.

8. liide

PÄRAKUUIME PAPILLAARJÄTKETE LOENDAMINE

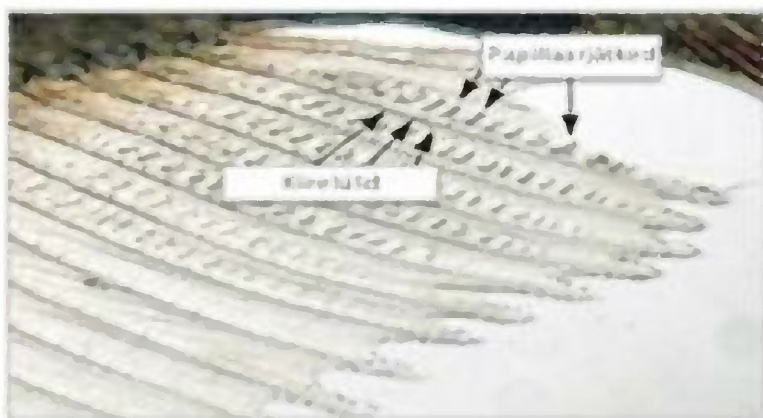
Peamised materjalid ja reaktiivid

- Stereomikroskoop (soovi korral koos kaamera)
- Fiksaator (soovitavalt Davidsoni fiksaator, Bouini fiksaatori kasutamine pole soovitatav) juhul, kui jätkeid ei loendata pildilt

Loendamise kord

Pärast lahangut tuleks pärakuuime pildistada, et pärakuuime papillaarjätkeid oleks lihtsam loendada. Kuigi pildistamine on soovitatav meetod, võib teise variandina pärakuuime Davidsoni või muus sobivas fiksaatoris ligikaudu ühe minuti jooksul fikseerida. Papillaarjätke loendamise lihtsustamiseks tuleb hoida pärakuuime fikseerimise ajal tasapinnalisena. Pärakuuimega rümpa võib säilitada Davidsoni või muus sobivas fiksaatoris kuni analüüsimiseni. Loendada tuleb uime kiirelülil tagumiselt servalt välja ulatuvate papillaarjätketega kiirelülide arv (vt **joonis 1**).

Joonis 1. Pärakuuime papillaarjätkeid



9. liide

MEOGRT ÜSIKASJALIK AJAKAVA

1.–3. katsenädal (põlvkond F0)

Valikukriteeriumidele vastavad (vt punktid 16–20) põlvkonna F0 kudevad kalad kaasatakse katsesse kolmeks nädalaks, et arenevad sugurakud ja sugunäärmekeod saaksid uuritava kemikaaliga kokku puutuda. Igas paralleelnõus on üks sigiv kalapaar (XX-emase ja XY-isase sigimispaar). Paari koetud marjaterasid kogutakse, loendatakse ja nende viljakust hinnatakse 21 järjestikusel päeval alates 1. katsepäevast.

4. katsenädal (põlvkonnad F0 ja F1)

Eelistatavalt tuleks katse järgmisel etapil kasutada viljastatud ja eluvõimelised marjaterad (embrüod) koguda ühel päeval, kuid embrüote ebapiisava arvu korral võib neid siiski koguda ka kahe päeva vältel. Kahel päeval kogumise korral pannakse kõik esimesel päeval kogutud embrüod kontsentratsioonirühmade lõikes kokku teisel päeval kogutud embrüotega. Kõik kontsentratsioonirühma jaoks moodustatud koondkogumis olevad embrüod jaotatakse juhuslikult selle rühma paralleelsete inkubaatorite vahel nii, et igas inkubaatoris on 20 embrüot. Viljastatud marjaterade (embrüote) suremust kontrollitakse ja registreeritakse iga päev. Surnud marjaterad eemaldatakse inkubaatoritest (viljastatud marjaterade surma näitab eelkõige varastes etappides märkimisväärne läbipaistvuse kadu ja värvuse muutus, mis on põhjustatud valkude koaguleerumisest ja/või sadenemisest ja mille tulemusena marjaterad muutuvad valgeks ja läbipaistmatuks; OECD 2010).

Märkus. Kui marjaterasid on vaja koguda kahel päeval ainult ühe kontsentratsioonirühma puhul, tuleb seda kogumismenetlust kasutada kõikide kontsentratsioonirühmade (ja kontrollrühmade) puhul. Kui ka pärast teist kogumispäeva ei ole mõnes kontsentratsioonirühmas piisavalt embrüoid, et panna igasse inkubaatorisse 20 embrüot, siis tuleb selles konkreetses kontsentratsioonirühmas vaadeldavate embrüote arvu vähendada 15 embrüoni inkubaatori kohta. Kui embrüoid ei jätku ka juhul, kui igas inkubaatoris oleks 15 embrüot, tuleb vähendada paralleelsete inkubaatorite arvu nii, et igasse inkubaatorisse saaks panna 15 embrüot. Lisaks võib põlvkonnas F0 kasutada iga kontsentratsiooni- ja kontrollrühma kohta rohkem sigimispaare, et suurendada saadavate marjaterade arvu ja saavutada soovitatav tase 20 marjatera paralleelnõu kohta.

Põlvkonna F0 sigimispaarid surmatakse 24. katsepäeval humaanselt ning nende kehamass ja pikkus registreeritakse. Vajaduse korral võib põlvkonna F0 sigimispaare veel 1–2 päeva elus hoida, et põlvkonna F1 sigitamist korrata.

5.–6. katsenädal (põlvkond F1)

Üks kuni kaks päeva enne eeldatavat koorumise algust peatatakse inkubeeritavate marjaterade loksutamine või vähendatakse seda, et koorumist kiirendada. Igal päeval embrüost koorunud vastsed kogutakse kontsentratsioonirühmade lõikes koondkogumitesse ning jaotatakse süstemaatiliselt vastava kontsentratsioonirühma paralleelsete vastsenõude

vahel nii, et ühes nõus on kuni 12 vastkoorunud isendit. Selleks valitakse vastkoorunud isendeid juhuslikkuse põhimõttel ning lisatakse need üksteise järel vastava kontsentratsioonirühma juhuslikult valitud paralleelnõudesse, kuni igas paralleelnõus on 12 vastkoorunud isendit. Kui vastkoorunud isenditest ei jätku kõikide paralleelnõude täitmiseks, tuleb tagada, et etapi F1 alguses oleks võimalikult paljudes paralleelnõudes 12 vastkoorunud isendit.

Marjaterad, mis ei ole koorunud kontrollrühma koorumispäeva mediaaniga võrreldes kaks korda pikema aja jooksul, tunnistatakse eluvõimeetuks ja jäetakse kõrvale. Vastkoorunud isendite arv registreeritakse ja iga paralleelnõu kohta arvutatakse koorumise edukuse määr (kooruvus).

7.–11. katsenädal (põlvkond F1)

Kalavastsete ellujäämist kontrollitakse ja registreeritakse iga päev kõikide paralleelnõude puhul. 43. katsepäeval registreeritakse igas paralleelnõus ellu jäänud kalade arv ja algselt paralleelnõusse asetatud vastkoorunud isendite arv (soovitavalt 12). Selle põhjal saab arvutada protsentuaalse ellujäämise koorumisest kuni noorkala arengujärguni.

12. katsenädal (põlvkond F1)

Katsepäevadel 78–85 võetakse iga kala sabauimest väike koeproov (uimetükk), mille põhjal tehakse kindlaks kõikide isendite genotüübiline sugu. Selle teabe põhjal moodustatakse sigimispaarid.

Kolme päeva jooksul pärast iga kala genotüübilise soo kindlakstegemist moodustatakse juhuslikkuse põhimõttel 12 sigimispaari iga kontsentratsioonirühma ja 24 sigimispaari kontrollrühma kohta. Igast paralleelnõust valitakse juhuslikult kaks XX- ja XY-kala, need rühmitatakse soo järgi koondkogumiteks ja sigimispaarid (XX-XY paarid) moodustatakse kummaski koondkogumist juhuslikult valitud kaladest. Moodustatakse 12 paralleelset paari kemikaali iga kontsentratsioonirühma ja 24 paralleelset paari kontrollrühma kohta ning igasse paralleelnõusse pannakse üks sigimispaar. Kui mõni paralleelnõu ei sisalda koondkogumisse lisamiseks kahte XX- või XY-kala, tuleb sobiva soolise genotüübiga kalad võtta sama kontsentratsioonirühma teistest paralleelnõudest.

Ülejäänud kalad (kuni kaheksa kala paralleelnõu kohta) surmatakse humaanselt ja neil mõõdetakse noorkala arengujärgu lõppnäitajad. Kõikide noorkalaproovide *dmy* andmed (XX või XY) säilitatakse, et tagada võimalus seostada kõiki lõppnäitajate andmeid iga isendi geneetilise sooga.

13.–14. katsenädal (põlvkond F1)

Kokkupuude kemikaaliga jätkub kogu selle aja vältel, mil sigimispaarid arenevad noorkalast täiskasvanuks. 98. katsepäeval (st üks päev enne marjaterade kogumise algust) eemaldatakse akvaariumidest ja emaste kalade küljest kõik seal olevad marjaterad.

15.–17. katsenädal (põlvkond F1)

Koetud marjaterasid kogutakse igast paralleelnõust 21 järjestikuse päeva jooksul ning hinnatakse nende sigivust ja viljakust.

18. katsenädal (4. nädala tegevuste kordus) (põlvkonnad F1 ja F2)

120. katsepäeva hommikul kogutakse igast paralleelnõust marjaterad. Kogutud marjaterasid hinnatakse, viljastatud marjaterad rühmitatakse (pärast kuduniitide eemaldamist) kontsentratsioonirühmade lõikes koondkogumiteks ning jaotatakse sealt süstemaatiliselt inkubatsioonikambritesse nii, et igas inkubaatoris on 20 viljastatud marjatera. Inkubaatorid võib asetada iga kontsentratsioonirühma jaoks ette valmistatud eraldi inkubatsiooninõudesse või paralleelnõudesse, kuhu hiljem jäävad ka koorunud vastsed. Eelistatavalt tuleks embrüod koguda ühel päeval, aga kui nende arv ei ole piisav, võib embrüoid koguda ka kahe päeva vältel. Kahel päeval kogumise korral pannakse kõik esimesel päeval kogutud embrüod kontsentratsioonirühmade lõikes kokku teisel päeval kogutud embrüotega. Kõik kontsentratsioonirühma jaoks moodustatud koondkogumis olevad embrüod jaotatakse juhuslikult selle rühma paralleelsete inkubaatorite vahel nii, et igas inkubaatoris on 20 embrüot. Märkus. Kui marjaterasid on vaja koguda kahel päeval ainult ühe kontsentratsioonirühma puhul, tuleb seda kogumismenetlust kasutada kõikide kontsentratsioonirühmade (ja kontrollrühmade) puhul. Kui ka pärast teist kogumispäeva ei ole mõnes kontsentratsioonirühmas piisavalt embrüoid, et panna igasse inkubaatorisse 20 embrüot, siis tuleb selles konkreetses kontsentratsioonirühmas vaadeldavate embrüote arvu vähendada 15 embrüoni inkubaatori kohta. Kui embrüoid ei jätku ka juhul, kui igas inkubaatoris oleks 15 embrüot, tuleb vähendada paralleelsete inkubaatorite arvu nii, et igasse inkubaatorisse saaks panna 15 embrüot.

121. katsepäeval (või 122. katsepäeval, kui on vaja veenduda, et põlvkonna F2 sigitamine õnnestus) surmatakse põlvkonna F1 sigimispaarid humaanselt ja neil mõõdetakse täiskasvanud kalade arengujärgu lõppnäitajad. Vajaduse korral võib põlvkonna F1 sigimispaaire veel 1–2 päeva elus hoida, et põlvkonna F2 sigitamist korrata.

19.–20. katsenädal (põlvkond F2)

Üks kuni kaks päeva enne eeldatavat koorumise algust peatatakse inkubeeritavate marjaterade loksutamine või vähendatakse seda, et koorumist kiirendada. Kui katse lõpeb põlvkonna F2 koorumisega, siis iga päev koorunud vastsed loendatakse ja seejärel kõrvaldatakse. (Embrüod, mis ei ole ka pikendatud inkubatsiooni aja – st kontrollrühma koorumispäeva mediaaniga võrreldes kaks korda pikema aja – järel koorunud, tunnistatakse eluvõimetuks.)

10. liide

STATISTILINE ANALÜÜS

MEOGRTga kogutavad bioloogiliste andmete kategooriad ei ole sellele katsele eriomased ja, kui patoloogiate andmed välja arvata, siis on sarnaste andmete nõuetekohaseks analüüsimiseks välja töötatud palju sobivaid statistilisi meetodeid, mille valik sõltub andmete omadustest: normaaljaotus, dispersiooni homogeensus, uuringuplaani sobivus hüpoteesi kontrollimiseks või regressioonanalüüsiks, parameetrilisteks või mitteparameetrilisteks testideks jne. Üldpõhimõttena on soovitatavad statistilised analüüsimeetodid valitud lähtuvalt ökotoksilisuse andmeid käsitlevast OECD juhendist (OECD 2006) ning joonisel 2 on esitatud MEOGRT andmete jaoks analüüsimeetodi valimise vooskeem.

Võib eeldada, et kõige sagedamini esinevad andmestikes monotoonsed sõltuvused. Lisaks tuleks kaaluda, kas kasutada ühepoolset või kahepoolset statistilist testi. Üldiselt soovitatakse kasutada ühepoolseid teste, välja arvatud juhul, kui need on mingil bioloogilisel põhjusel sobimatud. Käesolevas jaotises soovitatakse küll teatavaid statistilisi teste, aga kui konkreetset MEOGRTga kogutavate andmete jaoks töötatakse välja sobivamad ja/või võimsamad statistilised meetodid, tuleks nendest saadavate eeliste tõttu kasutada vastavaid uusi statistilisi teste.

MEOGRTga kogutavaid andmeid tuleks analüüsida iga genotüübilise soo lõikes eraldi. Pööratud sooga kalade (XX-isaste või XY-emaste) kohta kogutud andmete analüüsimiseks on kaks võimalikku strateegiat. 1) Jätta pööratud sooga kalade andmed (välja arvatud pööratud sooga kalade osakaal igas paralleelproovis) kogu katse ulatuses analüüsist välja. 2) Jätta kõikide pööratud sooga kalade kohta kogutud andmed andmestikku sisse ja teha analüüs genotüübi põhjal.

Histopatoloogilised andmed

Histopatoloogilised andmed esitatakse raskusastme kujul, mida analüüsitakse hiljuti välja töötatud uue statistilise meetodiga: Rao-Scotti kohandusega Cochran'e-i-Armitage lõiktest (RSCABS) (Green *et al.*, 2014). Rao-Scotti kohandus säilitab teabe katseparalleelide kohta; lõiktesti menetlusega on arvesse võetud bioloogilist eeldust, et kemikaali kontsentratsioonide suurenedes kasvab ka raskusaste. RSCABSi tulemused näitavad iga diagnoosi puhul, millises kontsentratsioonirühmas on patoloogiate osakaal suurem kui kontrollrühmas ja milline on nende raskusaste.

Sigivuse andmed

Andmete monotoonse kontsentratsioonist sõltuvuse korral kasutatakse sigivuse analüüsides sammuviisilise elimineerimisega Jonckheere'i-Terpstra või Williamsi testi. Sammuviisilise elimineerimise testis tehakse kõik võrdlused olulisuse nivool 0,05 ja puuduvad võrdluste arvust sõltuvad kohandused. Eeldatakse, et andmete puhul esineb monotoonne kontsentratsioonist sõltuvus, aga seda saab ka kontrollida andmete visuaalse vaatlusega või pärast andmete järkudeks teisendamist kontsentratsioonirühmade keskväärtuste lineaar- ja

ruutkontrastide konstrueerimise teel. Kui ei esine olukorda, kus ruutkontrast on oluline ja lineaarkontrast ei ole oluline, siis kasutatakse trenditesti. Muul juhul kasutatakse kemikaali toime kindlakstegemiseks Dunnetti testi – tingimusel, et andmed on normaaljaotuse ja homogeense dispersiooniga. Kui nimetatud tingimused ei ole täidetud, kasutatakse Dunni testi koos Bonferroni-Holmi kohandusega. Kõik osutatud testid tehakse F-testist või Kruskali-Wallis testist sõltumatult. Täpsemad üksikasjad on esitatud dokumendis OECD 2006.

Piisava statistilise põhjendatuse korral võib kasutada ka muid meetodeid, näiteks marjaterade arvu puhul üldistatud lineaarset mudelit koos vigade Poissoni jaotusega (Cameron ja Trividi, 2013). Muu meetodi kasutamise korral on soovitatav nõu pidada statistikutega.

Igapäevane marjaterade loendus ühes põlvkonnas

Kasutatakse dispersioonanalüüsi (ANOVA) mudelit, kus tunnus $Y = Aeg * Aeg + Kõnsentratsioon + *Kõnsentratsioon + Aeg * Kõnsentratsioon + *Aeg * Kõnsentratsioon$ ja juhuslik mõju avaldub tegurites Paralleelproov($Põlvkond * Kõnsentratsioon$) ning $Aeg * Paralleelproov(Kõnsentratsioon)$, mis võimaldab põlvkondades mõlemat liiki ebavõrdseid dispersioonikomponente. Tegur Aeg osutab siin marjaterade loendamise sagedusele (nt iga päev või kord nädalas). See on kordusmõõtmiste analüüs, mille puhul sama paralleelproovi kohta tehtud tähelepanekute korrelatsioonid on seotud andmete kordusmõõtmistega.

Kõnsentratsiooni peamist mõju kontrollitakse Dunnetti (või Dunnetti-Hsu) testiga, mis on kohandatav vastavalt võrdluste arvule. Lisaks on vaja kohandusi põlvkonna ja aja mõju arvessevõtmiseks, sest nende kahe teguri puhul puudub kontrolltase ning iga tasemete paar võib osutada huvi pakkuvaks võrdluseks. Kui olulisusnivooga 0,05 F-test näitab nimetatud kahe mõjuteguri puhul olulist peamist mõju, siis saab vastava teguri paare tasemete kaupa võrrelda olulisusnivooga 0,05 ilma täiendavaid kohandusi tegemata.

Mudel hõlmab kahe ja kolme teguriga vastasmõjusid, mistõttu näiteks aja peamine mõju ei pruugi olla statistiliselt oluline, kuigi aeg avaldab olulist mõju tulemustele. Seega kui mõni kahe või kolme teguriga (millest üks on aeg) vastasmõju on nivool 0,05 oluline, siis võib aja tasemete võrdlused olulisusnivool 0,05 sobivaks tunnistada ilma täiendavate kohandusteta.

Järgmiseks uuritakse F-testidega kõnsentratsiooni olulisust ajas; need esitatakse dispersioonanalüüsi tabelis nn lõikudena. Kui näiteks põlvkonnas F1 aja 12 jooksul kasutatud kõnsentratsiooni lõik on nivool 0,05 oluline, siis võib selle kõnsentratsioonirühma võrdlused põlvkonnas F1 ajaga 12 olulisusnivool 0,05 sobivaks tunnistada ilma täiendavate kohandusteta. Sama kehtib nende testide puhul, millega uuritakse aja olulisust põlvkonnas F1 ja kõnsentratsioonis ning põlvkonna olulisust ajas ja kõnsentratsioonis.

Võrdluste suhtes, mis ei kuulu ühtegi eespool nimetatud kategooriasse, tuleks kasutada Bonferroni-Holmi meetodit p-väärtuste kohandamiseks. Lisateavet taoliste mudelite analüüsimise kohta võib leida allikatest Hocking (1985) ning Hochberg ja Tamhane (1987).

Teine võimalus on registreerida toorandmed ning esitada need uuringuraportis iga päeva kohta kui sigivusnäitaja (marjaterade arv) paralleelproovi kohta. Seejärel tuleks arvutada paralleelproovi toorandmete keskvärtus ja teha sellega ruutjuurteisendus. Paralleelproovide teisendatud keskvärtustega tuleks teha esmalt ühefaktoriline dispersioonanalüüs ning seejärel moodustada Dunnetti kontrastid. Kasulik võib olla ka see, kui vaadelda iga kontsentratsioonirühma ja/või paralleelproovi sigivuse andmeid visuaalselt dispersioonidiagrammil, mis näitab andmete muutumist ajas. See võimaldab esitada mitteformaalseid hinnanguid ajas avalduva võimaliku toime kohta.

Kõik ülejäänud bioloogilised andmed

Statistiliste analüüside aluseks on eeldus, et õigesti valitud dooside korral on andmed monotoonsed. Seega eeldatakse, et andmed on monotoonsed ning nende monotoonsust hinnatakse formaalselt lineaar- ja ruutkontrastidega. Kui andmed on monotoonsed, soovitatakse kasutada paralleelproovide mediaanvärtuste suhtes Jonckheere'i-Terpstra trenditesti (vastavalt dokumendile OECD 2006). Kui ruutkontrast on oluline ja lineaarkontrast ei ole, siis tunnistatakse andmed mittemonotoonseks.

Kui andmed on mittemonotoonsed ja eriti kui see on tingitud nõrgemast reaktsioonist ühes või kahes kõige kõrgemas kontsentratsioonirühmas, siis tuleks kaaluda võimalust jätta need kontsentratsioonirühmad analüüsiandmestikust välja. Kõnealune otsus tuleb teha pädeva erialase hinnangu põhjal, võttes arvesse kõiki olemasolevaid andmeid, eriti andmeid, mis osutavad asjaomastel kontsentratsioonitasemetel esinevale selgele mürgisusele.

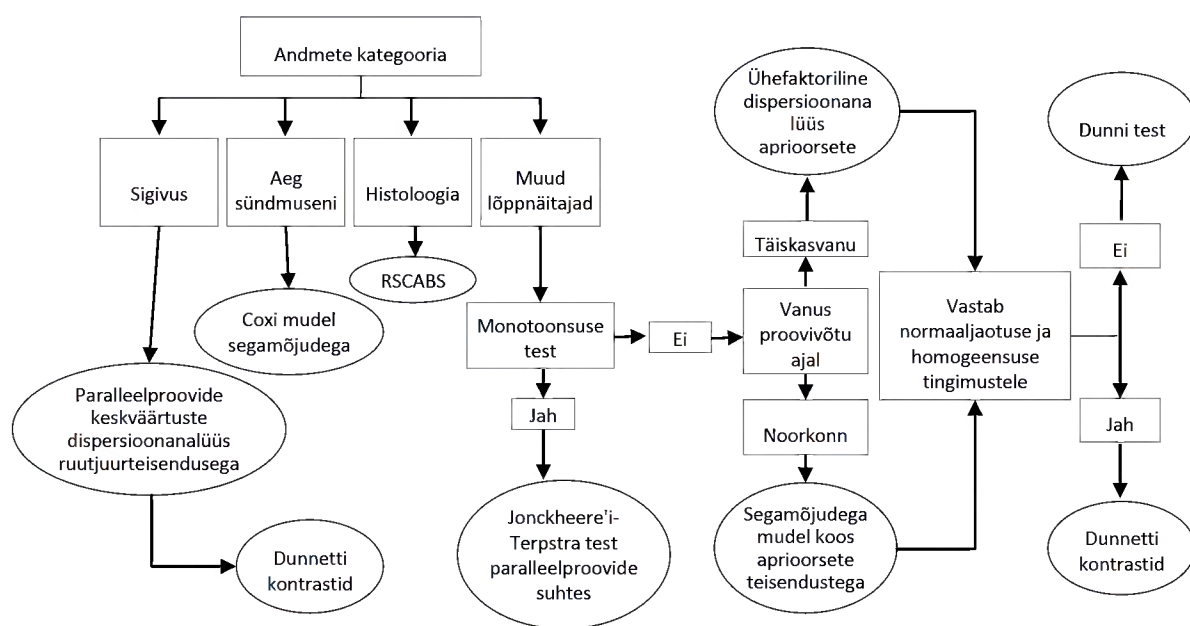
Kehamassi ja pikkuse puhul teisendusi ei soovitata, kuigi need võivad olla mõnikord vajalikud. Vitellogeniini käsitlevate andmete puhul soovitatakse kasutada logaritmteisendust; teiseseid sootunnuseid (pärakuuime papillaarjätked) käsitlevate andmete puhul soovitatakse kasutada ruutjuurteisendust; kooruvust, elulemust, soolist jaotumist ja viljastatud marjaterade osakaalu käsitlevate andmete puhul soovitatakse kasutada arkussiinus-ruutjuurteisendust. Koorumiseni ja esimese kudemiseni kulunud aega tuleks käsitleda kui sündmuse toimumiseni kulunud aja andmeid ning andmeid kindla aja jooksul koorumata üksikembrüote või kuduta paralleelproovide kohta kui paremalt tsenseeritud andmeid. Koorumiseni kulunud aeg tuleks arvutada iga paralleelproovi koorumispäeva mediaani põhjal. Nimetatud lõppnäitajaid tuleks analüüsida segamõjudega proportsionaalseid ohte käsitleva Coxi mudeli abil.

Täiskasvanud kalade proovide bioloogilised andmed sisaldavad ühte mõõteväärtust paralleelproovi kohta, st igas paralleelnõus on üks XX-kala ja üks XY-kala. Seetõttu soovitatakse kasutada paralleelproovide keskvärtuste suhtes ühefaktorilist dispersioonanalüüsi. Kui dispersioonanalüüsi eeldused on täidetud (normaaljaotus ja dispersiooni homogeensus, mida hinnatakse dispersioonanalüüsi jääkide põhjal vastavalt Shapiro-Wilksi ja Levene'i testiga), tuleks kontrollrühmast erinevad kontsentratsioonirühmad kindlaks teha Dunnetti kontrastide abil. Ent kui dispersioonanalüüsi eeldused ei ole täidetud, tuleks kontrollrühmast erinevate kontsentratsioonirühmade kindlakstegemiseks kasutada Dunni testi. Sarnast menetlust soovitatakse kasutada protsentuaalsete andmete (viljakus, kooruvus ja ellujäämus) puhul.

Noorkalade proovidest kogutud andmetel on üks kuni kaheksa mõõteväärtust

paralleelproovi kohta, st iga genotüübilise soo puhul võib paralleelproovi keskvaartuse arvutamisel aluseks võetud isendite arv olla erinev. Seetõttu soovitatakse kasutada esmalt segamõjuga dispersioonanalüüsi mudelit ja seejärel Dunnetti kontraste – tingimusel, et normaaljaotuse ja dispersiooni homogeensuse tingimused on täidetud (segamõjuga dispersioonanalüüsi jääkide põhjal). Kui need tingimused ei ole täidetud, tuleks kontrollrühmast erinevate kontsentratsioonirühmade kindlakstegemiseks kasutada Dunni testi.

Joonis 2. MEOGRTga kogutud andmete analüüsimiseks soovitatavate statistiliste meetodite vooskeem



Kirjandus

- (1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. (Väljaande lisad on avaldatud eraldi dokumendina.) OECD Publishing, Pariis.
- (2) Cameron, A. C., ja Trivedi, P. K. (2013). Regression Analysis of Count Data. 2. väljaanne. Econometric Society Monograph No 53. Cambridge University Press.
- (3) Hocking, R. R. (1985). The Analysis of Linear Models. Brooks/Cole, Monterey, CA.
- (4) Hochberg, Y., ja Tamhane, A. C. (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

C.53. KULLESTE KASVU JA ARENGU KATSE (LAGDA)

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 241 (2015). Vajadus töötada välja ja valideerida katse, millega saab välja selgitada ja kirjeldada mürgiste kemikaalidega kokkupuute kahjulikke tagajärgi kahepaiksetele, tuleneb kartusest, et kemikaalid võivad juba keskkonnas esineva kontsentratsiooni juures avaldada kahjulikku mõju nii inimesele kui ka elusloodusele. Kulleste kasvu ja arengu katset (LAGDA) käsitlevas OECD katsejuhendis kirjeldatakse kahepaiksete liigiga tehtavat mürgisuse katset, mille käigus vaadeldakse kasvu ja arengut viljastamisest kuni varase noorlooma arengujärguni. Katsega (mis tavaliselt kestab 16 nädalat) hinnatakse kulleste varast arengut, moonet, ellujäämust, kasvu ja osalist suguküpsemist. Samuti võimaldab see mõõta mitmeid muid näitajaid, mille abil saab diagnostiliselt hinnata võimalikke endokriinfunktsiooni kahjustavaid kemikaale või muid arengu- ja reproduktiivtoksilisi aineid. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud meetod põhineb kannuskonnaga (*Xenopus laevis*) tehtud valideerimisuuringul, mille viis läbi Ameerika Ühendriikide Keskkonnakaitseamet ja mida toetavaid uuringuid on tehtud Jaapanis (1). Kuigi kasvu ja arengu jälgimise katse metoodika jaoks, mille oluline komponent on geneetilise soo kindlakstegemise võimalus, võivad sobida ka muud kahepaikseliigid, on käesolevas katsemeetodis kirjeldatud konkreetsed meetodid ja vaadeldavad näitajad kohaldatavad üksnes *Xenopus laevis*'e suhtes.
2. LAGDA on kahepaiksega tehtav kõrgema taseme katse, mille eesmärk on koguda kahjuliku toime kohta kontsentratsiooni-toime seost kirjeldavat põhjalikumat teavet, mida saaks kasutada ohtude väljaselgitamiseks ja kirjeldamiseks ning ökoloogilise riski hindamiseks. Katse vastab endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimise ja hindamise OECD kontseptuaalse raamistiku 4. tasemele, kus *in vivo* katsetega kogutakse andmeid ka kahjuliku mõju kohta endokriinfunktsiooniga seotud näitajatele (2). Katse üldpõhimõtte kohaselt viiakse *X. laevis*'e embrüod, mis on Nieuwkoop ja Faberi (NF) järgi 8.–10. staadiumis (3), kokkupuutesse uuritava kemikaali vähemalt nelja eri kontsentratsiooniga (mis üldjuhul erinevad üksteisest vähemalt poole logaritmintervalli võrra) ja kontrollaine(te)ga. Kokkupuudet jätkatakse 10. nädalani pärast kontrollrühmas NF-i järgi 62. staadiumi saabumise mediaanaega ning 62. staadiumis (≤ 45 päeva pärast viljastamist; tavaliselt 45. viljastamisjärgse päeva paiku) võetakse üks osaline vaheproov. Iga uuritava kontsentratsiooni juures tehakse neli paralleelproovi ja kontrollainega kaheksa paralleelproovi. Kokkupuute jooksul hinnatakse (osalise vaheprooviga ja katse lõpus võetava prooviga) nii üldise mürgisusega seotud näitajaid (suremus, ebatavaline käitumine ning kasvu ja kehamassi juurdekasv) kui ka näitajaid, millega kirjeldatakse konkreetselt endokriinsüsteemi kahjustavaid toimet mehhanisme, mis mõjutavad östrogeenide, androgeenide või kilpnäärme vahendusel toimivaid füsioloogilisi protsesse. Meetodis

keskendutakse eelkõige võimalikule populatsiooni mõjutavale toimele (kahjulik mõju ellujäämusele, arengule, kasvule ja sigimisvõime arengule), et arvutada täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) või toimet avaldav kontsentratsioon, mis põhjustab mõõdetava näitaja muutumise x protsendi võrra (ECx). Samas tuleb arvestada, et ECx-il põhinevad meetodid ei sobi sageli sellist tüüpi suurte uuringute jaoks, kus uuritavate kontsentratsioonide arvu suurendamine ECx-i kindlakstegemise eesmärgil võib olla ebaotstarbekas. Samuti tuleb tähele panna, et meetod ei hõlma sigimisetappi ennast. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

3. Kuna uuritud kemikaalide arv on väike ja kõnealuse üsna keeruka katse valideerimises osales vähe laboreid, ei ole laboritevahelist korratavust seni katseandmetega dokumenteeritud ning võib eeldada, et OECD katsejuhend nr 241 vaadatakse läbi ja seda muudetakse saadud kogemuste valguses pärast seda, kui on tehtud piisavalt uuringuid kõnealuse uue uuringukava toimivuse kinnitamiseks. LAGDA on oluline katse, mis aitab hinnata kahepaiksete populatsiooni vähenemise võimalikke mõjutegureid, kuna selles hinnatakse kemikaalidega kokkupuute mõju tundlikus kullesestaadiumis, kus kemikaalide kahjulik mõju ellujäämusele ja arengule, sealhulgas suguorganite normaalsele arengule, võib üle kanduda populatsioonile.
4. Katse on üles ehitatud nii, et sellega saaks tuvastada nii endokriinfunktsiooni kui ka muude mehhanismide kaudu tekkivat lõppmõju, ning osa selle diagnostilisi näitajaid on spetsiifilised põhiliste endokriinsüsteemi toimemehhanismide suhtes. Tuleb märkida, et enne LAGDA väljatöötamist puudus kirjeldatud ülesannet täitev valideeritud katsemeetod kahepaiksete jaoks.
5. Enne katse alustamist on oluline koguda andmeid uuritava kemikaali füüsikalise-keemiliste omaduste kohta, eelkõige selleks, et oleks võimalik valmistada püsivaid kemikaalilahuseid. Samuti tuleb kasutada piisavalt tundlikku analüüsimeetodit uuritava kemikaali kontsentratsioonide kontrollimiseks. Ligikaudu 16 nädalat kestva katse jaoks läheb vaja kokku 480 looma ehk *X. laevis*'e embrüot (lahusti kontrollproovi kasutamisel 640 embrüot), et tagada populatsiooniga seotud näitajate (nt kasv, areng ja suguküpsus) hindamiseks piisav statistiline võimsus.
6. Enne katsemeetodi kasutamist segu analüüsimiseks regulatiivsel eesmärgil tuleks kaaluda, kas meetodiga saadakse taotletava eesmärgi jaoks vastuvõetavad tulemused. Peale selle ei saa käesoleva katsemeetodiga hinnata otseselt sigivust ning järelikult see ei pruugi olla kasutatav kõrgemal tasemel kui endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimise ja hindamise OECD kontseptuaalse raamistiku 4. tase.

KATSEMEETODI TEADUSLIK ALUS

7. Suur osa meie praegustest teadmistest kahepaiksete bioloogia kohta on saadud tänu kannuskonna (*Xenopus laevis*) kasutamisele laboratoorse mudelliigina. Seda liiki on laboris lihtne kasvatada, sellel ovulatsiooni esilekutsumiseks sobib inimese kooriongonadotropiin (hCG) ning loomavarud on hõlpsasti kättesaadavad kaubanduslikel eesmärkidel kasvatajatelt.
8. Sarnaselt kõikide selgroogsetega reguleerib kahepaiksete sigimisfunktsiooni hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete (HAS) telg (4). Östrogeenid ja androgeenid täidavad selles endokriinsüsteemis vahendaja rolli ning juhivad sooliselt dimorfsete kudede arengut ja füsioloogiat. Kahepaiksete elutsükliks on kolm selgesti eristatavat etappi, mille vältel kõnealune telg on eriti aktiivne: 1) sugunäärmete diferentseerumine kullese arengu käigus, 2) teiste sootunnuste kujunemine ja sugunäärmete küpsemine noorlooma staadiumis ning 3) täiskasvanud loomade sigimine. Vastuvõtlikkus endokriinfunktsiooni häiretele, mida põhjustavad teatavad kemikaalid (nt östrogeenid ja androgeenid) ning mis võib lõpuks viia organismide sigimisvõime kadumiseni, on kõigis nimetatud arenguetappides tõenäoliselt suurem.
9. Sugunäärmete areng algab NFi järgi 43. staadiumis, mil tekib bipotentsiaalne genitaalkurd. Sugunäärmete diferentseerumine algab NFi järgi 52. staadiumis, mil sugurakkude eellasrakud liiguvad säsikoesse (isastel) või jäävad arenevate sugunäärmete koorepiirkonda (emastel) (3). Asjaolust, et kõnealune sugunäärmete soolise diferentseerumise protsess on *Xenopus*'e puhul keemiliselt mõjutatav, teatati esimest korda 1950ndatel aastatel (5, 6). Kui kulleled puutuvad sugunäärmete diferentseerumise perioodil kokku östradiooliga, toimub isastel soo arengu pöördumine ning neist saavad täiskasvanuna kõigi toimivate funktsioonidega emased (7, 8). Võimalik on ka soo arengu funktsionaalne pöördumine emasest isaseks, mida on esile kutsutud kullestesse munandikoe siirdamisega (9). Ent kui liigil *Xenopus tropicalis* kutsub kokkupuude aromataasi inhibiitoriga esile soo arengu funktsionaalse pöördumise (10), siis *Xenopus laevis*'e puhul ei ole katsed seda kinnitanud. Varasemates katsetes on mürgiste ainete mõju sugunäärmete diferentseerumisele hinnatud moondeetapil tehtavate sugunäärmekoe uuringutega ja soo arengu pöördumist oli võimalik kindlaks teha üksnes soolise jaotumise analüüsi abil. Kuni viimase ajani puudus võimalus *Xenopus*'e geneetilise soo kindlakstegemiseks. Ent hiljutine *X. laevis*'e sooga seotud markerite avastamine annab võimaluse teha kindlaks geneetilist sugu ja tuvastada vahetult loomad, kellel soo areng on pöördunud (11).
10. Isastel noorloomadel jätkub areng vere testosteroonisisalduse kasvuga, millega kaasneb teiste sootunnuste kujunemine ja munandite areng. Emastel loomadel toodavad munasarjad östradiooli ning selle tagajärjel ilmub nende plasmasse vitellogeniin (VTG), munasarjades tekivad vitellogeniini toimel ootsüüdid ja arenevad munajuhad (12). Munajuhad on emase teisesed sootunnused, mis aitavad sigimise käigus ootsüütidel küpseda. Munajuha läbivatele ootsüütidele tekib kallerkest ning need kogunevad emakasse ja on siis valmis viljastamiseks. Munajuhade arengut näivad reguleerivat östrogeenid, kuna

nende kujunemine on *X. laevis*'e (13) ja *X. tropicalis*'e (12) puhul korrelatsioonis vere östradiolisisaldusega. Teatatud on munajuhade kujunemisest isastel, mida on põhjustanud kokkupuude polüklooritud bifenüüli ühenditega (14) ja 4-*tert*-oktüülfenooliga (15).

KATSE PÕHIMÕTE

11. Katsekava kohaselt viiakse NFi järgi 8.–10. staadiumis olevad *X. laevis*'e embrüod vee kaudu kokkupuutesse uuritava kemikaaliga neljas eri kontsentratsioonis, samuti kontrollproovi(de)ga. Kokkupuudet jätkatakse 10. nädalani pärast kontrollrühmas NFi järgi 62. staadiumi saabumise mediaanaega ning 62. staadiumis võetakse üks vaheproov. Kui kemikaalid on väga hüdrofoobsed, võib olla võimalik neid manustada söödaga, kuid seda kokkupuute tekitamise viisi ei ole käesoleva katsemeetodi rakendamisel seni kuigi palju kasutatud. Iga uuritava kontsentratsiooniga tehakse neli paralleelkatset ja iga kontrollprooviga kaheksa paralleelkatset. Kokkupuute jooksul hinnatakse nii üldise mürgisusega seotud lõppnäitajaid (suremus, kõrvalekalded käitumises ning kasvu ja kehamassi juurdekasv) kui ka lõppnäitajaid (nt kilpnäärme histopatoloogia, sugunäärme ja -juhade histopatoloogia, väärarengud, plasma vitellgoeniisisaldus (valikuline) ning genotüübiline/fenotüübiline sooline jaotumine), millega kirjeldatakse konkreetselt endokriinsüsteemi kahjustavaid toimetehhanisme, mis mõjutavad östrogenide, androgeenide või kilpnäärme vahendusel toimivaid füsioloogilisi protsesse.

KATSE NÕUETEKOHASUSE KRITEERIUMID

12. Kehtivad järgmised katse nõuetekohasuse kriteeriumid.
 - Lahustunud hapniku kontsentratsioon peaks kogu katse vältel olema ≥ 40 % küllastuskontsentratsioonist õhus.
 - Vee temperatuur peaks olema vahemikus 21 ± 1 °C ning temperatuuride erinevus paralleelproovide ja eri kontsentratsioonidega töödeldavate rühmade vahel ei tohiks ületada 1,0 °C.
 - Katselahuse pH tuleks hoida vahemikus 6,5–8,5 ning paralleelproovide ja eri kontsentratsioonidega töödeldavate rühmade vaheline erinevus ei tohiks ületada 0,5.
 - Tuleks esitada tõendid selle kohta, et uuritava kemikaali kontsentratsiooni lahuses on suudetud rahuldavalt hoida vahemikus ± 20 % mõõtmistulemuste keskväärtusest.
 - Kokkupuuteperioodil esinenud suremus peaks olema kõikides kontrollrühmade paralleelproovides ≤ 20 %.
 - Uuringu alustamiseks valitud kudu eluvõimelisus peaks olema ≥ 70 %.
 - Kontrollrühmades NFi järgi 62. staadiumisse jõudmiseks kuluv mediaanaeg peaks olema ≤ 45 päeva.

- Katseorganismide keskmine mass NFi järgi 62. staadiumisse jõudmisel ja katse lõpetamisel peaks olema kontrollrühmades ja lahusti kontrollrühmades (kui neid kasutatakse) vastavalt $1,0 \pm 0,2$ g ja $11,5 \pm 3$ g.
13. Kuigi see ei ole nõuetekohasuse kriteerium, soovitatakse analüüsil kasutada vähemalt kolme töötlemiskontsentratsiooni kolme rikkumata paralleelprooviga. Töödeldud rühma näitajaid rikkuvaks liigseks suremuseks peetakse kahes või enamas paralleelproovis esinevat rohkem kui nelja surmajuhtu ($> 20\%$), mis ei saa olla tingitud tehnilisest veast. Analüüsiks peaks olema võimalik kasutada vähemalt kolme töötlemiskontsentratsiooni, mille puhul ei ilmne selget mürgisust. Selge mürgisuse tunnused on muu hulgas katseorganismi hõljumine pinnal, lebamine nõu põhjas, ümberpööratud asendis või ebakorrapärane ujumine, pinnale mittetõusmine, ärritajatele mittereageerimine, morfoloogilised kõrvalekalded (*nt* jäsemedeformatsioonid), veritsevad haavandid ja kõhuturse.
14. Kui leitakse kõrvalekaldeid katse nõuetekohasuse kriteeriumidest, tuleks kaaluda selliste kõrvalekallete mõju katsetulemuste usaldusväärsusele ning esitada need kõrvalekalded ja kaalutlused katseprotokollis.

MEETODITE KIRJELDUS

Seadmed

15. Tavapärased laboriseadmed, eeskätt järgmised seadmed:

- a) temperatuuri reguleerimise seade (*nt* kütteseadmed või jahutid, mis on reguleeritavad temperatuurile 21 ± 1 °C);
- b) termomeeter;
- c) stereomikroskoop ja lahkamiseks vajalikud vahendid;
- d) mikroskoobiga ühendatav digifotoaparaat vähemalt 4-megapikslise lahutusvõimega (vajadusel);
- e) analüütiline kaal, millega on võimalik kaaluda 0,001 mg või 1 µg täpsusega;
- f) lahustunud hapniku mõõtur ja pH-meeter;
- g) valgustustiheduse mõõtur, mis näitab tulemust luksides.

Vesi

Päritolu ja kvaliteet

16. Kasutada võib kohapeal kättesaadavat lahjendusvett (*nt* allikavesi või aktiivsõega filtreeritud kraanivesi), mis võimaldab *X. laevis*'e normaalset kasvu ja arengut, ning olemas peavad olema tõendid selles vees aset leidva normaalse kasvu kohta. Kuna kohaliku vee kvaliteet võib olenevalt asukohast oluliselt erineda, tuleb teha vee kvaliteedi analüüs, eriti juhul, kui puuduvad varasemad andmed selle vee kasutamise kohta kulleste

kasvatamiseks. Raskemetallide (nt Cu, Pb, Zn, Hg, Cd ja Ni), peamiste anioonide ja katioonide (nt Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), pestitsiidide, orgaanilise süsiniku ja hõljuvaine sisaldus tuleks kindlaks teha enne katse algust ja/või kui lahjendusvesi on teadaolevalt suhteliselt püsiva kvaliteediga, siis näiteks iga kuue kuu järel. Mõned nõuetekohase lahjendusvee keemilised omadused on esitatud 2. liites.

Jodiidi kontsentratsioon katses kasutatavas vees

17. Selleks et kilpnääre saaks sünteesida normaalset moonet toetavaid kilpnäärmehormoone, peab kullestele olema vee ja sööda kaudu kättesaadav piisav kogus jodiidi. Praegu ei ole empiirilisi suuniseid söödas või vees sisalduva jodiidi minimaalse kontsentratsiooni kohta, mis on vajalik normaalse arengu tagamiseks. Siiski võib jodiidi kättesaadavus mõjutada kilpnäärmesüsteemi reageerimisvõimet kilpnääret aktiveerivatele ainetele ja on teada, et see mõjutab kilpnäärme baasaktiivsust, millele tasub tähelepanu pöörata kilpnäärme histopatoloogilise uuringu tulemuste tõlgendamisel. Varasemate uurimuste põhjal on katse edukalt läbi viidud, kui jodiidi (I^-) kontsentratsioon lahjendusvees on olnud vahemikus 0,5–10 $\mu\text{g/l}$. Ideaaljuhul peaks jodiidi kontsentratsioon lahjendusvees olema kogu katse vältel 0,5 $\mu\text{g/l}$ (seda lisatakse veele naatrium- või kaaliumsoola kujul). Kui katses kasutatav vesi saadakse deioniseeritud veest kunstlikult, tuleks sellele lisada jodiidi kontsentratsioonis vähemalt 0,5 $\mu\text{g/l}$. Katseprotokollis tuleks registreerida katses kasutatud vees (lahjendusvees) mõõdetud jodiidikontsentratsioonid ning joodi või muude soolade lisamine katsevette (kui neid kasutatakse). Lisaks veele võib mõõta ka sööda joodisisaldust.

Kokkupuutesüsteem

18. Katse väljatöötamisel kasutati läbivooluga lahjendussüsteemi. Süsteemi kõik veega kokkupuutuvad osad peaksid olema klaasist, roostevabast terasest ja/või muust keemiliselt inertsest materjalist. Kokkupuutenõudeks peaksid olema klaasist või roostevabast terasest akvaariumid kasuliku ruumalaga vahemikus 4,0–10,0 l (veesügavusega vähemalt 10–15 cm). Süsteem peaks võimaldama kasutada kõiki kokkupuutekontsentratsioone, kontrollrühma ja lahusti kontrollrühma (kui see on vajalik) nii, et iga kontsentratsiooniga töödeldavas rühmas on neli ja igas kontrollrühmas kaheksa paralleelproovi. Vooluhulk igas nõus peaks olema konstantne, nii et püsiksid bioloogilised tingimused ja säiliks kokkupuute kemikaaliga. Soovitavalt peaks vooluhulk olema piisav (nt vähemalt viis nõu täielikku veevahetust päevas), et vältida kemikaali kontsentratsiooni vähenemist katseorganismide ja akvaariumis leiduvate veemikroobide ainevahetuse, abiootilise lagunemise (hüdrolüüs, fotolüüs) või kadude (aurustumine, sorptsioon) tagajärjel. Katsenõud tuleks kokkupuutesüsteemis kohtadele asetada juhuslikkuse alusel, et vähendada asukoha, sealhulgas temperatuuri, valgustugevuse ja muude väikeste erinevuste võimalikku mõju. Lisateavet läbivooluga kokkupuutesüsteemide koostamise kohta võib

leida kalade, suurselgrootute ja kahepaiksetega tehtavaid ägeda mürgisuse katseid käsitlevast ASTMi standardjuhendist (16).

Kemikaali lisamine: katselahuste valmistamine

19. Katselahuste valmistamiseks kokkupuutesüsteemis tuleks uuritava kemikaali põhilahust manustada kokkupuutesüsteemi sobiva pumba või muu seadme abil. Põhilahuse vooluhulka tuleb enne kokkupuute alustamist kalibreerida vastavalt katselahustega tehtud analüüsi tulemustele, ning seda tuleb katse jooksul regulaarselt volumeetriliselt kontrollida. Katselahust tuleb igas nõus iga päev mahu järgi vähemalt viis korda uuendada.
20. Meetod, mida kasutatakse uuritava kemikaali lisamiseks süsteemi, sõltub kemikaali füüsikalis-keemilistest omadustest. Seetõttu tuleks enne katset koguda asjaomase kemikaali kohta lähteandmeid, et kontrollida selle sobivust katses kasutamiseks. Uuritava kemikaali kohta on kasulik teada selle struktuurivalemit, molekulmassi, puhtust, püsivust vees ja valguse käes, pK_a -d, K_{ow} -d, lahustuvust vees (soovitavalt selles, mida kasutatakse katses) ja aururõhku, samuti kiire biolagundatavuse katse tulemusi (katsemeetod C.4 (17) või C.29 (18)). Lahustuvuse ja aururõhu põhjal võib arvutada Henry konstandi, mis võimaldab hinnata, kas katse ajal võib esineda uuritava kemikaali kadu aurustumise tõttu. Katset läbiviimist ilma eespool osutatud andmeteta tuleks hoolikalt kaaluda, sest uuringu kavandamisel tuleb arvesse võtta uuritava kemikaali füüsikalis-keemilisi omadusi ning ilma sellekohaste andmeteta võib katse tulemuste tõlgendamine osutuda raskeks või võimatuks. Uuritava kemikaali kvantitatiivseks määramiseks katselahustes peaks olemas olema usaldusväärne teadaoleva dokumenteeritud täpsuse ja avastamispiiriga analüüsimeetod. Vees lahustuvat uuritavat kemikaali võib lahustada lahjendusvee alikvootides kontsentratsioonis, mis võimaldab kemikaali lisada läbivoolusüsteemi kaudu vajalikus katsekontsentratsioonis. Toatemperatuuril vedelate või tahkete ja vees mõõdukalt lahustuvate kemikaalide puhul võib olla vajalik vedelikul või tahkel materjalil (nt klaasvill) põhinev küllastuskolonn (19). Väga hüdrofoobseid uuritavaid kemikaale võib olla võimalik manustada söödaga, kuid seda kokkupuuteviisi ei ole käesoleva katsemeetodi rakendamisel kuigi palju kasutatud.
21. Valitud kontsentratsiooniga katselahused valmistatakse põhilahuse lahjendamise teel. Põhilahuse valmistamiseks tuleks uuritavat kemikaali lahjendusvees lihtsalt mehaaniliselt segada või loksutada (kasutades nt segurit ja/või ultrahelitöötlust). Sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse saamiseks võib kasutada küllastuskolonne/-süsteeme või passiivse doseerimise meetodeid (20). Eelistatavalt tuleks kasutada ilma kaaslahustita katsesüsteemi, kuid kuna uuritavatel kemikaalidel on erinevad füüsikalis-keemilised omadused, tuleb kokkupuutevee valmistamisel tõenäoliselt kasutada erinevaid lähenemisviise. Lahustite ja kandeainete kasutamist tuleks kõigi vahenditega vältida, sest 1) teatavad lahustid võivad olla ise mürgised ja/või põhjustada soovimatuid või ootamatuid reaktsioone; 2) kemikaalide uurimine nende vees lahustuvusest kõrgemal

kontsentratsioonil (nagu lahusteid kasutades sageli juhtub) võib raskendada toimet avaldava kontsentratsiooni täpset määramist; 3) lahustite kasutamine pikaajalistes katsetes võib põhjustada mikroobide tegevusega seotud märkimisväärset biokile moodustumist, mis võib mõjutada keskkonnatingimusi ja kokkupuutekontsentratsioonide säilitamise võimet ning 4) kui puuduvad varasemad andmed, mille kohaselt lahusti ei moonuta uuringu tulemust, tuleb lahusti kasutamiseks teha lahusti kontrollprooviga töötlemine, mis aga mõjutab oluliselt loomade heaolu, kuna katse jaoks on sel juhul vaja rohkem loomi. Raskesti uuritava kemikaali korral võib lahustit kasutada viimase võimalusena ning arvesse tuleb võtta OECD juhendit raskesti uuritavate ainete ja segude veekeskkonnas avalduva mürgisuse uurimise kohta (21), et teha kindlaks parim meetod. Lahusti valiku määravad uuritava kemikaali keemilised omadused ja olemasolevad varasemad kontrollandmed lahusti kasutamise kohta. Varasemate andmete puudumise korral tuleks lahusti sobivus kindlaks teha enne lõplikku uuringut. Kui lahusti kasutamine on vältimatu ja ilmneb mikroobne aktiivsus (biokile teke), on soovitatav biokile tekkimine igas nõus kogu katse jooksul (vähemalt kord nädalas) registreerida/protokollida. Ideaaljuhul peaks lahusti kontsentratsioon olema lahusti kontrollrühmas ja kõigis töödeldavates rühmades pidevalt ühtlane. Kui lahusti kontsentratsioon ei ole pidevalt ühtlane, tuleks lahusti kontrollrühmas kasutada töödeldavates rühmades kasutatavat suurimat lahusti kontsentratsiooni. Lahusti kandeaine kasutamise korral ei tohiks lahusti suurim kontsentratsioon ületada 100 µl/l või 100 mg/l (21) ja soovitatav on hoida lahusti kontsentratsioon võimalikult väike (nt ≤ 20 µl/l), et vältida lahusti võimalikku mõju mõõdetavatele näitajatele (22).

Katseloomad

Katseliik

22. Katseliik *X. laevis* on valitud järgmistel põhjustel: 1) seda kasvatatakse laborites kõikjal maailmas, 2) see on kaubanduses lihtsalt kättesaadav ning 3) sellel on võimalik kindlaks teha geneetilist sugu.

Täiskasvanute hooldus ja järglaste saamine

23. *X. laevis*'e nõuetekohast hooldust ja järglaste saamist on kirjeldatud standardjuhendis (23). *X. laevis*'e kasvatuskohta ja hooldamist on kirjeldanud ka Read (24). Sigimise esilekutsumiseks süstitakse kolmele kuni viiele täiskasvanud emas- ja isaslooma paarile kõhuõõnde inimese kooriongonadotropiini (hCG). Emas- ja isasisenditele süstitakse näiteks vastavalt ligikaudu 800–1 000 RÜd ja 500–800 RÜd hCG-d, mis on lahustatud 0,6–0,9 % füsioloogiliseks lahuses (või Ringeri lahuses, mis on kahepaiksetel kasutatav isotooniline füsioloogiline lahus www.hermes.mbl.edu/biologicalbulletin/compendium/comp-RGR.html). Süstemaht peaks olema ligikaudu 10 µl kehamassi grammi kohta (~1000 µl). Sigimispaare hoitakse seejärel suurtes nõudes, häirimata ja püsivates tingimustes, et esile kutsuda kopulatsiooni. Igas sigimisenõus peaks olema roostevabast terasvõrgust topeltpõhi (nt võrguavadega 1,25 cm),

millest munad kukuvad läbi nõu põhjale. Hilisel pärastlõunal hCG-ga süstitud konnad koevad enamiku mune järgmise päeva hommikupoolikul. Kui on koetud ja viljastatud piisav kogus mune, eemaldatakse täiskasvanud isendid sigimise nõust. Seejärel kogutakse munad kokku ja nende kallerkest eemaldatakse L-tsüsteiini abil (23). Selleks valmistatakse 2 % L-tsüsteiini lahus, mille pH viiakse 1 M NaOH abil väärtuseni 8,1. Saadud lahus temperatuuriga 21 °C lisatakse ühe kudu mune sisaldavasse 500 ml koonilisse kolbi, mida keerutatakse ettevaatlikult üks kuni kaks minutit. Seejärel loputatakse mune põhjalikult 6–8 korda 21 °C kasvatamisveega. Seejärel pannakse munad kristallisaatorisse ning kontrollitakse, kas nende eluvõimelisus on > 70 % ning alanud rakkude jagunemisega embrüote seas ei esine olulisel määral kõrvalkaldeid.

KATSEPLAAN

Uuritavad kontsentratsioonid

24. Soovitav on kasutada vähemalt kemikaali nelja kontsentratsiooni ning lisaks sobivaid kontrollproove (sealhulgas lahusti kontrollproov, kui see on vajalik). Üldiselt soovitatakse, et kontsentratsioonide jada lahjendustegur ei oleks üle 3,2.
25. Käesoleva katsemeetodi puhul tuleks suurima uuritava kontsentratsiooni kindlaksmääramiseks võimaluste piires kasutada kahepaiksetega tehtud varasemate uuringute tulemusi, et vältida selgelt mürgiseid kontsentratsioone. Kõnealuse kontsentratsiooni kindlaksmääramisel võib kasutada näiteks kvantitatiivse struktuuraktiivsussõltuvusest, analoogmeetoditest ja varasematest kahepaiksetega tehtud uuringutest saadavat teavet. Sellised uuringud on näiteks kahepaiksete metamorfoosi katse (katsemeetod C.38 (25)), konnaembrüo teratogeneesi katse – *Xenopus* (23) ja/või näiteks katsemeetodite C.48, C.41 ja C.49 kohaselt kaladega tehtud katsed (26–28). Enne LAGDA-t võib läbi viia vahemiku leidmise katse. Soovitatavalt tuleks vahemiku leidmiseks kasutatavat kokkupuudet alustada 24 tunni jooksul pärast viljastamist ning see peaks kestma 7–14 päeva (vajadusel kauem). Uuritavad kontsentratsioonid valitakse nii, et nende vahe ei oleks suurem kui 10-kordne. Vahemiku leidmise katse tulemuste põhjal tuleks valida suurim LAGDA-s kasutatav uuritav kontsentratsioon. Pange tähele, et kui on vaja kasutada lahustit, siis saab lahusti sobivuse (st kas see võib mõjutada uuringu tulemusi) samuti välja selgitada vahemiku leidmise katse osana.

Töödeldavate rühmade ja kontrollrühmade paralleelnõud

26. Iga uuritava kontsentratsiooni kohta tuleks kasutada vähemalt nelja ja kontrollproovidega (sh vajadusel lahusti kontrollprooviga) vähemalt kaheksat paralleelnõud (st vajaliku statistilise võimsuse tagamiseks peaks katsenõude arv tavalises ja vajadusel lahusti kontrollrühmas olema kaks korda suurem kui igas töödeldavas rühmas). Ühes paralleelnõus olevate loomade arv ei tohiks olla suurem kui 20. Väikseim lubatud loomade arv on 15 (viis NFi järgi 62. staadiumis võetava osaproovi jaoks ja kümme noorlooma

staadiumini kasvatamiseks). Ent igasse paralleelnõusse lisatakse täiendavaid loomi, et võimaliku suremuse korral ei langeks loomade arv alla 15 looma alampiiri.

KATSE KÄIK

Katse ülevaade

27. Katset alustatakse äsja koetud embrüotega (NFi järgi 8.–10. staadium) ja see kestab kuni noorloomade staadiumini. Iga päev kontrollitakse loomade suremust ja kõrvalekaldeid käitumises. NFi järgi 62. staadiumis võetakse kullestest osaproov (kuni 5 looma paralleelnõu kohta) ja mõõdetakse neil erinevaid näitajaid (tabel 1). Kui kõik loomad on jõudnud NFi järgi 66. staadiumisse, st läbinud moonde (või 70. päeval pärast katse alustamist, kui see saabub varem), vähendatakse juhuslikkuse alusel (aga ilma osaproovi võtmata) loomade arvu (10 loomani nõu kohta; vt punkt 43) ning alles jäänud loomadel jätkatakse kokkupuudet, kuni on möödunud veel 10 nädalat kontrollrühmas NFi järgi 62. staadiumi saabumise mediaanajast alates. Katse lõpus (noorloomade proov) tehakse täiendavad mõõtmised (tabel 1).

Kokkupuutetingimused

28. Katse parameetrite täielik ülevaade on esitatud 3. liites. Kokkupuuteperioodil tuleks katselahustes iga päev mõõta lahustunud hapnikku, temperatuuri ja pH-d. Elektrijuhtivust, leelisust ja karedust mõõdetakse kord kuus. Katselahuse temperatuuride (päevasisene) erinevus paralleelnõude ja eri kontsentratsioonidega töödeldavate rühmade vahel ei tohiks ületada 1,0 °C. Samuti ei tohiks pH mõõtmisel paralleelnõude ja eri kontsentratsioonidega töödeldavate rühmade vaheline erinevus olla suurem kui 0,5.
29. Kokkupuutenõudest võib iga päev sifooni abil eemaldada alles jäänud sööda ja jäätmed, vältides sealjuures hoolikalt nõude ristsaastumist. Loomadele tuleb tekitada võimalikult vähe stressi ja traumasid, eriti nende ümbertõstmise ja käsitlemise ning akvaariumi puhastamise ajal. Vältida tuleb stressi tekitavaid tingimusi/tegevusi (nt vali ja/või lakkamatu müra, akvaariumidele koputamine, nõu vibratsioon).

Uuritava kemikaaliga kokkupuute kestus

30. Kokkupuutekatset alustatakse äsja koetud embrüotega (NFi järgi 8.–10. staadium) ning seda jätkatakse kümne nädala möödumiseni kontrollrühmas NFi järgi 62. staadiumi saabumise mediaanajast (≤ 45 päeva alates katse algusest). Üldjuhul kestab LAGDA 16 nädalat (maksimaalselt 17 nädalat).

Katse alustamine

31. Katse alustamiseks tuleb valida sellised vanemloomad, kes on kontrollitult suutnud anda geneetiliselt kindlakstehtavast soost järglasi (5. liide). Kui täiskasvanud loomad on kudenud, kogutakse embrüod, millelt eemaldatakse tsüsteiiniga töötlemise teel kallerkest ja

mille eluvõimelisust kontrollitakse (23). Tsüsteiiniga töötlemine võimaldab embrüoid kontrolli ajal käsitseda, ilma et need pindade külge kleepuksid. Kontroll tehakse stereomikroskoobi all ja eluvõimetud embrüod eemaldatakse sobiva suurusega pipeti abil. Eelistatult tuleks katses kasutada ühte kudu, milles eluvõimeliste embrüote osakaal on üle 70 %. NFi järgi 8.–10. staadiumis olevad embrüod jaotatakse juhuslikkuse alusel ettenähtud koguses lahjendusvett sisaldavate katsenõude vahel, kuni igas nõus on 20 embrüot. Embrüoid tuleks ümberpaigutamise ajal käsitseda ettevaatlikult, et vähendada sellest tingitud stressi ja vältida nende vigastamist. Kui viljastamisest on möödunud 96 tundi, peaksid kulleled olema veesambas ülespoole liikunud ja hakanud kinnituma nõu külgedele.

Söötmisrežiim

32. Sööt ja söödaratsiooni muutmine *X. laevis*'e eri arengustaadiumides on LAGDA metoodika puhul väga oluline. Kulleste ülesöötmine suurendab tavaliselt skolioosi esinemissagedust ja raskusastet (8. liide) ning sellest tuleks hoiduda. Teisalt põhjustab kulleste alasöötmine kontrollrühmas väga suuri erinevusi loomade arengu kiiruses, mis võib vähendada katse tulemuste statistilist võimsust või selgust. Läbivoolusüsteemides kasutatavat *X. laevis*'e kulleste ja noorloomade sööta ja söötmisrežiimi käsitlevad soovitusel on esitatud 4. liites, kuid tingimusel, et katseorganismide kasv ja areng on rahuldav, on lubatud ka muud variandid. Oluline on arvestada, et kui mõõdetakse endokriinsüsteemiga seotud näitajaid, ei tohi sööt sisaldada endokriinsüsteemi mõjutavaid ained, näiteks sojajahu.

Kulleste söötmine

33. Kulleste puhul soovitatakse söödana kasutada kasvatamisvees (või lahjendusvees) kokku segatud forelli noorkalade sööda, *Spirulina* vetika tablettide ja kuldkala söödahelveste (nt helbed TetraFin®, Tetra, Saksamaa) segu. Kõnealust segu antakse kullestele tööpäevadel kolm korda päevas ja nädalavahetusel kord päevas. Lisaks söõdetakse kulleseid alates kaheksandast viljastamisjärgsest päevast tööpäevadel kaks korda päevas ja nädalavahetustel üks kord päevas 24 tunni vanuste elusate soolavähivastsetega (*Artemia* spp.). Kulleste söödaratsioon peaks olema igas katsenõus ühesugune ning võimaldama katse tulemuste korratavuse ja ülekantavuse tagamiseks katseloomade piisavat kasvu ja arengut: 1) NFi järgi 62. staadiumisse jõudmise mediaanaeg kontrollrühmas peaks olema ≤ 45 päeva ja 2) kontrollrühma loomade keskmine kehamass 62. staadiumis peaks olema $1,0 \pm 0,2$ g.

Noorloomade söötmine

34. Pärast moonet tuleks söötmisrežiimis kasutada kvaliteetset uppuvat konnasööta, nt Sinking Frog Food 3/32 (Xenopus Express, FL, Ameerika Ühendriigid) (4. liide). Kui noorkonnad on veel väikesed, jahvatatakse graanuleid põgusalt kohviveskis, blenderis või peenestatakse uhmris, et vähendada nende suurust. Kui noorloomad on piisavalt suured täismõõdus graanulite söömiseks, ei ole jahvatamine või peenestamine enam vajalik.

Loomi tuleks sööta kord päevas. Noorloomade söötmine peaks võimaldama organismide piisavat kasvu ja arengut: soovitatavalt peaks noorloomade keskmine kehamass kontrollrühmas katse lõpetamise ajaks olema $11,5 \pm 3$ g.

Analüütiline keemia

35. Enne katse alustamist tuleb hinnata uuritava kemikaali püsivust (nt lahustuvust, lagundatavust ja lenduvust) ning kõik vajalikud analüüsimeetodid tuleb valida olemasolevate andmete või teadmiste põhjal. Kui kemikaali annustatakse lahjendusveega, on soovitatav enne katse algust analüüsida kõikide kontsentratsioonide paralleelnõudest võetud uuritavaid lahuseid, et kontrollida süsteemi toimivist. Kokkupuuteperioodil määratakse uuritava kemikaali kontsentratsioonid sobivate ajavahemike järel, eelistatavalt igal nädalal iga töödeldava rühma vähemalt ühes paralleelnõus, jälgides, et eri nädalatel kasutataks sama töödeldava rühma erinevaid paralleelnõusid. Tulemused peaksid soovitatavalt põhinema mõõdetud kontsentratsioonidel. Ent kui uuritava kemikaali kontsentratsiooni lahuses on suudetud kogu katse jooksul säilitada rahuldavalt vahemikus ± 20 % nimikontsentratsioonist, võivad tulemused põhineda kas nimi- või mõõdetud väärtustel. Lisaks ei tohi ühegi töödeldava rühma sees mõõdetud katsekontsentratsioonide variatsioonikoefitsient kogu katse vältel ühegi kontsentratsiooni puhul ületada 20 %. Kui mõõdetud kontsentratsioonid ei jää nimikontsentratsiooniga võrreldes vahemikku 80–120 % (nt kui uuritakse tugevalt biolagunevaid või adsorbeeruvaid kemikaale), tuleb määrata toimet avaldavad kontsentratsioonid ning esitada need suhtarvuna läbivoolukatsete kontsentratsioonide aritmeetilise keskmise suhtes.
36. Lahjendusvee ja põhilahuse vooluhulkasid tuleb kontrollida sobivate ajavahemike järel (nt kolm korda nädalas) kogu kokkupuuteperioodi vältel. Kui kasutatakse kemikaale, mille esinemist ei ole võimalik mõne või ühegi nimikontsentratsiooni juures tuvastada (nt seepärast, et nad lagunevad kiiresti või adsorbeeruvad katsenõule või akumuleeruvad suurel määral katseloomade kehasse), soovitatakse kõikides kambrites katselahuse uuendamise sagedust kohandada nii, et uuritavad kontsentratsioonid püsiks võimalikult ühtlased.

Vaatlused ja näitajate mõõtmine

37. Kokkupuute käigus hinnatakse nii mürgisusele osutavaid näitajaid (sh suremus, ebatavaline käitumine, näiteks kliinilised haiguse ja/või üldised mürgisuse sümptomid ning pikkusel ja kehamassil põhinevad kasvunäitajad) kui ka patoloogilisi näitajaid, mis võivad reageerida nii üldisele mürgisusele kui ka östrogenide, androgeenide või kilpnäärme kaudu mõjuvatele endokriinsetele toimet mehhanismidele. Lisaks võib katse lõpetamisel mõõta plasma VTG kontsentratsiooni. VTG mõõtmine võib aidata mõista uuringu tulemusi endokriinsete mehhanismide valguses, kui uuritakse võimalikke endokriinfunktsiooni kahjustavaid kemikaale. Tabelis 1 on esitatud ülevaade mõõdetavatest näitajatest ja mõõtmisaegadest.

Tabel 1. Ülevaade LAGDA näitajatest

Näitajad*	Iga päev	Vaheproov (kulleste proov)	Katse lõpetamisel (noorkonnade proov)
Suremus ja kõrvalekalded	X		
NFi järgi 62. staadiumisse jõudmiseks kulunud aeg		X	
Histo(pato)loogia (kilpnääre)		X	
Morfoloogia (kehamassi ja pikkuse juurdekasv)		X	X
Maksa somaatiline indeks (LSI)			X
Geneetiline/fenotüübiline sooline jaotumine			X
Histopatoloogia (sugunäärmed, sugujuhad, neerud ja maks)			X
Vitellogeniin (VTG) (valikuline)			X

* Kõiki näitajaid analüüsitakse statistiliselt.

Suremus ja igapäevased vaatlused

38. Kõiki katsenõusid tuleb iga päev kontrollida surnud loomade suhtes ja iga nõu puhul tuvastatud suremus registreeritakse. Surnud loomad tuleks katsenõust eemaldada kohe, kui neid märgatakse. Surnud loomad liigitatakse arengustaadiumi põhjal (NFi järgi) järgmistesse rühmadesse: enne 58. staadiumit (esijäsemete moodustumist), 58.–62. staadium, 63.–66. staadium (62. staadiumi ja saba täieliku resorbeerumise vahel), pärast 66. staadiumit (kullesejärgne staadium). Suremuse määr üle 20 % võib osutada sobimatutele katsetingimustele või uuritava kemikaali selgele mürgisusele. Loomade suremine kemikaalist sõltumatutel põhjustel on kõige tõenäolisem esimestel arengupäevadel pärast kudemist ja moonde haripunkti ajal. Taolistel põhjustel tekkinud suremust võib olla võimalik tuvastada kontrollrühma andmete põhjal.
39. Lisaks tuleks registreerida igasugune täheldatud ebatavaline käitumine, selgelt nähtavad väärarendid (nt skolioos) ja haavandid. Vaadeldud skolioosijuhud tuleks loendada (esinemissagedus) ja neile tuleks määrata raskusaste (nt ebaoluline – NR, kerge – 1, mõõdukas – 2, raske – 3; 8. liide). Mõõduka ja raske skolioosi esinemist tuleks püüda kogu uuringu vältel piirata (nt et see jääks kontrollrühmades alla 10 %), kuigi ka kontrollrühmades esinev suurem esinemissagedus ei ole tingimata põhjus katse katkestamiseks. Normaalse käitumisega kullased hõljuvad veesambas, saba peast kõrgemal, sabauim peksleb korrapäraselt kindlas rütmis, nad tõusevad aeg-ajalt pinnale, nende lõpusekatted liiguvad ja nad reageerivad ärritajatele. Ebatavalise käitumise näideteks on pinnal hõljumine, nõu põhjas lebamine, kõht ülespidi või ebakorrapärane

ujumine, pinnale mittetõusmine ja ärritajatele mitte reageerimine. Pärast moonet tuleks lisaks eespool nimetatud ebatavalisele käitumisele registreerida ka töödeldavate rühmade vahel esinevad suured erinevused sööda tarbimises. Olulisteks väärarenditeks ja kahjustusteks võivad muu hulgas olla morfoloogilised kõrvalekalded (nt deformeerunud jäsemed), veritsevad haavandid, kõhuturse, bakteri- või seennakkused. Noorkonnade peas vahetult sõõrmete taga esinevad haavandid võivad osutada ebapiisavale niiskustasemele. Kõnealused otsustused on kvalitatiivsed ja neid tuleks võrdluses kontrollrühma loomadega käsitada kui haiguse või stressi kliinilisi tunnuseid. Kui selliste tunnuste esinemissagedus on kokkupuutenõudes suurem kui kontrollnõudes, tuleks neid käsitada selge mürgisuse tunnustena.

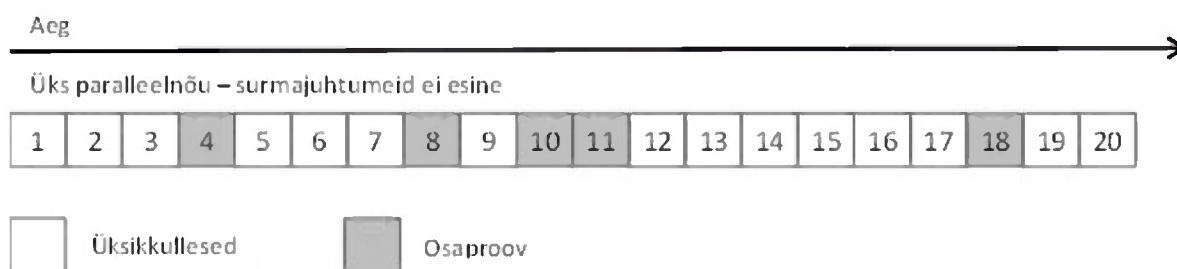
Kulleste osaproov

Kulleste osaproovi kirjeldus

40. NFi järgi 62. staadiumisse jõudnud kullest tuleks nõudest eemaldada ning kasutada neid proovi võtmiseks või viia nad kokkupuutekatse järgmiseks etapiks üle uude nõusse või eraldada nad vaheseinaga teistest samasse nõusse jäävatest kullestest. Kulleseid kontrollitakse iga päev ning iga kullese puhul registreeritakse uuringupäev, mil see jõuab NFi järgi 62. staadiumisse. Kõnealune hinnang antakse eelkõige peakuju põhjal. Isend tunnistatakse NFi järgi 62. staadiumisse jõudnuks siis, kui pea suurus on nii palju vähenenud, et selle laius on ligikaudu võrdne kullese kehatüve laiusega ja esijäsemed on kohakuti südame keskjoonega.
41. Eesmärk on võtta igast paralleelnõust prooviks viis NFi järgi 62. staadiumisse jõudnud kullest. Seda tuleks teha täiesti juhuslikult, aga juhusliku valiku numbrid peaksid olema eelnevalt otsustatud. **Joonisel 1** on esitatud paralleelnõu hüpoteetiline näidis. Kui nõus on elus kõik 20 kullest, tuleks selle nõu esimese isendi NFi järgi 62. staadiumisse jõudmise hetkel valida vahemikust 1–20 viis juhuslikku numbrit. Kulles nr 1 on isend, kes jõudis NFi järgi 62. staadiumisse esimesena, ja kulles nr 20 on isend, kes jõudis selles nõus 62. staadiumisse viimasena. Kui nõus on elus 18 kullest, siis valitakse viis juhuslikku numbrit sarnasel moel vahemikust 1–18. Seda tuleks teha iga paralleelnõu puhul siis, kui esimene kulles jõuab seal NFi järgi 62. staadiumisse. Kui NFi järgi 62. staadiumis olevatest kullestest proovide võtmise ajal esineb surmajuhtumeid, tuleb juhuslikku valikut korrata, lähtudes veel NFi järgi 62. staadiumi eelsesolekusse jäänud kulleste arvust ja nõu kohta viie proovini jõudmiseks vajalike võtmata proovide arvust. Päeval, kui mõni kulles jõuab NFi järgi 62. staadiumisse, vaadatakse varem koostatud proovivõtutabelist, kas see kulles tuleb võtta proovi või eraldada kokkupuutekatse jätkamiseks füüsiliselt ülejäänud kullestest. Esitatud näites (joonisel 1) tuleb esimene NFi järgi 62. staadiumisse jõudnud isend (lahter 1) ülejäänud kullestest füüsiliselt eraldada ja jätta kemikaaliga kokkupuutesse; ühtlasi tuleb registreerida uuringupäev, millal isend NFi järgi 62. staadiumisse jõudis. Järgnevaid isendeid nr 2 ja nr 3 koheldakse samuti nagu esimest, aga isend nr 4 (selle konkreetse näite puhul) võetakse proovi, et mõõta juurdekasvu ja

kilpnäärme histoloogiat. Sama toimingut korratakse kuni 20. isendi lisamiseni teistele NFi järgi 62. staadiumi järgses katseetapis olevatele isenditele või proovi võtmiseni. Kasutatav juhusliku valiku kord peab tagama igale katseorganismile ühesuguse tõenäosuse olla valitud. Selle saavutamiseks võib kasutada mis tahes juhusliku valiku meetodit, aga samas kehtib nõue, et iga kullas tuleb NFi järgi 62. staadiumi proovide võtmise perioodil mingil hetkel võrgu abil nõust välja tõsta.

Joonis 1. Hüpotetiline näide NFi järgi 62. staadiumi proovivõturežiimi kohta ühe paralleelnõu puhul.



42. Kulleste osaproovi võtmisel mõõdetakse järgmised näitajad: 1) NFi järgi 62. staadiumisse jõudmiseks kulunud aeg (st päevade arv viljastamisest 62. staadiumisse jõudmiseni), 2) välised väärarengud, 3) morfoloogilised näitajad (kehamass ja pikkus) ning 4) kilpnäärme histoloogia.

Kulleste humaanne surmamine

43. Osaproovi võetud NFi järgi 62. staadiumis olevate kulleste (viis isendit paralleelnõu kohta) surmamiseks tuleks nad asetada 30 minutiks vajalikus koguses (nt 500 ml) anesteetikumilahusesse (nt trikaiinmetaansulfonaadi (MS-222, CASi nr 886-86-2) 0,3 % lahus). MS-222 lahust tuleks puhverdada naatriumvesinikkarbonaadiga kuni pH ligikaudse väärtuseni 7,0, sest puhverdamata MS-222 lahus on happeline, ärritab konnade nahka ning põhjustab halba imendumist ja tarbetut lisastressi organismidele.
44. Kullese eemaldamiseks katsenõust ja surmamislahusesse asetamiseks kasutatakse sõelvõrku. Loom on nõuetekohaselt surmatud ja lahanguks valmis siis, kui ta ei reageeri välistele ärritajatele (nt tagajäseme pigistamisele pintsettidega).

Morfoloogilised näitajad (kehamass ja pikkus)

45. Iga kullese märgmassi (milligrammi täpsusega) ja pikkust ninamikust pärakuavani (0,1 mm täpsusega) tuleks mõõta kohe, kui kullas on anesteetikumi mõjul reaktsioonivõimetuks muutunud (joonis 2a). Pildianalüüsi tarkvara kasutades võib ninamiku ja pärakuava vahekaugust mõõta ka fotodelt. Liigse vee eemaldamiseks tuleks kulleled enne kaalumist kuivatuspaberiga kuivatada. Pärast kasvunäitajate (kehamass ning ninamiku ja pärakuava vahekaugus) mõõtmist tuleks registreerida (soovitavalt elektrooniliselt) või üles märkida tuvastatud suured morfoloogilised kõrvalekalded ja/või mürgisuse kliinilised tundemärgid,

näiteks skolioos (vt 8. liide), petehhia ja verejooksud. Petehhia avaldub nahkapillaaride punaste või lillade täppverevalumitena.

Koeproovide võtmine ja fikseerimine

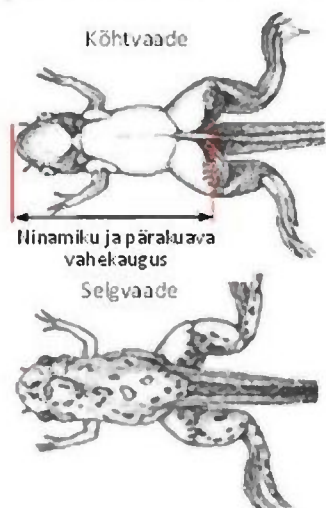
46. Kulleste osaproovi puhul kasutatakse histoloogiliseks analüüsiks kilpnääret. Alakeha lõigatakse esijäsemete tagant maha ja kõrvaldatakse. Lühendatud rümp fikseeritakse Davidsoni fikseerimislahuses. Fikseerimislahuse kogus nõus peaks olema vähemalt 10 korda suurem kui kudede ligikaudne ruumala. Fikseerimislahust tuleb huvi pakkuvate kudede nõuetekohaseks fikseerimiseks piisavalt loksutada või keerutada. Kõik koeproovid jäetakse Davidsoni fikseerimislahusesse vähemalt 48 tunniks, aga mitte rohkem kui 96 tunniks. Seejärel loputatakse neid deioniseeritud vees ja säilitatakse neutraalse puhvriga 10 % formaliini lahuses (1, 29).

Kilpnäärme histoloogia

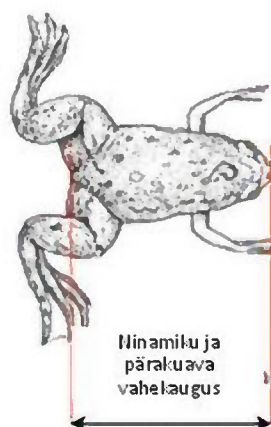
47. Kõigil kulleseproovidel tehakse (pärast kudede fikseerimist) kilpnäärme histoloogiline analüüs: diagnoos ja raskusastme määramine (29, 30).

Joonis 2. LAGDAs kasutatavad ninamiku ja pärakuava vahekauguse mõõtmise punktid NFi järgi 62. staadiumis (a) ja noorkonnadel (b). NFi järgi 62. staadiumi (a) iseloomulikud tunnused: pea laius on võrdne kehatüve laiusega, haistmisnärvi pikkus on väiksem kui haistmissibula läbimõõt (selgvaates) ja esijäsemed on südamega samal joonel (kõhtvaates). Piltide allikas: Nieuwkoop ja Faber (1994).

a. Kulleste osaproov (62. staadium NF järgi)



b. Noorkonnade proov



Kulleste kokkupuute lõpetamine

48. Kulleste algset arvu arvestades võib eeldada, et väike osa isenditest ei arene normaalselt ega lõpetata moonet (NFi järgi 66. staadium) mõistliku aja jooksul. Kullesestaadiumis kasutatav kokkupuuteaeg ei tohiks ületada 70 päeva. Kõik selle perioodi lõpuks alles jäänud kullesed tuleks surmata (vt punkt 43) ning seejärel mõõta nende märgmass ning

ninamiku ja pärakuava vahekaugus, kindlaks teha nende arengustaadium Nieuwkoop ja Faberi (1994) järgi ning märkida üles nende väärarengud.

Praakimine NFi järgi 66. staadiumi järel

49. Alates NFi järgi 66. staadiumist (saba täielik resorbeerumine) tuleks kokkupuutekatse lõpuni alles jätta kümme isendit nõu kohta. Seega tuleks praakimine läbi viia siis, kui kõik loomad on jõudnud NFi järgi 66. staadiumisse, või 70 päeva möödumisel (olenevalt sellest, kumb on varasem). NFi järgi 66. staadiumi järel kokkupuutekastest eemaldatavad loomad valitakse juhuslikult.
50. Loomad, kellega kokkupuutekatset ei jätkata, surmatakse (vt punkt 43). Igal loomal mõõdetakse arengustaadium, märgmass ning ninamiku ja pärakuava vahekaugus (joonis 2b), samuti tehakse üldine lahang. Fenotüübiliseks sooks (sugunäärme morfoloogia põhjal) märgitakse emane, isane või ebaselge.

Noorkonnade proov

Noorkonnade proovi kirjeldus

51. Alles jäänud loomad jäetakse kemikaaliga kokkupuutesse kümnenda nädalani pärast lahjendusvee (ja/või vajadusel lahusti) kontrollrühmas NFi järgi 62. staadiumi saabumise mediaanaega. Kokkupuuteperioodi lõpuks alles jäänud loomad (kuni 10 konna paralleelnõu kohta) surmatakse, nende erinevaid näitajaid mõõdetakse või hinnatakse ning need registreeritakse: 1) morfoloogilised näitajad (kehamass ja pikkus), 2) fenotüübiline/genotüübiline sooline jaotumine, 3) maksa mass (maksa somaatilise indeks), 4) histopatoloogia (sugunäärmed, sugujuhad, maks ja neerud) ning valikuliselt 5) plasma VTG-sisaldus.

Konnade humaanne surmamine

52. Moonde läbinud noorkonnad surmatakse anesteetikumi (nt sobiva fosfaadipuhvriga 10 % MS-222 lahus) süstimisega kõhuõõnde. Konnadelt proovide võtmist võib alustada pärast seda, kui nad ei reageeri enam ärritajatele (tavaliselt umbes kaks minutit pärast süsti, kui kasutatakse 10 % MS-222 lahust annuses 0,01 ml konna kehamassi grammi kohta). Kuigi noorkonnad võib panna ka suurema kontsentratsiooniga anesteetikumilahusesse (MS-222), on kogemused näidanud, et selle meetodi korral kulub nende tuimastamiseks rohkem aega ja see võib proovide võtmist raskendada. Süst tagab tõhusa ja kiire surmamise enne proovide võtmist. Proovide võtmist ei tohiks alustada enne, kui konnade reaktsioonivõime kadumist on kontrollitud veendumaks, et loomad on surnud. Kui konnadel ilmneb märkimisväärsede kannatuste tunnuseid (mis on väga raskekujulised ja konnade surm on usaldusväärselt prognoositav) ja nad on surmaeelses seisundis, tuleks nad tuimastada ja surmata ning arvestada nende andmetega suremuse analüüsimisel. Haigestunud konnade surmamise juhud tuleb üles märkida ja neid katseprotokollis kajastada. Olenevalt sellest,

millisel uuringuetapil konn surmatakse, võidakse konna säilitada histopatoloogiliseks analüüsiks (konnade fikseerimine võimalikuks histopatoloogia uuringuks).

Morfoloogilised näitajad (kehamass ja pikkus)

53. Märkmassi ning ninamiku ja pärakuava vahekaugust (joonis 2b) mõõdetakse samuti nagu kulleste osaproovi puhul.

Plasma VTG -sisaldus (valikuline)

54. VTG on laialdaselt kasutatav biomarker, mis näitab kokkupuudet östrogeensete kemikaalidega. LAGDA puhul võib plasma VTG-sisaldust soovi korral mõõta noorkonnade proovides (eelkõige võib see olla vajalik juhul, kui uuritav kemikaal võib olla östrogeen).
55. Surmatud noorkonna tagajäsemed lõigatakse maha ja vereproov võetakse hepariniseeritud kapillaartoruga (aga sobida võib ka mõni muu vereproovi võtmise meetod, nt südame punktsioon). Veri lastakse mikrotsentrifuugianumase (nt mahuga 1,5 ml) ja seda tsentrifuugitakse plasma eraldamiseks. Plasmaproove tuleks hoida -70°C juures või sellest madalamal temperatuuril kuni VTG määramiseni. VTG kontsentratsiooni plasmas saab mõõta ensüümimmunosorptsioonanalüüsi (ELISA) meetodiga (6. liide) või mõne muu meetodi, näiteks massispektromeetria abil (31). Suurema tundlikkuse tõttu eelistatakse liigispetsiifiliste antikehade kasutamist.

Geneetilise soo määramine

56. Iga noorkonna geneetilist sugu hinnatakse Yoshimoto *et al.* (11) välja töötatud markerite põhjal. Geneetilise soo määramiseks eemaldatakse lahkamise ajal osaliselt (või tervikuna) üks tagajäse (või muu kude), mida säilitatakse mikrotsentrifuugianumas (konnade koeproove võib võtta mis tahes koest). Koeproove hoitakse -20°C juures või sellest madalamal temperatuuril kuni desoksüribonukleiinhappe (DNA) eraldamiseni. Koest DNA eraldamiseks võib kasutada müügilolevaid komplekte ning markeri esinemise või puudumise analüüsiks kasutatakse polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) meetodit (5. liide). Üldjuhul on histoloogilise ja genotüübilise soo kokkulangevus kontrollrühmade noorkonnade seas proovi võtmise hetkel üle 95 %.

Koeproovide võtmine ja fikseerimine histopatoloogilise analüüsi jaoks

57. Viimase proovivõtu ajal võetakse loomadelt histoloogilise analüüsi tegemiseks sugunäärmed, sugujuhad, neerud ja maksad. Kõhuõõs avatakse ning maks lõigatakse välja ja kaalutakse. Järgmiseks eemaldatakse alakõhust ettevaatlikult seedeorganid (nt magu, sooled), et paljastada sugunäärmed, neerud ja sugujuhad. Sugunäärmetel leitud suured morfoloogilised kõrvalekalded tuleb üles märkida. Lõpuks tuleb eemaldada tagajäsemed, kui neid ei ole vereproovi võtmiseks juba varem eemaldatud. Eemaldatud maksad ja *in situ* jäetud sugunäärmetega rümp tuleb kohe asetada Davidsoni fikseerimislahusesse. Fikseerimislahuse kogus nõus peaks olema vähemalt 10 korda suurem kui kudede

ligikaudne ruumala. Kõik koeproovid jäetakse Davisdoni fikseerimislahusesse vähemalt 48 tunniks, aga mitte rohkem kui 96 tunniks. Seejärel loputatakse neid deioniseeritud vees ja säilitatakse neutraalse puhvriga 10 % formaliini lahuses (1, 29).

Histopatoloogiline analüüs

58. Kõiki noorkonnadelt võetud proove analüüsitakse histoloogiliselt, et leida sugunäärmete, sugujuhade, neerude ja maksakoe patoloogiaid, panna diagnoos ja määrata raskusaste (32). Hindamise käigus selgitatakse välja ka sugunäärmete (nt munajuhad, munandid, intersoolised organid) fenotüüp ning neid vaatlusandmeid saab koos isendi geneetilise soo mõõtmise andmetega kasutada fenotüübilise/genotüübilise soolise jaotumise arvutamiseks.

ANDMETE ESITAMINE

Statistiline analüüs

59. LAGDAga saadakse kolme liiki andmeid, mida tuleb statistiliselt analüüsida: 1) kvantitatiivsed pidevandmed (kehamass, ninamiku ja pärakuava vahekaugus, maksa somaatiline indeks, VTG), 2) arengu kiirust näitavad sündmuseni kulunud aja andmed (päevade arv katse algusest kuni NFi järgi 62. staadiumini) ning 3) järjestusandmed, mis esitatakse histopatoloogilise analüüsi põhjal raskusastme või arengustaadiumi kujul.
60. Katseplaan ja valitud statistilised testid peaksid soovitatavalt tagama piisava statistilise võimsuse, et tuvastada näitajate bioloogiliselt olulisi muutusi katses, mille puhul tuleb esitada täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) või toimet avaldav kontsentratsioon (ECx). Andmete statistiline analüüs (üldjuhul paralleelproovide keskvaartuste põhjal) peaks eelistatavalt toimuma vastavalt meetoditele, mida on kirjeldatud OECD koostatud juhendis ökotoksilisuse andmete statistilise analüüsi kaasaegsete meetodite rakendamise kohta (33). Käesoleva katsemeetodi 7. liites on esitatud soovitatav otsustusskeem statistilise analüüsimeetodi leidmiseks ja juhised andmete töötlemiseks ning LAGDA puhul sobivaima statistilise testi või mudeli valimiseks.
61. Kuna genotüübiline sugu tehakse kindlaks kõikide konnade puhul, tuleks noorkonnade proovi andmeid (nt kasv, maksa somaatiline indeks) analüüsida mõlema genotüübilise soo kohta eraldi.

Andmete analüüsiga seotud kaalutlused

Rikutud paralleelproovide ja töödeldud rühmade kasutamine

62. Paralleelproove ja töödeldud rühmasid võib rikkuda selgest mürgisusest, haigusest või tehnilisest veast tingitud liiga kõrge suremus. Kui mõni töödeldud rühm on haiguse või tehnilise vea tagajärjel rikutud, peaks analüüsiks alles jääma kolm rikkumata töödeldud rühma, milles on kolm rikkumata paralleelproovi. Kui suure kontsentratsiooniga töödeldavates rühmades esineb selge mürgisus, oleks analüüsiks eelistatavalt vaja vähemalt

kolme eri kontsentratsioonidega töödeldavat rühma, milles on kolm rikkumata paralleelproovi (vastavalt OECD katsejuhendites esitatud maksimaalse talutava kontsentratsiooni põhimõttele (34)). Lisaks suremusele võib selge mürgisuse tunnuseks olla ka teatav käitumine (nt pinnal hõljumine, nõu põhjas lebamine, ümberpööratud asendis või ebakorrapärane ujumine), morfoloogiline kahjustus (nt veritsev haavand, kõhuturse) või normaalse toitumise pärsitus, mis ilmneb kvalitatiivses võrdluses kontrollrühma loomadega.

Lahusti kontrollrühm

63. Katse lõpetamisel tuleb hinnata lahusti (kui seda kasutatakse) võimalikku mõju. Seda tehakse lahusti kontrollrühma ja lahjendusvee kontrollrühma statistilise võrdlemisega. Kõnealuses analüüsis vaadeldavad kõige olulisemad näitajad on seotud kasvuga (kehamass ja pikkus), kuna neid võib mõjutada üldine mürgisus. Kui nende näitajate puhul tuvastatakse lahjendusvee kontrollrühma ja lahusti kontrollrühma vahel statistiliselt olulisi erinevusi, tuleb parimatest erialateadmistest lähtudes hinnata, kas see ohustab katse nõuetekohasust. Kui kahe kontrollrühma näitajad erinevad, tuleks kemikaaliga kokku puutunud rühmi võrrelda lahusti kontrollrühmaga, välja arvatud juhul, kui on teada, et eelistada tuleb võrdlust lahjendusvee kontrollrühmaga. Kui kahe kontrollrühma vahel statistiliselt olulisi erinevusi ei ole, soovitatakse võrrelda uuritava kemikaaliga kokku puutunud rühmi mõlema kontrollrühma (lahusti ja lahjendusvesi) koondatud näitajatega, välja arvatud juhul, kui on teada, et eelistada tuleb võrdlust ainult lahjendusvee või ainult lahusti kontrollrühmaga.

Katseprotokoll

64. Katseprotokoll peaks sisaldama järgmist teavet.

Uuritav kemikaal:

- füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused;
- Ühest koostisosast koosnev aine –
 - füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased andmed füüsikalis-keemiliste omaduste kohta;
 - kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne, sealhulgas vajaduse korral orgaanilise süsiniku sisaldus;
- Mitmest koostisosast koosnev aine, tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal või segu:

võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohaseid füüsikalis-keemilisi omadusi käsitlevatest andmetest.

Katsealune liik:

- teaduslik nimetus, liin (kui on), päritolu ning viljastatud munade kogumise ja järgneva käitlemise meetod;
- skolioosi esinemissagedus kasutatud kasvandusloomade varasemates kontrollrühmades.

Katsetingimused:

- valgustusperiood(id);
- katseplaan (nt nõude suurus, materjal ja veesisaldus, katsenõude ja paralleelnõude arv, katsealuste organismide arv paralleelnõu kohta);
- põhilahuste valmistamise meetod ja uuendamise sagedus (lahusti kasutamise korral tuleks esitada selle nimetus ja kontsentratsioon);
- uuritava kemikaali annustamismeetod (nt pump, lahjendussüsteem);
- meetodiga saavutatav tuvastamise tõhusus ja uuritavad nimikontsentratsioonid, määramispiir, katsenõudes mõõdetud väärtuste keskmised ja standardhälbed ja nende arvutamise meetod ning tõendid selle kohta, et mõõtmistulemused kajastavad uuritava kemikaali kontsentratsiooni tõelises lahuses;
- lahjendusvee omadused: pH, karedus, temperatuur, lahustunud hapniku kontsentratsioon, jääk-kloori sisaldus (kui on mõõdetud), joodi üldsisaldus, orgaanilise süsiniku üldsisaldus (kui on mõõdetud), hõljuvaine sisaldus (kui on mõõdetud), katselahuse soolsus (kui on mõõdetud) ja kõik muud mõõdetud näitajad;
- uuritavad nimikontsentratsioonid, mõõdetud väärtuste keskmised ja nende standardhälbed;
- vee kvaliteet katsenõudes: pH, temperatuur (iga päev) ja lahustunud hapniku kontsentratsioon;
- üksikasjalik teave söötmise kohta (nt sööda liik, päritolu, lisatud kogus ja söötmissagedus).

Tulemused:

- tõendid selle kohta, et nõuetekohasuse kriteeriumid on kontrollrühmades täidetud;
- järgmised andmed kontrollrühma (ja lahusti kasutamise korral lahusti kontrollrühma) ja töödeldud rühmade kohta: suremus ja täheldatud kõrvalekalded, NFi järgi 62. staadiumisse jõudmiseks kulunud aeg, kilpnäärme histoloogia (ainult kulleste proovis), kasv (kehamass ja pikkus), maksa somaatiline indeks (ainult noorkonnade proovis), geneetiline/fenotüübiline sooline jaotumine (ainult noorkonnade proovis), sugunäärmete,

sugujuhade, neerude ja maksa histopatoloogilise analüüsi tulemused (ainult noorkonnade proovis) ja plasma VTG-sisaldus (ainult noorkonnade proovis, kui on mõõdetud);

- statistilise analüüsi ja andmetöötluse meetod (kasutatud statistiline test või mudel);
- täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) iga hinnatud näitaja puhul;
- vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC) iga hinnatud näitaja puhul (tasemel $\alpha = 0,05$); vajaduse korral EC_x iga hinnatud näitaja puhul koos usaldusvahemikuga (nt usaldusnivool 95 %) ja selle arvutamiseks kasutatud lähendatud mudeli graafik, kontsentratsiooni-vastuse kõvera tõus, regressioonimudeli võrrand ning mudeli hinnangulised parameetrid ja nende standardviga;
- kõik kõrvalekalded katsemeetodist ja nõuetekohasuse kriteeriumidest ning nende võimalik mõju katse tulemustele.

65. Näitajate mõõtmistulemuste kohta tuleb esitada keskväärtused ja nende standardhälbed (võimaluse korral nii paralleelrühmade kui ka kontsentratsioonide lõikes).

66. Kontrollrühmades NF_i järgi 62. staadiumisse jõudmiseks kulunud aeg tuleks arvutada paralleelnõude mediaanväärtuste keskväärtusena ja esitada koos standardhällbega. Sarnaselt tuleks töödeldud rühmade puhul arvutada töödeldud rühma mediaanväärtus, mis esitatakse paralleelnõude mediaanväärtuste keskväärtusena koos standardhällbega.

KIRJANDUS

- (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*, nr 150, Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (3) Nieuwkoop, P.D. ja Faber, J. (1994), *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin)*, Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.
- (4) Kloas, W. ja Lutz, I. (2006), „Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters“, *Journal of Chromatography*, A 1130, lk 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*, nr 93, lk 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*, nr 237, lk 1565.
- (7) Villalpando, I. ja Merchant-Larios, H. (1990), „Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles“, *International Journal of Developmental Biology*, nr 34, lk 281–285.
- (8) Miyata, S., Koike, S. ja Kubo, T. (1999), „Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*“, *Zoological Science*, nr 16, lk 335–340.
- (9) Mikamo, K. ja Witschi, E. (1963), „Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes“, *Genetics*, nr 48, lk 1411.
- (10) Olmstead, A.W., Kosian, P.A., Korte, J.J., Holcombe, G.W., Woodis, K. ja Degitz, S.J. (2009)a, „Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor“, *Aquatic Toxicology*, nr 91, lk 143–150.
- (11) Yoshimoto, S., Okada, E., Umemoto, H., Tamura, K., Uno, Y., Nishida-Umehara, C., Matsuda, Y., Takamatsu, N., Shiba, T. ja 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*, nr 105, lk 2469–2474.

- (12) Olmstead, A.W., Korte, J.J., Woodis, K.K., Bennett, B.A., Ostazeski, S. ja Degitz, S.J. (2009)b, „Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*“, *General and Comparative Endocrinology*, nr 160, lk 117–123.
- (13) Tobias, M.L., Tomasson, J. ja Kelley, D.B. (1998), „Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*“, *Journal of Neurobiology*, nr 37, lk 441–448.
- (14) Qin, Z.F., Qin, X.F., Yang, L., Li, H.T., Zhao, X.R. ja Xu, X.B. (2007), „Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*“, *Aquatic Toxicology*, nr 84, lk 321–327.
- (15) Porter, K.L., Olmstead, A.W., Kumsher, D.M., Dennis, W.E., Sprando, R.L., Holcombe, G.W., Korte, J.J., Lindberg-Livingston, A. ja Degitz, S.J. (2011), „Effects of 4-Tert-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure“, *Aquatic Toxicology*, nr 103, lk 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) Käesoleva lisa peatükk C.4 „Kohese biolagunduvuse määramine“.
- (18) Käesoleva lisa peatükk C.29 „Kiire biolagundatavus – CO₂ suletud nõudes (vabaruumi katse)“.
- (19) Kahl, M.D., Russom, C.L., DeFoe, D.L. ja Hammermeister, D.E. (1999), „Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays“, *Chemosphere* nr 39, lk 539–551.
- (20) Adolfsson-Erici, M., Åkerman, G., Jahnke, A., Mayer, P., McLachlan, M.S. (2012), „A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests“, *Chemosphere*, nr 86(6), lk 593–599.
- (21) OECD (2000), „Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures“, *Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment*, nr 23. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (22) Hutchinson, T.H., Shillabeer, N., Winter, M.J. ja Pickford, D.B. (2006), „Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review“ (ülevaade), *Aquatic Toxicology*, nr 76, lk 69–92.

- (23) ASTM (2004), „Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX)“, ASTM E1439-98, Philadelphia, PA, USA.
- (24) Read, B.T. (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, Ühendkuningriik, 84 lk.
- (25) Käesoleva lisa peatükk C.38 „Kahepaiksete metamorfoosi katse“.
- (26) Käesoleva lisa peatükk C.48 „Lühiajaline kalade paljunemise katse“.
- (27) Käesoleva lisa peatükk C.41 „Kalade sugulise arengu katse“.
- (28) Käesoleva lisa peatükk C.49 „Ägeda mürgisuse katse kalaembrüotega“.
- (29) OECD (2007), „Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology“, *Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment*, nr 82, Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (30) Grim, K.C., Wolfe, M., Braunbeck, T., Iguchi, T., Ohta, Y., Tooi, O., Touart, L., Wolf, D.C. ja Tietge, J. (2009), „Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances“, *Toxicological Pathology*, nr 37, lk 415–424.
- (31) Luna, L.G. ja Coady, K.(2014), „Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry“, *Analytical and Bioanalytical Techniques*, nr 5(3), lk 194.
- (32) OECD (2015), „Guidance on histopathology techniques and evaluation“, *Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment*, nr 228, Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (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*, nr 54, Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (34) Hutchinson, T.H., Bögi, C., Winter, M.J. ja Owens, J.W. (2009), „Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology“, *Aquatic Toxicology*, nr 91(3), lk 197–202.

1. liide

MÕISTED

Lõppnäitaja: näitaja, mis iseloomustab mõju populatsiooni tasandil.

Kemikaal: aine või segu.

ELISA: ensüümimmunosorptsioonanalüüs.

EC_x (kontsentratsioon, mille puhul mõju ulatus on x %): kontsentratsioon, mille juures teatava kokkupuuteperioodi vältel on katseorganismidele avalduva mõju ulatus x % kontrollrühma asjaomase näitaja väärtusest. Näiteks EC₅₀ on kontsentratsioon, mille puhul kindlaksmääratud kokkupuuteperioodi vältel avaldub kemikaali mõju katses uuritavale näitajale 50 protsendil kemikaaliga kokku puutuvast populatsioonist.

d_{pf}: päeva pärast viljastamist.

Läbivoolukatse: katse, mille puhul katselahused voolavad kokkupuuteperioodi vältel pidevalt läbi katsesüsteemi.

HAS-telg: hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete telg.

IUPAC: Rahvusvaheline Puhta Keemia ja Rakenduskeemia Liit (International Union of Pure and Applied Chemistry).

Vähim täheldatud toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC): uuritava kemikaali väikseim uuritav kontsentratsioon, mille puhul täheldatakse kemikaali statistiliselt olulist ($p < 0,05$) mõju võrdluses kontrollprooviga. Kemikaal peaks kõigi LOEC-st suuremate kontsentratsioonide juures avaldama vähemalt sama tugevat kahjulikku mõju kui LOEC juures. Kui nimetatud kahte tingimust ei ole võimalik täita, tuleks lisada ammendav selgitus, kuidas LOEC (ja sellest lähtuvalt ka NOEC) on valitud. Sellekohased juhised on esitatud 7. liites.

Letaalne mediaankontsentratsioon (LC₅₀): uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures kemikaal on katse vältel hinnanguliselt letaalne 50 %-le katseorganismidest.

Täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC): uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures ei täheldata kindlaksmääratud kokkupuuteperioodi jooksul kontrolliga võrreldes statistiliselt olulist ($p < 0,05$) toimet ja mis on LOEC-st vahetult madalam.

SMILES: lihtsustatud molekulaarse sisendrea sisestamissüsteem (Simplified Molecular Input Line Entry Specification).

Uuritav kemikaal: iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

UVCB: tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

VTG: vitellogeniin on fosfolipoglükoproteiin, mis on munarebu valkude eelkäija ja mida tavaliselt leidub kõikide ovipaarsete liikide seksuaalselt aktiivsetes emasloomades.

Liide 2

MÕNED NÕUETEKOHASE LAHJENDUSVEE KEEMILISED OMADUSED

Koostisosa	Kontsentratsiooni piirnorm
Tahked osakesed	5 mg/l
Orgaanilise süsiniku üldsisaldus	2 mg/l
Ioniseerimata ammoniaak	1 µg/l
Jääk-kloor	10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus	50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide summaarne üldsisaldus	50 ng/l
Orgaanilise kloori üldsisaldus	25 ng/l
Alumiinium	1 µg/l
Arseen	1 µg/l
Kroom	1 µg/l
Koobalt	1 µg/l
Vask	1 µg/l
Raud	1 µg/l
Plii	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Tsink	1 µg/l
Kaadmium	100 ng/l
Elavhõbe	100 ng/l
Hõbe	100 ng/l

3. liide

LAGDA KATSETINGIMUSED

1. Katseliik	<i>Xenopus laevis</i>
2. Katse tüüp	Pideva läbivooluga katse
3. Vee temperatuur	Nimitemperatuur on 21 °C. Keskmine temperatuur kogu katse vältel 21 ± 1 °C (temperatuuride erinevus paralleelproovide ja töödeldavate rühmade vahel ei tohiks ületada 1,0 °C).
4. Valgustuse kvaliteet	Luminofoorlambid (laia spektriga), valgustihedus vee pinnal 600–2 000 lx (lm/m ²)
5. Valgustusperiood	12 tundi valgust, 12 tundi pimedust
6. Uuritava lahuse ruumala ja katsenõu	4–10 l (vee sügavus vähemalt 10–15 cm) Klaasist või roostevabast terasest nõu
7. Uuritavate lahuste uuendamine kogu ruumala ulatuses	Konstantne, nii et säiliks nii bioloogilised tingimused kui ka kemikaaliga kokkupuude (nt lahuse uuendamine kogu ruumala ulatuses viis korda päevas).
8. Katseorganismide vanus katse alguses	Nieuwkoop ja Faberi (NF) järgi 8.–10. staadium
9. Organismide arv paralleelnõu kohta	Kokkupuute alguses 20 looma (embrüot) paralleelnõu kohta ja alates NF järgi 66. staadiumist kuni kokkupuute lõpetamiseni 10 looma (noorkonna) paralleelnõu kohta
10. Töödeldavate rühmade arv	Vähemalt neli uuritava kemikaaliga töödeldavat rühma ja vajalikud kontrollrühmad
11. Paralleelnõude arv töödeldavate rühma kohta	Neli paralleelnõud uuritava kemikaali ühe kontsentratsiooniga töödeldava rühma kohta ja kaheksa paralleelnõud kontrollrühma kohta
12. Organismide arv uuritava kontsentratsiooni kohta	Vähemalt 80 looma uuritava kemikaali ühe kontsentratsiooniga töödeldava rühma kohta ja vähemalt 160 paralleelset looma kontrollrühma kohta
13. Lahjendusvesi	<i>X. laevis</i> 'e normaalset kasvu ja arengut võimaldav vesi (nt allikavesi või aktiivsõega filtreeritud kraanivesi)
14. Aereerimine	Ei ole nõutav, kuid nõude aereerimine võib osutuda vajalikuks juhul, kui lahustunud hapniku sisaldus langeb alla soovitatavat piirtaset ja uuritava lahuse vooluhulka ei saa enam suurendada.
15. Lahustunud hapniku sisaldus uuritavas lahuses	Lahustunud hapnik: ≥ 40 % küllastuskontsentratsioonist õhus või $\geq 3,5$ mg/l

16. Uuritava lahuse pH	6,5–8,5 (erinevus paralleelproovide ja töödeldavate rühmade vahel ei tohiks ületada 0,5)
17. Katselahuse karedus ja leelisus	10–250 mg CaCO ₃ /l
18. Söötmisrežiim	(Vt 4. liide)
19. Kokkupuuteaeg	Alates NFi järgi 8.–10. staadiumist kümnenäädalani pärast vee ja/või lahusti kontrollrühmas NFi järgi 62. staadiumi saabumise mediaaniga (maksimaalselt 17 nädalat)
20. Bioloogilised näitajad	Suremus (ja välised kõrvalekalded), NFi järgi 62. staadiumisse jõudmiseks kulunud aeg (kulleste proovis), kilpnäärme histoloogia (kulleste proovis), kasv (kehamass ja pikkus), maksa somaatiline indeks (noorkonnade proovis), geneetiline/fenotüübiline sooline jaotumine (noorkonnade proovis), sugunäärmete, sugujuhade, neerude ja maksa histopatoloogilise analüüsi tulemused (noorkonnade proovis) ja plasma VTG-sisaldus (noorkonnade proovis, valikuline)
21. Katse nõuetekohasuse kriteeriumid	Lahustunud hapniku sisaldus peaks olema > 40 % küllastuskontsentratsioonist õhus; keskmine veetemperatuur peaks olema vahemikus 21 ± 1 °C ning temperatuuride erinevus paralleelproovide ja eri kontsentratsioonidega töödeldavate rühmade vahel peaks olema < 1,0 °C; uuritava lahuse pH peaks olema vahemikus 6,5–8,5; suremus kontrollrühma igas paralleelnõus peaks olema ≤ 20 % ja NFi järgi 62. staadiumisse jõudmise keskmine aeg kontrollrühmas peaks olema ≤ 45 päeva; katseorganismide keskmine mass NFi järgi 62. staadiumisse jõudmisel ja katse lõpetamisel peaks olema kontrollrühmades ja lahusti kontrollrühmades (kui neid kasutatakse) vastavalt 1,0 ± 0,2 g ja 11,5 ± 3 g; tuleks esitada tõendid selle kohta, et uuritava kemikaali kontsentratsiooni lahuses on suudetud hoida rahuldavalt vahemikus ± 20 % mõõdetud keskvärtusest.

4. liide

SÖÖTMISREŽIIM

Kuigi käesoleva söötmisrežiimi kasutamine on soovitatav, on lubatud ka muud variandid tingimusel, et katseorganismid kasvavad ja arenevad piisava kiirusega.

Kulleste söötmine

Kulleste sööda ettevalmistamine

- A. Forelli noorkalade sööt ja vetikad/TetraFin® (või samaväärne sööt) mahuvahekorras 1:1
1. Forelli noorkalade sööt: 50 g forelli noorkalade sööta (väikesed graanulid või pulber) segatakse blenderis suurel kiirusel 20 sekundi vältel 300 ml sobiva filtreeritud veega.
 2. Vetikate/TetraFin®-i (või samaväärse sööda) segu: 12 g spirulina vetika tablette segatakse blenderis suurel kiirusel 40 sekundi vältel 500 ml filtreeritud veega, 12 g Tetrafin®-i (või samaväärset sööta) segatakse 500 ml filtreeritud veega ning seejärel segud ühendatakse, et saada 1 l söödasegu, mis sisaldab 12 g/l spirulina vetikaid ja 12 g/l Tetrafin®-i (või samaväärset sööta).
 3. Forelli noorkalade sööda segu ja vetikate/TetraFin®-i (või samaväärse sööda) segu segatakse kokku võrdses mahuvahekorras.
- B. Soolavähivastsed:

15 ml soolavähimarjal lastakse kooruda 1 l soolvees (selle valmistamiseks lisatakse 1 l deioniseeritud veele 20 ml NaCl). Pärast 24 tundi toatemperatuuril pideva valguse käes aereerimist korjatakse soolavähivastsed. Aereerimine peatatakse 30 minutiks, et soolavähivastsed saaksid põhja sadestuda. Nõu pinnal ujuvad tsüstid valatakse ära ja kõrvaldatakse ning soolavähivaststes filtreeritakse sobivate filtritega ning neile lisatakse 30 ml filtreeritud vett.

Söötmisrežiim

Tabelis 1 esitatakse ülevaade kulleste kokkupuuteperioodil kasutatava sööda liigi ja koguse kohta. Loomi tuleks sööta esmaspäevast reedeni kolm korda päevas ja nädalavahetustel üks kord päevas.

Tabel 1. *X. laevis*'e kulleste söötmisrežiim läbivoolusüsteemis.

Aeg* (pärast viljastamist)	Forelli noorkalade sööt: vetikate/TetraFin®-i (või samaväärse sööda) segu		Soolavähivastsed	
	Tööpäeval (kolm korda päevas)	Nädalavahetusel (üks kord päevas)	Tööpäeval (kaks korda päevas)	Nädalavahetusel (üks kord päevas)
4.–14. päev (0–1. nädal)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (8.–15. päev)	0,5 ml (8.–15. päev)

2. nädal	0,67 ml	2,4 ml	1 ml (alates 16. päevast)	1 ml (alates 16. päevast)
3. nädal	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
4. nädal	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
5. nädal	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
6. nädal	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
7. nädal	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
8.–10. nädal	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

* Nullpäev on hCG süstimise päev.

Sööda muutmine üleminekul kullest noorkonna staadiumisse

Pärast kulleste moonet hakatakse neid toitma noorkonnadele ette nähtud söödaseguga, mida on kirjeldatud allpool. Üleminekuperioodil tuleks kulleste söödasegu kogust järk-järgult vähendada ja noorkonnade sööda kogust suurendada. Selleks võib kullsesööda kogust proportsionaalselt vähendada ja noorkonnasööda kogust proportsionaalselt suurendada, võttes aluseks viieliikmelised kullerühmad vastavalt sellele, kuidas nad läbivad NFi järgi 62. staadiumi ja lähenevad NFi järgi 66. staadiumis moonde lõpule.

Noorkonnade söötmine

Noorkonnade sööt

Kui moone on lõppenud (66. staadium) tuleks söötmisrežiimis täielikult üle minna 3/32-tollisele kvaliteetsele uppuvale konnasöödale (nt Xenopus ExpressTM, FL, Ameerika Ühendriigid, või samaväärne sööt).

Graanulite peenestamine kullese noorkonnaks arenemise etapil

Uppuva konnasööda graanuleid jahvatatakse põgusalt kohviveskis, blenderis või peenestatakse uhmris, et vähendada nende suurust ligikaudu 1/3 võrra. Liiga pikalt töötlemine muudaks graanulid pulbriks ja seda ei soovitata.

Söötmisrežiim

Tabelis 2 esitatakse ülevaade noorkonna ja täiskasvanud konna staadiumis kasutatava sööda liigi ja koguse kohta. Loomi tuleks sööta kord päevas. Oluline on märkida, et moondeperioodil jätkatakse loomade söötmist soolavähivastsetega seni, kuni > 95 % loomadest on moonde läbinud.

Loomi ei tohiks sööta katse lõpetamise päeval, et sööt ei moonutaks kehamassi mõõtmise tulemusi.

Tabel 2. *X. laevis*'e noorkonnade söötmisrežiim läbivoolusüsteemis. Tuleb arvestada, et moonde-eelses

staadiumis loomad (k.a need, kelle moone kemikaaliga töötlemise tõttu hilineb) ei suuda süüa peenestamata graanuleid.

Aeg (nädalat pärast moonde mediaanpäeva)	Peenestatud graanulite kogus (mg noorkonna kohta)	Tervete graanulite kogus (mg noorkonna kohta)
Vastavalt moonde läbinud loomade arvule	25	0
0–1. nädal	25	28
2.–3. nädal	0	110
4.–5. nädal	0	165
6.–9. nädal	0	220

* Nullnädala esimene päev on kontrollrühma loomade moonde mediaanpäev.

5. liide

GENEETILISE SOO MÄÄRAMINE

Xenopus laevis'e puhul kasutatav geneetilise soo määramise meetod põhineb Yoshimoto *et al.* (2008) esitatud kirjeldusel. Genotüübi määramise meetodika üksikasju saab vajaduse korral lugeda viidatud publikatsioonist. Kasutada võib ka muid sobivaks tunnistatud meetodeid (nt kõrge läbilaskevõimega qPCR).

X. laevis'e praimerid

DM-W marker

Otsepraimer: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Pöördpraimer: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Positiivne kontroll

Otsepraimer: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Pöördpraimer: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

DNA puhastamine

DNA puhastamiseks lihas- või nahakoest kasutatakse näiteks verele ja kudedele ette nähtud Qiagen DNeasy komplekti (kat nr 69506) või muud sarnast toodet vastavalt selle kasutusjuhendile. DNA voolutamisel segamiskolonnist võib kasutada vähem puhvrit, et saada suurema kontsentratsiooniga proove, kui seda peetakse PCRI jaoks vajalikuks. Pange tähele, et DNA on küllaltki püsiv ja seetõttu tuleks rakendada meetmeid, et vältida ristsaastumist, mis võib põhjustada isaste ekslikku emaseks pidamist või vastupidi.

PCR

Tabelis 1 on esitatud ülevaade analüüsimetoodikast, milles kasutatakse Sigma toodetud ensüümi JumpStartTM Taq.

Tabel 1. Sigma toodetud ensüümil JumpStartTM Taq põhinev analüüsimetoodika

Põhisegu	1x (µl)	[Lõplik]
NFW	11	-
10x puhver	2,0	-
MgCl ₂ (25 mM)	2,0	2,5 mM

dNTP-d (igaüks 10 mM)	0,4	200 µM
Praimeri marker (8 µM)	0,8	0,3 µM
Pöördpraimeri marker (8 µM)	0,8	0,3 µM
Praimeri kontroll (8 µM)	0,8	0,3 µM
Pöördpraimeri kontroll (8 µM)	0,8	0,3 µM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 ühikut/µl
DNA matriits	1,0	~200 pg/µl

Märkus. Põhisegu tuleks valmistada varuga, et kompenseerida pipeti kasutamisel tekkivaid kadusid (näide: 24 reaktsiooni jaoks 25-kordne kogus).

Reaktsioon:

Põhisegu 19,0 µl

Matriits 1,0 µl

Kokku 20,0 µl

Termotsükleri programm:

1. etapp 94 °C 1 min

2. etapp 94 °C 30 s

3. etapp 60 °C 30 s

4. etapp 72 °C 1 min

5. etapp Tagasi 2. etappi. 35 tsüklit

6. etapp 72 °C 1 min

7. etapp 4 °C hoida

Polümeraasi ahelreaktsiooni saadustega võib kohe teha analüüsi geelis või hoida neid 4 °C juures.

Elektrofoores agarosgeeliga (3 %) (analüüsimetoodika)

50X TAE

Tris 24,2 g

Jää-äädikhape 5,71 ml

Na₂ (EDTA)·2H₂O 3,72 g

Lisada vett mahuni 100 ml

1X TAE

H₂O 392 ml

50X TAE 8 ml

3 : 1 agaros

3 osa NuSieve™ GTG™ agarosi

1 osa madala elektroendoosmoosiga Fisheri agarosi

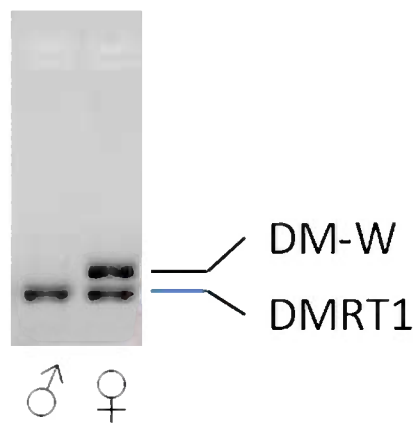
Meetod

1. Valmistada 3 % geel: 43 ml 1X TAE puhvrile lisada 1,2 g agarosisegu. Keerutada segu suurte klompide eemaldamiseks.
2. Kuumutada agarosisegu mikrolaineahjus kuni täieliku lahustumiseni (vältida ülekeemist). Lasta veidi jahtuda.
3. Lisada 1,0 µL etiidiumbromiidi (10 mg/ml). Keerutada kolbi. Etiidiumbromiid on mutageenne aine ning seetõttu tuleks kõnealusel etapil tehnilise võimaluse korral kasutada muid kemikaale, et vältida ohtu töötajate tervisele¹.
4. Valada geel kammi abil vormi. Lasta täielikult jahtuda.
5. Lisada geel seadmesse. Katta geel 1X TAE puhvriga.
6. Lisada igale 10 µl PCRi produktile 1 µl 6x laadimisvärvi.
7. Kanda proovid pipetiga süvenditesse.
8. Rakendada ~20 minuti jooksul ühtlast 160 V pinget.

Joonisel 1 on kujutatud agarosgeelipilti, millel on näha isas- ja emasisendite iseloomulikud ribamustrid.

Joonis 1. Agarosgeelipilt, millel on näha isase (♂) isendi ribamuster (üks riba ~203 bp: DMRT1) ja emase (♀) isendi ribamuster (kaks riba ~259 bp: DM-W ja 203 bp: DMRT1).

¹ Vastavalt Euroopa Parlamendi ja nõukogu 29. aprilli 2004. aasta direktiivi 2004/37/EÜ (töötajate kaitse kohta tööl kantserogeenide ja mutageenidega kokkupuutest tulenevate ohtude eest (kuues üksikdirektiiv nõukogu direktiivi 89/391/EMÜ artikli 16 lõike 1 tähenduses) (ELT L 158, 30.4.2004, lk 50)) artikli 4 lõikele 1.



KIRJANDUS

Yoshimoto, S., Okada, E., Umemoto, H., Tamura, K., Uno, Y., Nishida-Umehara, C., Matsuda, Y., Takamatsu, N., Shiba, T. ja 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*, nr 105, lk 2469–2474.

6. liide

VITELLOGENIINI MÕÕTMINE

Vitellogeniini (VTG) mõõdetakse ensüümimmuunsorptsioonanalüüsi (ELISA) meetodiga, mis töötati algselt välja lepamaimu VTG uurimiseks (Parks *et al.*, 1999). Praegu ei ole *X. laevis*'e analüüsi jaoks müügil antikehasid. Ent arvestades kõnealuse valgu kohta kättesaadavate andmete rohkust ja soodsate kaubanduslike antikehade valmistamise teenuste olemasolu, võib eeldada, et laboritel on lihtne välja töötada ELISA meetodika kõnealuse näitaja mõõtmiseks (Olmstead *et al.*, 2009). Olmstead *et al.* (2009) kirjeldavad ka analüüsimeetodit, mida on kohandatud *X. tropicalis*'e jaoks, nagu allpool näidatud. Meetodi kohaselt kasutatakse *X. tropicalis*'e VTG vastast antikeha, kuid teadaolevalt toimib see ka *X. laevis*'e VTG puhul. Kasutada võib ka mittekonkurentseid ELISA meetodeid, mille puhul alumine avastamiskiir võib olla madalam kui allpool kirjeldatud meetodiga.

Materjalid ja reaktiivid

- Eeladsorbeertud 1. antikeha seerum

Segada üks osa *X. tropicalis*'e VTG 1. antikeha seerumit kahe osa kontrollisase plasmaga ja jätta u 75 minutiks toatemperatuurile, panna 30 minutiks jääle, tsentrifuugida 4 °C juures ühe tunni jooksul kiirendusega $> 20K \times G$, eemaldada supernatant, võtta alikvoot, hoida temperatuuril -20 °C.

- 2. antikeha

Kitse anti-küüliku IgG-HRP konjugaat (nt Bio-Rad 172-1019)

- VTG etalon

Puhastatud *X. laevis*'e VTG kontsentratsiooniga 3,3 mg/ml

- TMB (3,3',5,5'-tetrametüülbensidiin) (nt KPL 50-76-00 või Sigma T0440)
- Kitse normaalseerum (NGS) (nt Chemicon® S26 – 100 ml)
- 96 süvendiga ensüümimmuunanalüüsiks kasutatavad polüstüreenist mikrotiiterplaadid (nt ICN 76-381-04, Costar 53590, Fisher 07-200-35)
- 37 °C hübridisatsiooniahvi (või kiiresti tasakaalustuv õhuinkubaator) plaatidele, vesivann katseklaasidele
- Muud tavapärased laboriseadmed, kemikaalid ja materjalid

Koostised

Kattepuhver (50 mM karbonaatpuhver, pH 9,6):

NaHCO₃ 1,26 g

Na₂CO₃ 0,68 g

vesi 428 ml

10X fosfaatpuhvri lisandiga soolalahus (PBS) (0,1 M fosfaati, 1,5 M NaCl):

NaH₂PO₄·H₂O 0,83 g

Na₂HPO₄·7 H₂O 20,1 g

NaCl 71 g

vesi 810 ml

Pesupuhver (PBST):

10X PBS 100 ml

vesi 900 ml

1 M HCl abil reguleerida pH väärtusele 7,3, seejärel lisada 0,5 ml Tween-20

Analüüsipuhver:

Kitse normaalseerum (NGS) 3,75 ml

Pesupuhver 146,25 ml

Proovide võtmine

Vereproov võetakse hepariniseeritud mikrohematokriti katseklaasiga ja asetatakse jääle. Pärast 3 minuti vältel tsentrifuugimist tehakse katseklaasile täke, see murtakse lahti ja plasma valatakse 0,6 ml mikrotsentrifuugianumatesse, mis sisaldavad 0,13 ühikut lüofiilitud aprotiniini. (Need anumad valmistatakse juba varem ette: neisse lisatakse vajalik kogus aprotiniini, mis külmutatakse ja lüofiilitakse vaakumkuivatis madalal kuumusel kuivamiseni.) Plasmat hoitakse kuni analüüsi tegemiseni temperatuuril –80 °C.

Plaadi puhul kasutatav meetoodika

Plaadi katmine

Segada 20 µl puhastatud VTGd 22 ml karbonaatpuhvriga (lõppkontsentratsioon 3 µg/ml). Lisada 200 µl kasutatava 96 süvendiga plaadi igasse süvendisse. Katta plaat kleepuva kattekilega ja panna 37 °C juures 2 tunniks (või 4 °C juures ööks) inkubeerima.

Plaadi blokeerimine

Blokeerimislahuse valmistamiseks lisatakse 38 ml karbonaatpuhvri 2 ml kitse normaalseerumit (NGS). Eemaldada kattelahus ja raputada kuivaks. Lisada igasse süvendisse 350 µl blokeerimislahust. Katta kleepuva kattekilega ja panna 37 °C juures 2 tunniks (või 4 °C juures ööks) inkubeerima.

Standardlahuste valmistamine

5,8 µl puhastatud VTG etalonainet segatakse borosilikaadist ühekordses 12 × 75 mm katseklaasis 1,5 ml analüüsipuhvriga. Nii saadakse kontsentratsioon 12 760 ng/ml. Seejärel tehakse lahjenduste seeria: selleks lisatakse iga kord 750 µl eelmise kontsentratsiooniga lahust 750 µl analüüsipuhvrile, et saada lõppkontsentratsioonid 12 760, 6380, 3190, 1595, 798, 399, 199, 100 ja 50 ng/ml.

Proovide ettevalmistamine

Alustuseks võtta plasmat, mis on analüüsipuhvris lahustatud vahekorras 1 : 300 (1 µl plasmat segatud 299 µl analüüsipuhvriga) või 1 : 30. Kui oletatakse, et VTG sisaldus on suur, võib kasutada täiendavaid või suuremaid lahjendusi. B/B₀ tuleks püüda hoida etalonainete vahemikus. Kui proovide eeldatav VTG sisaldus ei ole märkimisväärne, näiteks kontrollrühma (suguküpsemata) emaste ja isaste puhul, kasutatakse lahjendusvahekorda 1 : 30. Sellest väiksema lahjendusega proovidel võivad ilmned ebasoovitavad matriksefektid.

Lisaks soovitatakse igal plaadil analüüsida positiivset kontrollproovi. Selleks kasutatakse kõrge indutseeritud VTG sisaldusega plasmat. Plasma lahjendatakse algselt kitse normaalseerumis, jagatakse alikvootideks ja säilitatakse –80 °C juures. Iga plaadi jaoks sulatatakse üks alikvoot, mida lahjendatakse täiendavalt analüüsipuhvris ja mida töödeldakse samuti nagu uuritavat proovi.

1. antikehaga inkubeerimine

Esimese antikeha ettevalmistamiseks tehakse eeladsorbeeritud 1. antikeha seerumist analüüsipuhvris lahjendus vahekorras 1 : 2000 (nt 8 µl seerumit 16 ml analüüsipuhvri kohta). Segada 300 µl 1. antikeha lahust katseklaasis 300 µl proovi/standardlahusega. Sarnaselt valmistatakse 300 µl analüüsipuhvri ja 300 µl antikehalahusega ette katseklaas B₀. Lisaks tuleks ette valmistada mittespetsiifilise sideme (NSB) katseklaas, kuhu lisatakse üksnes 600 µl analüüsipuhvrit (ilma antikehadeta). Katseklaasid kaetakse Parafilm-kilega ja keerutatakse ettevaatlikult nende sisu segamiseks. Inkubeerida tund aega 37 °C veevannis.

Plaadi pesemine

Plaati tuleb pesta vahetult enne 1. antikehaga inkubeerimise lõppu. Selleks raputatakse plaat tühjaks ja patsutatakse kuivatuspaberiga kuivaks. Seejärel täidetakse süvendid 350 µl pesulahusega, valatakse tühjaks ja patsutatakse kuivaks. Selleks on hea kasutada mitme kanaliga pipetti või plaadipesurit. Pesemist korratakse veel kaks korda nii, et kokku tehakse kolm pesu.

Plaadi täitmine

Pärast plaadi pesemist eemaldada katseklaasid veevannist ja keerutada neid õrnalt. Lisada igast proovist, standardlahusest ning B₀- ja NSB-klaasist 200 µl plaadi kahte süvendisse. Katta plaat kleepuva kattekilega ja panna 37 °C juures üheks tunniks inkubeerima.

2. antikehaga inkubeerimine

Eelmise etapi inkubatsiooniosa lõpus tuleks plaati taas kolm korda pesta nagu enne. 2. antikehaga lahjenduse valmistamiseks segatakse 2,5 µl 2. antikeha seerumit 50 ml analüüsipuhvriga. Lisada igasse süvendisse 200 µl 2. antikeha lahjendust, katta kinni, nagu eespool kirjeldatud, ja inkubeerida 37 °C juures üks tund.

Substraadi lisamine

Pärast 2. antikehaga inkubeerimist tuleb plaati kolm korda pesta, nagu eespool kirjeldatud. Seejärel lisada igasse süvendisse 100 µl TMB substraati. Lasta reaktsioonil 10 minutit toimuda, eelistatavalt nii, et plaat ei ole ereda valguse käes. Reaktsiooni peatamiseks lisada 100 µl 1 M fosforhapet. Seepeale muutub vedeliku värv sinisest erekollaseks. Mõõta plaadilugeriga neelduvus lainepikkusel 450 nm.

Suhtarvu B/B_0 arvutamine

Kõikidest mõõtmistulemustest lahutatakse NSB keskvärtus. Iga proovi ja standardlahuse B/B_0 arvutamiseks jagatakse neelduvuse väärtus (B) proovi keskmise neelduvusega B_0 .

Standardkõvera loomine ja tundmatute koguste kindlakstegemine

Standardkõver luuakse arvutitarkvaraga (nt Slidewrite™ või Sigma Plot®), mis ekstrapoleerib standardlahuste B/B_0 väärtusi kasutades proovi B/B_0 põhjal uuritava valguse koguse. Tavaliselt märgitakse logaritmilisel skaalal esitatud kogus graafikul sigmoidikujulise kõverana. Ent kitsa standardlahuste vahemiku kasutamise korral võib see olla ka lineaarne. Proovi koguseid korrigeeritakse lahjendusteguri arvessevõtmiseks ning tulemused esitatakse VTG sisaldusena milligrammides plasma milliliitri kohta.

Alumise avastamispääri määramine

Sageli, eriti normaalsete isaste puhul, ei ole selge, kuidas esitada väga väikeste väärtustega tulemusi. Sel juhul tuleks 95 % usalduspääri kasutades otsustada, kas märkida väärtuse kohta protokollis null või mõni muu number. Kui proovi tulemus jääb nullkontsentratsiooniga standardlahuse (B_0) usaldusvahemikku, tuleks tulemuseks märkida null. Alumine avastamispääri on kõige väiksem standardlahuse kontsentratsioon, mis erineb püsivalt nullkontsentratsiooniga standardlahusest ehk väärtus, mille puhul kaks usaldusvahemikku ei kattu. Prooviga saadud tulemuse korral, mis jääb alumise avastamispääri usaldusvahemikku või on sellest suurem, märgitakse arvutatud väärtus. Kui prooviga saadud tulemus jääb nullkontsentratsiooniga standardlahuse ja alumise avastamispääri usaldusvahemiku vahele, tuleks vastava proovi tulemuseks märkida pool alumise avastamispääri väärtusest.

KIRJANDUS

Olmstead, A.W., Korte, J.J., Woodis, K.K., Bennett, B.A., Ostazeski, S. ja Degitz, S.J. (2009), „Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*“, *General*

and Comparative Endocrinology, nr 160, lk 117–123.

Parks, L.G., Cheek, A.O., Denslow, N.D., Heppell, S.A., McLachlan, J.A., LeBlanc, G.A. ja Sullivan, C.V. (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*, nr 123, lk 113–125.

7. liide

STATISTILINE ANALÜÜS

LAGDAGA saadakse kolme liiki andmeid, mida tuleb statistiliselt analüüsida: 1) kvantitatiivsed pidevandmed, 2) arengu kiirust näitavad sündmuseni kulunud aja andmed (aeg NFi järgi 62. staadiumini) ning 3) järjestusandmed, mis esitatakse histopatoloogilise analüüsi põhjal raskusastme või arengustaadiumi kujul. Joonisel 1 on esitatud soovitatav otsustusskeem statistilise analüüsimeetodi leidmiseks. Lisaks on allpool esitatud mõned kommentaarid, mis võivad olla vajalikud LAGDAGA kogutud mõõtmisandmete statistilise analüüsi tegemiseks. Analüüsimeetodite otsustusskeemi järgi tuleb suremuse, kasvu (kehamass ja pikkus) ja maksa somaatilise indeksi (LSI) mõõtmistulemusi analüüsida vastavalt harule „Muud lõppnäitajad“.

Pidevandmed

Pidevate näitajate andmete puhul tuleks kõigepealt kontrollida nende monotoonsust. Selleks tehakse andmetega dispersioonanalüüsi mudeli jaoks sobiv astakteisendus ning võrreldakse lineaar- ja ruutkontraste. Kui andmed on monotoonsed, tuleks paralleelproovide mediaanväärtuste suhtes rakendada sammuviisilise elimineerimisega Jonckheere-Terpstra trenditesti ilma edasiste analüüsida. Teine variant, mida saab kasutada normaaljaotuse ja homogeense dispersiooniga andmete puhul, on sammuviisilise elimineerimisega Williamsi test. Kui andmed ei ole monotoonsed (ruutkontrast on oluline ja lineaarkontrast ei ole), tuleks neid analüüsida segamõjuga dispersioonanalüüsi mudeli abil. Seejärel tuleks hinnata andmete normaaljaotust (eelistatavalt Shapiro-Wilki või Anderson-Darlingi testiga) ja dispersiooni homogeensust (eelistatavalt Levene'i testiga). Mõlemad testid tehakse segamõjuga dispersioonanalüüsi mudeli jääkidega. Normaaljaotuse ja dispersiooni homogeensuse formaalsete testide asemel võib kasutada ka eksperthinnangut, kuid formaalseid teste tuleb eelistada. Kui andmed on normaaljaotuse ja homogeense dispersiooniga, siis on segamõjuga dispersioonanalüüsi eeldused täidetud ja kontsentratsiooni oluline toime tehakse kindlaks Dunnetti testiga. Mittenormaaljaotuse või heterogeense dispersiooni korral Dunnetti testi eeldused ei kehti ning vaja on leida normaliseeriv ja dispersiooni ühtlustav teisendus. Kui selline teisendus leitakse, tehakse kontsentratsiooni oluline toime kindlaks Dunni testiga. Võimaluse korral tuleks eelistada ühepoolset testi kahepoolsele, aga seda, kumb neist on konkreetse näitaja puhul asjakohane, tuleks otsustada eksperdihinnangu põhjal.

Suremus

Suremuse andmeid tuleks analüüsida kogu katset hõlmava ajavahemiku ulatuses ning need tuleks esitada konkreetsetes nõus surnud isendite protsendina. Ettenähtud aja jooksul moonet mitteläbinud kulleste, kulleste osaprooviks välja võetud kulleste, väljapraagitud noorkonnade ja katse läbiviija vea tagajärjel surnud loomade andmed tuleks analüüsist välja jätta ning mitte lisada neid protsendimäära arvutamise valemi nimetajasse. Enne mis tahes statistilist analüüsi tuleks suremuse protsendi andmetega teha arkussiinus-ruutjuurteisendus. Teine variant on kasutada astmelise elimineerimisega Cochran-Armitage'i testi, mida võidakse üledispersiooni korral täiendada Rao-Scotti kohandusega.

Kehamass ja pikkus (kasvuandmed)

Isaste ja emaste sootunnused ei ole moonde ajal eristatavad ja seetõttu tuleks kullest osaproovis mõõdetud kasvuandmeid analüüsida soost sõltumatult. Seevastu noorkonnade kasvuandmeid tuleks analüüsida geneetiliste sugude lõikes. Kõnealuste näitajate puhul võib vajalik olla logaritmt teisendus, sest suuruseandmetes esineb sageli logaritmilist normaaljaotust.

Maksa somaatiline indeks (LSI)

Maksa massi käsitlevate andmete normaliseerimiseks tuleks need esitada osakaaluna kehamassist (st LSI kujul) ja neid tuleks analüüsida eraldi geneetiliste sugude lõikes.

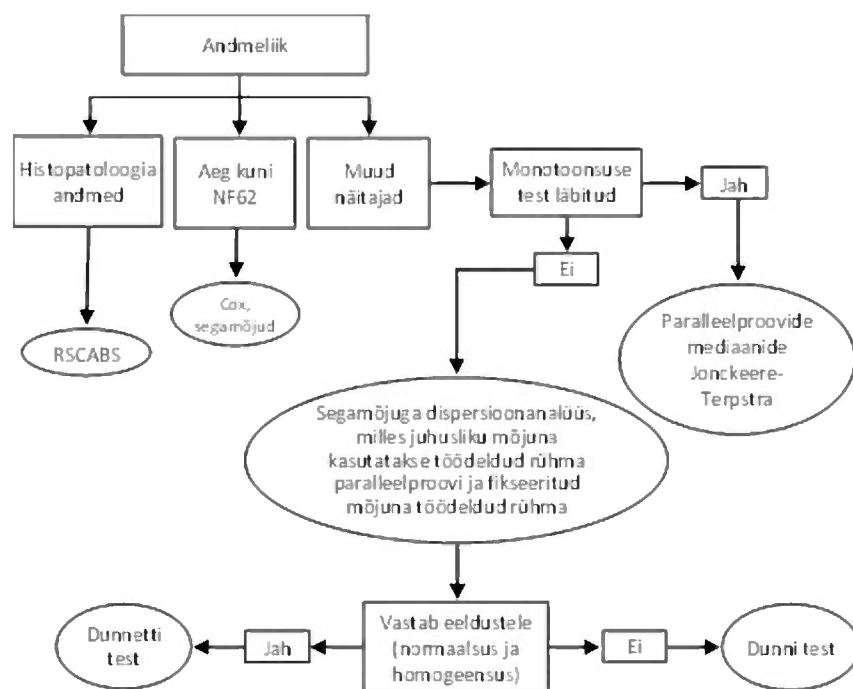
NFi järgi 62. staadiumisse jõudmiseks kulunud aeg

Moondeni kulunud aeg tuleks liigitada sündmuse toimumiseni kulunud aja andmete kategooriasse, kus surmajuhte ja 70 päeva jooksul NFi järgi 62. staadiumisse mittejõudnud isendite andmeid käsitatakse paremalt tsenseeritud andmetena (st tegelik väärtus on suurem kui 70 päeva, aga uuring lõppes enne, kui loomad jõudsid NFi järgi 62. staadiumisse). Katse lõpetamise päeva kindlaksmääramise aluseks tuleks võtta lahjendusveega kontrollrühmades NFi järgi 62. staadiumi (moonde) läbimiseni kulunud mediaanaeg. Moonde lõpetamiseni kulunud mediaanaeg tuleks kindlaks teha Kaplan-Meieri hinnangufunktsioonidega ajapiiri määramiseks. Kõnealust näitajat tuleks analüüsida segamõjudega proportsionaalseid ohte käsitleva Coxi mudeli abil, milles võetakse arvesse uuringu paralleelproovide struktuuri.

Histopatoloogilised andmed (raskusastmed ja arengustaadiumid)

Histopatoloogilised andmed esitatakse raskusastmete või arengustaadiumite kujul. Testis RSCABS (Rao-Scotti kohandusega Cochran-Armitage'i lõiktest) kasutatakse iga histopatoloogilise raskusastme suhtes Rao-Scotti kohandusega astmelise elimineerimise Cochran-Armitage'i trenditesti (Green *et al.*, 2014). Rao-Scotti kohandus võimaldab testis arvesse võtta katses rakendatud paralleelnõude kasutamise kava. Nn lõiktesti metoodikas on arvesse võetud bioloogilist eeldust, et kemikaali kontsentratsioonide suurenedes kasvab ka raskusaste, säilitades samal ajal subjektide individuaalsed skoorid ja tuues välja tuvastatud toimete tugevuse. Lisaks sellele, et RSCABSi metoodika võimaldab kindlaks teha, millised töödeldud rühmad erinevad statistiliselt kontrollrühmadest (st neis esinevad patoloogiad on raskekujulisemad kui kontrollrühmades), aitab see ka välja selgitada, millise raskusastme juures erinevus tekib, andes seeläbi analüüsi jaoks hädavajalikku taustteavet. Sugunäärmete ja sugujuhade arenguga seotud andmeid on vaja täiendavalt töödelda, kuna RSCABSi aluseks on eeldus, et toime tugevus kasvab koos annusega. Kõnealusel juhul avaldub toime tavalisest aeglasemas või kiiremas arengus. Seetõttu tuleks arenguga seotud andmeid esmalt analüüsida esitatud kujul, et tuvastada kiirenenud arengut, ning seejärel enne teist analüüsi manuaalselt ümber pöörata, et tuvastada arengu mahajäämusi.

Joonis 1. LAGDaga kogutud andmete statistilise analüüsi otsustusskeem.



KIRJANDUS

Green, J.W., Springer, T.A., Saulnier, A.N. ja Swintek, J. (2014), „Statistical analysis of histopathology endpoints“, *Environmental Toxicology and Chemistry*, nr 33, lk 1108–1116.

8. liide

SKOLIOOSI JÄLGIMISE JA SELLE ESINEMISE VÄHENDAMISEGA SEOTUD KAAALUTLUSED

Idiopaatiline skolioos, mis avaldub *Xenopus laevis*'e kullestel tavaliselt kõverdunud saba kujul, võib raskendada uuritavate populatsioonide morfoloogia ja käitumise vaatlemist. Nii katseorganismide kasvatamise ajal kui ka katse tingimustes tuleb püüda skolioosi esinemist vähendada või see välistada. Lõplikus katses ei tohiks mõõduka ja raske skolioosi levimus soovitatavalt ületada 10 %, kuna see tagab suurema kindluse, et katsega on võimalik tuvastada just kemikaalist tingitud toimet muidu tervete kulleste arengule.

Lõpliku katse ajal tehtavate igapäevaste vaatluste käigus tuleks registreerida nii avastatud skolioosijuhtude arv kui ka raskusaste. Väärarengu kirjelduses tuleks märkida selle asukoht (nt pärakuavast ees- või tagapool) ja kõverdumise suund (nt külgmine või selja poolt kõhu poole). Raskusastmeid võib liigitada järgmiselt:

NR – ebaoluline: kõverdumist ei esine;

1) – kerge: väike külgmine kõverdumine pärakuavast tagapool; nähtav üksnes puhkeolekus;

2) – mõõdukas: külgmine kõverdumine pärakuavast tagapool; nähtav kogu aeg, aga ei takista liikumist;

3 – raske: külgmine kõverdumine pärakuavast eespool VÕI liikumist takistav mis tahes kõverdumine VÕI mis tahes kõverdumine selja poolt kõhu poole.

USA Keskkonnakaitseameti juures tegutsev insektitsiidide, fungitsiidide ja rodentitsiidide käsitlev teadusnõukogu (FIFRA SAP 2013) on läbi vaadanud *X. laevis*'ega (NFi järgi 51. kuni 60. või kõrgemas staadiumis) tehtud viieteistkümne kahepaiksete moonde katse koondandmed skolioosi kohta ning on esitanud üldised soovitused selle kõrvalekalde levimuse vähendamiseks uuritavates populatsioonides. Need soovitused on asjakohased ka LAGDA puhul, kuigi see katse hõlmab pikemat arenguperioodi.

Varasemad kudemisnäitajad

Üldjuhul tuleks sigimispaarid moodustada kvaliteetsetest tervetest täiskasvanud isenditest. Skolioosiga järglasi andvate sigimispaaride kõrvaldamine võib aja jooksul selle esinemissagedust vähendada. Konkreetsemalt võib kasu olla sellest, kui kasutatakse vähem loodusest püütud sigimisloomi. LAGDA kokkupuuteperiood algab siis, kui embrüod on NFi järgi 8.–10. arengustaadiumis, ning katse alguses ei ole praktiliselt võimalik kindlaks teha, kas konkreetsetel isenditel tekib skolioos. Seega tuleks lisaks skolioosi varasema esinemise kontrollimisele katsesse kaasatud loomade seas dokumenteerida ka kurnade haiguslood (sh skolioosi levimus nende kulleste seas, kellel lastakse areneda). Kasu võib olla ka sellest, kui

jälgida uuringus kasutamata jäänud kurnaosa edasist arengut ja nende vaatluste tulemused teatavaks teha (FIFRA SAP 2013).

Vee kvaliteet

Oluline on tagada piisavalt hea vee kvaliteet nii labori kasvukeskkonnas kui ka katse ajal. Lisaks veeorganismidele mõjuva mürgisuse katsete jaoks tavapäraselt kontrollitavatele veekvaliteedi näitajatele võib olla kasulik jälgida ja korrigeerida ka võimalikke toiteainete puudujääke (nt C-vitamiini-, kaltsiumi- või fosforivaegus) või liigne seleeni- ja vasesisaldus, mille puhul on täheldatud skolioosi põhjustavat mitmesuguse tugevusega toimet laboris kasvatatud *Rana* ja *Xenopus*'e liikidele (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; andmed publikatsioonist FIFRA SAP 2013). Üldiselt saab vee kvaliteeti ja katsealuste liikide tervist parandada sobiva söötmisrežiimi valimise (vt 4. liide) ja nõu regulaarse puhastamisega.

Söötmine

Konkreetsed soovitused LAGDA puhul edukaks osutunud söötmisrežiimi kohta on esitatud 4. liites. Soovitavalt tuleks kasutatavat sööta kontrollida bioloogiliste mürkainete, herbitsiidide ja muude *X. laevis*'el või teistel veeloomadel skolioosi põhjustavate pestitsiidide suhtes (Schlenk ja Jenkins 2013). Näiteks on leitud seos mõnede koliinesteraasi inhibiitorite ja skolioosi vahel nii kaladel (Schultz *et al.* 1985) kui ka konnadel (Bacchetta *et al.* 2008).

KIRJANDUS

Bacchetta, R., Mantecca, P., Andrioletti, M., Vismara, C. ja Vailati, G. (2008), „Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos“, *Science of the Total Environment*, nr 392, lk 110–118.

Schultz, T.W., Dumont, J.N. ja Epler, R.G. (1985), The embryotoxic and osteolathrogenic effects of semicarbazide“, *Toxicology*, nr 36, lk 185–198.

Leibovitz, H.E., Culley, D.D. ja Geaghan, J.P. (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*, nr 13, lk 322–328.

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

Martinez, I., Alvarez, R., Herraiz, I. ja Herraiz, P. (1992), „Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles“, *Anatomical Records*, nr 233(2), lk 314–320.

Schlenk, D. ja Jenkins, F. (2013), „Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1

Screening Assays and Battery Performance“, *US EPA FIFRA SAP Minutes*, nr 2013-03. 21.–23. mai 2013. Washington, DC. “