

Bruxelles, 25. veljače 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

POP RATNA BILJEŠKA

Od:	Europska komisija
Datum primitka:	22. veljače 2019.
Za:	Glavno tajništvo Vijeća
Br. dok. Kom.:	Annex to D060575/02
Predmet:	Prilog UREDBI KOMISIJE (EU) .../... od XXX o izmjeni Priloga Uredbi (EZ) br. 440/2008 o utvrđivanju ispitnih metoda u skladu s Uredbom (EZ) br. 1907/2006 Europskog parlamenta i Vijeća o registraciji, evaluaciji, autorizaciji i ograničavanju kemikalija (REACH) radi prilagodbe tehničkom napretku

Za delegacije se u prilogu nalazi dokument Annex to D060575/02.

Priloženo: Annex to D060575/02

B.71. IN VITRO TESTOVI IZAZIVANJA PREOSJETLJIVOSTI KOŽE KOJIMA SE ISPITUJE KLJUČNI DOGAĐAJ AKTIVIRANJA DENDRITIČNIH STANICA U PUTU NASTANKA ŠETNOG ISHODA (AOP) IZAZIVANJA PREOSJETLJIVOSTI KOŽE

OPĆI UVOD

Ispitna metoda koja se temelji na ključnom događaju aktiviranja dendritičnih stanica

1. Tvar koja izaziva preosjetljivost kože tvar je koja dovodi do alergijske reakcije nakon dodira s kožom, kako je definirana u Globalno usklađenom sustavu razvrstavanja i označivanja kemikalija Ujedinjenih naroda (UN GHS) (1.) te u Uredbi Europske unije (EU) 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa (Uredba o CLP-u)¹. Postoji opća suglasnost o ključnim biološkim događajima koji izazivaju preosjetljivost kože. Postojeće spoznaje o kemijskim i biološkim mehanizmima koji su povezani s izazivanjem preosjetljivosti kože sažeto su prikazane u obliku puta nastanka šetnog ishoda (engl. *Adverse Outcome Pathway* – AOP), u okviru OECD-ova programa za AOP (2.), koji se kreće od početnog molekularnog događaja preko međudogađaja do šetnog učinka, tj. alergijskog kontaktnog dermatitisa. U ovom je slučaju početni molekularni događaj (tj. prvi ključni događaj) stvaranje kovalentne veze između elektrofilnih tvari i nukleofilnih središta u proteinima kože. Drugi se ključni događaj u ovom AOP-u odvija u keratinocitima i uključuje upalne odgovore te promjene u genskoj ekspresiji povezane sa specifičnim staničnim signalnim putovima kao što su putovi koji ovise o elementu antioksidacijskog/elektrofilnog odgovora (engl. *antioxidant/electrophile response element*, ARE). Treći je ključni događaj aktiviranje dendritičnih stanica (DC), koje se obično ocjenjuje prema ekspresiji specifičnih staničnih površinskih biljega, kemokina i citokina. Četvrti je ključni događaj aktiviranje i proliferacija T-stanica, koji se neizravno ocjenjuju analizom lokalnih limfnih čvorova na miševima (LLNA) (3.).
2. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 442E (2017.). U njoj se opisuju *in vitro* analize kojima se ispituju mehanizmi opisani u okviru ključnog događaja aktiviranja dendritičnih stanica u AOP-u izazivanja preosjetljivosti kože (2.). Ispitna

¹ Uredba (EZ) br. 1272/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa, o izmjeni i stavljanju izvan snage Direktive 67/548/EEZ i Direktive 1999/45/EZ i o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1907/2006, SL L 353/1, 31.12.2008.

metoda sastoji se od ispitivanja koja treba primijeniti kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost kože u skladu sa sustavom UN GHS i Uredbom o CLP-u.

U ovoj su ispitnoj metodi opisana sljedeća ispitivanja:

- test aktiviranja ljudske stanične linije (h-CLAT),
 - test aktiviranja stanične linije U937 (U-SENSTM),
 - test reporterskog gena interleukin 8 (test IL-8 Luc).
3. Ispitivanja uključena u ovu ispitnu metodu i odgovarajuću smjernicu OECD-a za ispitivanje mogu se razlikovati u odnosu na postupak koji se upotrebljava za dobivanje podataka i izmjerenih očitavanja, ali se mogu neselektivno upotrebljavati za ispunjavanje zahtjeva zemalja u pogledu rezultata ispitivanja o ključnom događaju aktiviranja dendritičnih stanica u AOP-u izazivanja preosjetljivosti kože, uz ostvarivanje koristi od OECD-ova uzajamnog prihvaćanja podataka.

Kontekst i načela ispitivanja uključenih u ispitnu metodu koja se temelji na ključnom događaju

4. U procjenama izazivanja preosjetljivosti kože tradicionalno se upotrebljavaju laboratorijske životinje. Klasičnim metodama u kojima se upotrebljavaju zamorci, a to su Magnusson–Kligmanov maksimizacijski test sa zamorcima (GMPT) i Buehlerov test (ispitna metoda B.6. (4.)), ocjenjuje se i faza indukcije i faza elicitacije izazivanja preosjetljivosti kože. Ispitivanjima na miševima, tj. analizom LLNA (ispitna metoda B.42. (3.)) i njezinim dvjema inačicama u kojima se ne upotrebljavaju radioaktivni izotopi, LLNA: DA (ispitna metoda B.50. (5.)) te LLNA: BrdU-ELISA (ispitna metoda B.51. (6.)), ispituje se isključivo odgovor u fazi indukcije i isto su tako prihvaćene jer omogućuju prednost u odnosu na ispitivanja na zamorcima u smislu dobrobiti životinja s objektivnim mjerenjem faze indukcije izazivanja preosjetljivosti kože.
5. Nedavno su prihvaćene *in chemico* i *in vitro* ispitne metode koje se temelje na mehanističkom pristupu kojima se ispituje prvi ključni događaj (ispitna metoda B.59.; test izravne reaktivnosti peptida (7.)) i drugi ključni događaj (ispitna metoda B.60.; test luciferaze ARE-Nrf2 (8.)) u AOP-u izazivanja preosjetljivosti kože kako bi se pridonijelo ocjenjivanju potencijala opasnosti kemikalija da izazovu preosjetljivost kože.
6. Ispitivanjima opisanima u ovoj ispitnoj metodi kvantificira se promjena u ekspresiji staničnih površinskih biljega povezanih s procesom aktiviranja monocita i dendritičnih stanica nakon izlaganja tvarima koje izazivaju preosjetljivost (npr. CD54, CD86) ili promjene ekspresije IL-8, citokina povezanog s aktiviranjem dendritičnih stanica. Postoje

izvješća o tome da tvari koje izazivaju preosjetljivost kože induciraju ekspresiju staničnih membranskih biljega, kao što su CD40, CD54, CD80, CD83 i CD86, povrhu induciraju proupalnih citokina, kao što su IL-1 β i TNF- α , i nekoliko kemokina, uključujući IL-8 (CXCL8) i CCL3 (9., 10, 11. i 12.), povezanih s aktiviranjem dendritičnih stanica (2.).

7. Međutim, budući da je aktiviranje dendritičnih stanica samo jedan ključni događaj AOP-a izazivanja preosjetljivosti kože (2. i 13.), informacije dobivene ispitivanjima kojima se mjere samo biljezi aktiviranja dendritičnih stanica možda neće biti dovoljne za donošenje zaključka o prisustvu ili odsustvu potencijala kemikalija da izazovu preosjetljivost kože. Stoga se predlaže da podaci dobiveni ispitivanjima opisanim u ovoj ispitnoj metodi služe kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože (kategorija 1. prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost kože kada se upotrebljavaju u okviru integriranih pristupa ispitivanju i procjeni (IATA), zajedno s ostalim relevantnim dodatnim informacijama, npr. onima dobivenima *in vitro* analizama kojima se ispituju drugi ključni događaji AOP-a izazivanja preosjetljivosti kože te metodama koje ne uključuju ispitivanje, kao i primjenom analogije s kemijski analognim tvarima (13.). Primjeri upotrebe podataka dobivenih ovim ispitivanjima u okviru utvrđenih pristupa, tj. pristupa standardiziranih i u pogledu skupa korištenih izvora informacija i postupka primijenjenog na podatke kako bi se dobila predviđanja, objavljeni su (13.) i mogu se upotrebljavati kao korisni elementi u okviru IATA-e.
8. Ispitivanja opisana u ovoj ispitnoj metodi ne mogu se upotrijebiti kao jedina metoda za razvrstavanje tvari koje izazivaju preosjetljivost kože u potkategorije 1.A i 1.B kako su definirane u sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u (u slučaju tijela koja primjenjuju te dvije neobavezne potkategorije) ni za predviđanje njihove jakosti pri donošenju odluka o ocjeni sigurnosti. Međutim, ovisno o regulatornom okviru pozitivni rezultati dobiveni ovim metodama mogu se samostalno upotrijebiti za razvrstavanje kemikalije u kategoriju 1. prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u.
9. U ovoj se ispitnoj metodi izraz „ispitivana kemikalija” upotrebljava za označivanje onoga što se ispituje¹ te se ne odnosi na primjenjivost ispitivanja na ispitivanje tvari s jednim sastojkom, tvari s više sastojaka i/ili smjesa. Trenutačno su dostupne ograničene informacije o primjenjivosti ispitivanja na tvari s više sastojaka/smjese (14. i 15.). Unatoč

¹ U lipnju 2013. na zajedničkom sastanku OECD-a dogovoreno je da bi u novim i ažuriranim smjernicama OECD-a za ispitivanje, kada je to moguće, trebalo dosljednije upotrebljavati termin „ispitivana kemikalija” kojim se opisuje ono što se ispituje.

tomu, ispitivanja su tehnički primjenjiva i za ispitivanje tvari s više sastojaka i smjesa. Međutim, prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se njome dobiti primjereni rezultati za tu svrhu te ako mogu, zašto¹. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese. Osim toga, kada se ispituju tvari s više sastojaka ili smjese, trebalo bi razmotriti moguću interferenciju citotoksične komponente s uočenim odgovorima.

¹ Ova je rečenica predložena i dogovorena na sastanku o WNT-u održanom u travnju 2014.

LITERATURA

1. Ujedinjeni narodi (UN) (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostupno na: 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. Dostupno na: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=E NV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=E NV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En).
3. Poglavlje B.42. ovog Priloga: Analiza lokalnih limfnih čvorova. Poglavlje B.6. ovog Priloga: Izazivanje preosjetljivosti kože.
4. Poglavlje B.50. ovog Priloga: Izazivanje preosjetljivosti kože: analiza lokalnih limfnih čvorova: DA.
5. Poglavlje B.51. ovog Priloga: Izazivanje preosjetljivosti kože: analiza lokalnih limfnih čvorova: BrdU-ELISA.
6. Poglavlje B.59. ovog Priloga: Izazivanje preosjetljivosti kože *in chemico*: test izravne reaktivnosti peptida (*Direct Peptide Reactivity Assay* – DPRA).
7. Poglavlje B.60. ovog Priloga: Izazivanje preosjetljivosti kože *in vitro*: test luciferaze ARE-Nrf2.
8. Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271.–96.
9. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 180:1841.–7.
10. Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 27:3031.–8.
11. Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and DNCB. *J Invest Dermatol* 120:390.–8.

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

Dodatak 1.**IZAZIVANJE PREOSJETLJIVOSTI KOŽE *IN VITRO*: TEST AKTIVIRANJA LJUDSKE STANIČNE LINIJE (H-CLAT)****POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA**

1. Testom h-CLAT kvantificiraju se promjene u ekspresiji staničnih površinskih biljega povezanih s procesom aktiviranja monocita i dendritičnih stanica (DC) (tj. CD86 i CD54) kod ljudske stanične linije monocitne leukemije THP-1 nakon izlaganja tvarima koje izazivaju preosjetljivost (1. i 2.). Izmjerene razine ekspresije staničnih površinskih biljega CD86 i CD54 zatim se upotrebljavaju kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost kože.
2. Test h-CLAT ocijenjen je u validacijskoj studiji kojom je koordinirao Referentni laboratorij Europske unije za alternative ispitivanju na životinjama (EURL ECVAM) i kasnijem neovisnom stručnom pregledu koji je proveo EURL ECVAM-ov Znanstveni savjetodavni odbor (ESAC). Uzimajući u obzir sve dostupne dokaze i informacije regulatornih tijela i dionika, EURL ECVAM preporučio je da se test h-CLAT (3.) primjenjuje u okviru IATA-e kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost u svrhu razvrstavanja i označivanja prema opasnosti. U literaturi su navedeni primjeri upotrebe podataka dobivenih testom h-CLAT u kombinaciji s ostalim informacijama (4., 5., 6., 7., 8., 9., 10. i 11.).
3. Pokazalo se da se test h-CLAT može prenijeti u laboratorije koji imaju iskustva s tehnikama staničnih kultura i analizom protočnom citometrijom. Može se očekivati da će za predviđanja donesena s pomoću ovog testa razina obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija biti reda veličine 80 % (3. i 12.). Rezultati dobiveni u validacijskoj studiji (13.) i drugim objavljenim studijama (14.) ukupno pokazuju da, u usporedbi s rezultatima analize LLNA, točnost u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože (tj. kategorija 1. prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost iznosi 85 % (N = 142), uz osjetljivost od 93 % (94/101) i specifičnost od 66 % (27/41) (na temelju ponovne analize EURL ECVAM-a (12.), uzimajući u obzir sve postojeće podatke i ne uzimajući u obzir negativne rezultate za kemikalije čiji je Log Kow veći od 3,5, kako je opisano u stavku 4.). Veća je vjerojatnost da će se testom h-CLAT dobiti lažno negativna predviđanja za kemikalije koje pokazuju nisku do umjerenu jakost u izazivanju preosjetljivosti kože (tj. potkategorija 1.B prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) nego za kemikalije koje pokazuju visoku jakost u izazivanju preosjetljivosti kože (tj. potkategorija 1.A prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) (4., 13. i 15.). Prethodno navedene informacije upućuju na korisnost metode h-

CLAT kao elementa koji pridonosi identifikaciji opasnosti od izazivanja preosjetljivosti kože. Međutim, navedene vrijednosti koje se odnose na točnost metode h-CLAT kao samostalnog testa samo su okvirne jer je tu metodu potrebno kombinirati s drugim izvorima informacija u kontekstu IATA-e te u skladu s odredbama stavaka 7. i 8. iz odjeljka „Opći uvod”. Nadalje, pri ocjenjivanju metoda ispitivanja preosjetljivosti kože koje ne uključuju pokuse na životinjama potrebno je imati na umu da ispitivanje LLNA i druga ispitivanja na životinjama možda neće u potpunosti odražavati situaciju kod ljudi.

4. Trenutačno dostupni podaci pokazuju da se metoda h-CLAT može primijeniti za ispitivanje kemikalija koje obuhvaćaju različite organske funkcionalne skupine, mehanizme reakcije, jakost u izazivanju preosjetljivosti kože (kako je utvrđena istraživanjima *in vivo*) te fizikalno-kemijska svojstva (3., 14. i 15.). Metoda h-CLAT primjenjiva je na ispitivane kemikalije koje su topljive ili tvore stabilnu disperziju (tj. koloid ili suspenziju u kojoj se ispitivana kemikalija ne taloži ili ne odvajaju od otapala/nosača stvarajući različite faze) u odgovarajućem otapalu/nosaču (vidjeti stavak 14.) Ispitivane kemikalije čiji je Log Kow veći od 3,5 obično daju lažno negativne rezultate (14.). Stoga negativne rezultate s ispitivanim kemikalijama čiji je Log Kow veći od 3,5 ne treba razmatrati. Međutim, pozitivni rezultati dobiveni s ispitivanim kemikalijama čiji je Log Kow veći od 3,5 ipak se mogu upotrijebiti kao pomoć u identifikaciji ispitivane kemikalije kao tvari koja izaziva preosjetljivost kože. Nadalje, zbog ograničene metaboličke sposobnosti upotrijebljene stanične linije (16.) i uvjeta pokusa prohapteni (tj. tvari koje zahtijevaju enzimsku aktivaciju, na primjer enzimima P450) i prehapteni (tj. tvari koje se aktiviraju oksidacijom), posebno oni sa sporom stopom oksidacije, isto tako mogu dati negativne rezultate u testu h-CLAT (15.). Testom h-CLAT mogu se ocijeniti fluorescentne ispitivane kemikalije (17.), ali snažne fluorescentne ispitivane kemikalije koje emitiraju na istoj valnoj duljini kao i fluorescein izotiocijanat (FITC) ili propidijev jodid (PI) ometat će otkrivanje protočnom citometrijom i stoga se ne mogu točno ocijeniti upotrebom protutijela konjugiranih FITC-om ili propidijeva jodida. U tom se slučaju mogu upotrijebiti druga protutijela označena fluorokromom ili drugi biljezi citotoksičnosti pod uvjetom da se može dokazati da daju slične rezultate kao i protutijela označena FITC-om (vidjeti stavak 24.) ili propidijev jodid (vidjeti stavak 18.), npr. ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti u Dodatku 1.2. S obzirom na navedeno, negativne rezultate trebalo bi tumačiti u kontekstu navedenih ograničenja i zajedno s drugim izvorima informacija u okviru IATA-e. U slučajevima u kojima postoje dokazi da se metoda h-CLAT ne može primijeniti za ispitivanje drugih specifičnih kategorija ispitivanih kemikalija, tu metodu ne bi trebalo upotrebljavati za te specifične kategorije.
5. Kao što je opisano, metoda h-CLAT pomaže u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost. Međutim, ako se upotrebljava

u okviru integriranih pristupa kao što je IATA, mogla bi pridonijeti i procjeni jačine izazivanja preosjetljivosti (4., 5. i 9.). Ipak, kako bi se moglo utvrditi na koji bi način rezultati dobiveni metodom h-CLAT mogli pomoći u toj procjeni, potreban je dodatan rad koji će se po mogućnosti temeljiti na podacima dobivenima na ljudima.

6. Definicije su navedene u Dodatku 1.1.

NAČELO ISPITIVANJA

7. Metoda h-CLAT je *in vitro* analiza kojom se kvantificiraju promjene u ekspresiji staničnih površinskih biljega (tj. CD86 i CD54) na ljudskoj staničnoj liniji monocitne leukemije, stanicama THP-1, nakon 24-satnog izlaganja ispitivanoj kemikaliji. Te površinske molekule tipični su biljezi aktiviranja monocitnog THP-1 i mogu oponašati aktiviranje dendritičnih stanica, koje ima ključnu ulogu u stimulaciji T-stanica. Promjene u ekspresiji površinskih biljega mjere se protočnom citometrijom nakon bojenja stanica protutijelima označenima fluorokromom. Istodobno se provodi i mjerenje citotoksičnosti kako bi se procijenilo dolazi li do povećanja ekspresije površinskih biljega pri subcitotoksičnim koncentracijama. Računa se relativni intenzitet fluorescencije površinskih biljega u usporedbi s kontrolom s otapalom/nosačem te se on upotrebljava u modelu predviđanja (vidjeti stavak 26.) kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost.

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

8. Prije rutinske primjene ispitivanja opisanog u ovom Dodatku ispitnoj metodi B.71. laboratoriji bi trebali dokazati svoju tehničku osposobljenost upotrebom deset tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti navedenih u Dodatku 1.2. Osim toga, korisnici ispitivanja trebaju održavati bazu prijašnjih podataka dobivenih provjerama reaktivnosti (vidjeti stavak 11.) te s pozitivnim kontrolama i kontrolama s otapalom/nosačem (vidjeti stavke od 20. do 22.) i trebaju se koristiti tim podacima kako bi potvrdili da je njihov laboratorij održao obnovljivost ispitivanja tijekom vremena.

POSTUPAK

9. Ovaj se test temelji na protokolu h-CLAT DB-ALM (usluga baze podataka o alternativnim metodama pokusima na životinjama) br. 158 (18.), koji je upotrijebljen u validacijskoj studiji kojom je koordinirao EURL ECVAM. Preporučuje se primjena tog protokola pri provedbi i primjeni metode h-CLAT u laboratoriju. U nastavku su opisane glavne sastavnice i postupci za metodu h-CLAT, koja se sastoji od dva koraka: *testa za utvrđivanje doze i mjerenja ekspresije CD86/CD54*.

Priprema stanica

10. Za provođenje metode h-CLAT treba upotrebljavati THP-1, ljudsku staničnu liniju monocitne leukemije. Preporučuje se da se stanice (TIB-202™) nabave iz kompetentne banke stanica kao što je American Type Culture Collection.
11. Stanice THP-1 uzgajaju se na 37 °C s 5 % CO₂ i u vlažnim atmosferskim uvjetima u mediju RPMI-1640 obogaćenom s 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS), 0,05 mM 2-merkaptoetanolu, 100 jedinica/ml penicilina i 100 µg/ml streptomicina. Može se izbjeći upotreba penicilina i streptomicina u mediju za uzgoj kulture. Međutim, korisnici u tim slučajevima trebaju potvrditi da izostanak antibiotika u mediju za uzgoj kulture ne utječe na rezultate, na primjer, ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti navedenih u Dodatku 1.2. U svakom slučaju, dobru praksu za održavanje staničnih kultura treba poštovati neovisno o prisustvu ili odsustvu antibiotika u mediju za uzgoj kultura kako bi se smanjio rizik od kontaminacije. Stanice THP-1 rutinski se nasađuju svaka 2–3 dana pri gustoći od 0,1 do $0,2 \times 10^6$ stanica/ml. Trebaju se održavati pri gustoći od 0,1 do $1,0 \times 10^6$ stanica/ml. Prije njihove upotrebe za ispitivanje treba provjeriti ispunjavaju li stanice zadane kriterije provjerom reaktivnosti. Reaktivnost stanica treba provjeriti upotrebom pozitivnih kontrola, 2,4-dinitroklorbenzena (DNCB) (CAS br. 97-00-7, čistoće ≥ 99 %) i niklova sulfata (NiSO₄) (CAS br. 10101-97-0, čistoće ≥ 99 %) te negativne kontrole, mliječne kiseline (LA) (CAS br. 50-21-5, čistoće ≥ 85 %), dva tjedna nakon odmrzavanja. I DNCB i NiSO₄ trebaju dati pozitivan odgovor za stanične površinske biljege CD86 i CD54, a LA treba dati negativan odgovor za stanične površinske biljege CD86 i CD54. Za test se upotrebljavaju samo stanice koje su prošle provjeru reaktivnosti. Stanice se mogu razmnožavati do dva mjeseca nakon odmrzavanja. Broj pasaža ne bi trebao biti veći od 30. Reaktivnost treba provjeriti u skladu s postupcima opisanima u stavcima od 20. do 24.
12. Za ispitivanje se stanice THP-1 nasađuju pri gustoći od $0,1 \times 10^6$ stanica/ml ili $0,2 \times 10^6$ stanica/ml te se prethodno uzgajaju u tikvicama s kulturom 72 sata ili 48 sati. Važno je da gustoća stanica u tikvici s kulturom neposredno nakon razdoblja pretkulture bude što dosljednija u svim pokusima (upotrebom jednog od dva prethodno opisana uvjeta za pretkulturu) jer bi gustoća stanica u tikvici s kulturom neposredno nakon pretkulture mogla utjecati na ekspresiju CD86/CD54 koju induciraju alergeni (19.). Na dan ispitivanja stanice izdvojene iz tikvice s kulturom ponovno se suspendiraju svježim medijem za uzgoj kultura pri gustoći od 2×10^6 stanica/ml. Stanice se zatim distribuiraju na ploču s 24 jažice s ravnim dnom s 500 µl (1×10^6 stanica/jažici) ili ploču s 96 jažica s ravnim dnom s 80 µl ($1,6 \times 10^5$ stanica/jažici).

Test za utvrđivanje doze

13. *Test za utvrđivanje doze* provodi se kako bi se utvrdio CV75, odnosno koncentracija ispitivane kemikalije koja dovodi do vijabilnosti stanica od 75 % (CV) u usporedbi s

kontrolom s otapalom/nosačem. Vrijednost CV75 upotrebljava se za utvrđivanje koncentracije ispitivane kemikalije za mjerenje ekspresije *CD86/CD54* (vidjeti stavke od 20. do 24.).

Priprema ispitivanih kemikalija i kontrolnih tvari

14. Ispitivane kemikalije i kontrolne tvari pripremaju se na dan ispitivanja. Za metodu h-CLAT ispitivane kemikalije otapaju se ili se stabilno dispergiraju (vidjeti i stavak 4.) u fiziološkoj otopini ili mediju kao prvoj opciji za otapalo/nosač ili dimetil sulfoksidu (DMSO, čistoće $\geq 99\%$) kao drugoj opciji za otapalo/nosač ako ispitivana kemikalija nije topljiva ili ne tvori stabilnu disperziju u prethodna dva otapala/nosača, tako da se dobije konačna koncentracija od 100 mg/ml (u fiziološkoj otopini ili mediju) ili 500 mg/ml (u DMSO-u). Mogu se upotrebljavati i druga otapala/nosači ako se navede dovoljno dobro znanstveno obrazloženje. Treba uzeti u obzir stabilnost ispitivane kemikalije u konačnom otapalu/nosaču.
15. Počevši od 100 mg/ml (u fiziološkoj otopini ili mediju) ili 500 mg/ml (u DMSO-u) glavnih otopina ispitivanih kemikalija, treba provesti sljedeće korake razrjeđivanja:
 - ako se kao otapalo/nosač upotrebljava fiziološka otopina ili medij: priprema se osam glavnih otopina (osam koncentracija) upotrebom odgovarajućeg otapala/nosača u dvostrukim serijskim razrjeđivanjima. Te glavne otopine zatim se dodatno razrjeđuju 50 puta u mediju za uzgoj kulture (radne otopine). Ako najveća konačna koncentracija na ploči od 1 000 $\mu\text{g/ml}$ nije toksična, najveću koncentraciju treba ponovno utvrditi provođenjem novog ispitivanja citotoksičnosti. Konačna koncentracija na ploči ne bi trebala biti veća od 5 000 $\mu\text{g/ml}$ za ispitivane kemikalije otopljene ili stabilno dispergirane u fiziološkoj otopini ili mediju,
 - ako se kao otapalo/nosač upotrebljava DMSO: priprema se osam glavnih otopina (osam koncentracija) upotrebom odgovarajućeg otapala/nosača u dvostrukim serijskim razrjeđivanjima. Te glavne otopine zatim se dodatno razrjeđuju 250 puta u mediju za uzgoj kulture (radne otopine). Konačna koncentracija na ploči ne bi trebala biti veća od 1 000 $\mu\text{g/ml}$ čak i ako ta koncentracija nije toksična.

Radne otopine naposljetku se koriste za izlaganje dodavanjem volumena radne otopine koji je jednak volumenu suspenzije stanica THP-1 na ploči (vidjeti i stavak 17.) kako bi se dobilo dodatno dvostruko razrjeđenje (konačni raspon koncentracija na ploči obično iznosi 7,81–1 000 $\mu\text{g/ml}$).

16. Kao kontrola s otapalom/nosačem u metodi h-CLAT upotrebljava se medij za uzgoj kulture (za ispitivane kemikalije otopljene ili stabilno dispergirane (vidjeti stavak 4.) u mediju ili fiziološkoj otopini) ili DMSO (za ispitivane kemikalije otopljene ili stabilno dispergirane u DMSO-u) ispitani pri jednoj konačnoj koncentraciji na ploči od 0,2 %.

Kontrola se podvrgava istom razrjeđivanju kao što je ono opisano za radne otopine u stavku 15.

Primjena ispitivanih kemikalija i kontrolnih tvari

17. Medij za uzgoj kulture ili radne otopine opisane u stavcima 15. i 16. miješaju se u omjeru 1 : 1 (v/v) sa suspenzijama stanica pripremljenima na ploči s 24 jažice ili s 96 jažica s ravnim dnom (vidjeti stavak 12.). Tretirane se ploče potom inkubiraju $24 \pm 0,5$ h na temperaturi od 37°C s 5 % CO_2 . Treba paziti da ne dođe do isparavanja hlapljivih ispitivanih kemikalija te unakrsne kontaminacije jažica ispitivanim kemikalijama, npr. zatvaranjem ploče prije inkubacije s ispitivanim kemikalijama (20.).

Bojenje propidijevim jodidom (PI)

18. Nakon izlaganja od $24 \pm 0,5$ h stanice se prenose u epruvete za uzorke i prikupljaju centrifugiranjem. Supernatanti se odbacuju, a preostale stanice ponovno se suspendiraju s 200 μl (u slučaju upotrebe 96 jažica) ili 600 μl (u slučaju upotrebe 24 jažice) fiziološke otopine puferirane fosfatnim puferom koja sadržava 0,1 % goveđeg serumskog albumina (pufer za bojenje). 200 μl suspenzije stanica prenosi se na ploču s 96 jažica s okruglim dnom (u slučaju upotrebe 96 jažica) ili mikroepruvetu (u slučaju upotrebe 24 jažice) te se dvaput ispire s 200 μl (u slučaju upotrebe 96 jažica) ili 600 μl (u slučaju upotrebe 24 jažice) pufera za bojenje. Stanice se naposljetku ponovno suspendiraju u puferu za bojenje (npr. 400 μl) i dodaje se otopina propidijeva jodida (npr. 20 μl) (na primjer, konačna koncentracija propidijeva jodida iznosi 0,625 $\mu\text{g/ml}$). Mogu se koristiti i drugi biljezi citotoksičnosti, kao što su 7-aminoaktinomycin D (7-AAD), tripansko modriilo ili drugi, ako se može pokazati da alternativna bojila daju slične rezultate kao i propidijev jodid, na primjer, ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz Dodatka 1.2.

Mjerenje citotoksičnosti protočnom citometrijom i procjena vrijednosti CV75

19. Apsorbancija propidijeva jodida analizira se upotrebom protočne citometrije s kanalom očitavanja FL-3. Očitava se ukupno 10 000 živih stanica (negativnih na PI). Vijabilnost stanica može se izračunati tako da se u programu za analizu citometra upotrijebi sljedeća jednačba. Ako je vijabilnost stanica niska, treba se očitati do 30 000 stanica, uključujući mrtve stanice. Umjesto toga, podaci se mogu očitavati jednu minutu nakon početka analize.

$$\text{vijabilnost stanica} = \frac{\text{broj živih stanica}}{\text{ukupan broj očitanih stanica}} \times 100$$

Vrijednost CV75 (vidjeti stavak 13.), tj. koncentracija koja pokazuje preživljavanje stanica THP-1 od 75 % (citotoksičnost od 25 %), računa se log-linearnom interpolacijom, upotrebom sljedeće jednačbe:

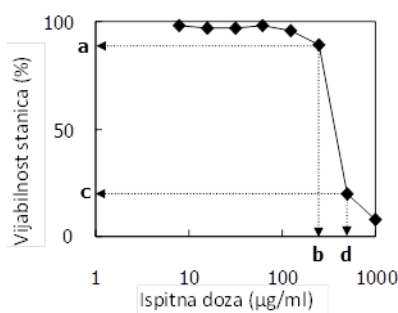
$$\text{Log CV75} = \frac{(75-c) \times \text{Log}(b) - (75-a) \times \text{Log}(d)}{a-c}$$

pri čemu je:

a najmanja vrijednost vijabilnosti stanica koja je veća od 75 %;

c najveća vrijednost vijabilnosti stanica koja je manja od 75 %;

b i d su koncentracije koje pokazuju vrijednost vijabilnosti stanica a odnosno c.



Mogu se upotrebljavati i drugi pristupi za izvođenje vrijednosti CV75 pod uvjetom da se dokaže da to ne utječe na rezultate (npr. ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti).

Mjerenje ekspresije CD86/CD54

Priprema ispitivanih kemikalija i kontrolnih tvari

20. Za otapanje ili stabilno dispergiranje ispitivanih kemikalija upotrebljava se odgovarajuće otapalo/nosač (fiziološka otopina, medij ili DMSO; vidjeti stavak 14.). Ispitivane kemikalije prvo se razrjeđuju na koncentraciju koja odgovara vrijednosti koja je 100 puta (za fiziološku otopinu ili medij) ili 500 puta (za DMSO) veća od $1,2 \times \text{CV75}$ utvrđenom u *testu za utvrđivanje doze* (vidjeti stavak 19.). Ako se CV75 ne može utvrditi (tj. u *testu za utvrđivanje doze* nije uočena dovoljna citotoksičnost), kao početnu koncentraciju treba upotrijebiti najvišu koncentraciju ispitivane kemikalije pripremljenu sa svakim otapalom/nosačem koja se može otopiti ili stabilno dispergirati. Napominje se da konačna koncentracija na ploči ne bi trebala biti veća od 5 000 µg/ml (u slučaju fiziološke otopine ili medija) ili 1 000 µg/ml (u slučaju DMSO-a). Zatim se prave serijska razrjeđivanja s faktorom razrjeđivanja od 1,2 upotrebom odgovarajućeg otapala/nosača kako bi se dobile glavne otopine (osam koncentracija u rasponu od $100 \times 1,2 \times \text{CV75}$ do $100 \times 0,335 \times \text{CV75}$ (za fiziološku otopinu ili medij) ili od $500 \times 1,2 \times \text{CV75}$ do $500 \times 0,335 \times \text{CV75}$ (za DMSO)) koje se ispituju metodom h-CLAT (primjer plana doziranja vidjeti u protokolu DB-ALM br. 158). Glavne otopine zatim se dodatno razrjeđuju 50 puta (za fiziološku otopinu ili medij) ili 250 puta (za DMSO) u mediju za uzgoj kulture (radne otopine). Te radne otopine naposljetku se upotrebljavaju za izlaganje uz dodatni faktor dvostrukog konačnog razrjeđivanja na ploči. Ako rezultati ne ispunjavaju kriterije prihvatljivosti

opisane u stavcima 29. i 30. u pogledu vijabilnosti stanica, *test za utvrđivanje doze* može se ponoviti kako bi se utvrdila preciznija vrijednost CV75. Napominje se da se za mjerenje ekspresije CD86/CD54 mogu upotrebljavati samo ploče s 24 jažice.

21. Kontrola s otapalom/nosačem priprema se kako je opisano u stavku 16. U metodi h-CLAT kao pozitivna kontrola upotrebljava se DNCB (vidjeti stavak 11.), za koji se glavne otopine pripremaju u DMSO-u i razrjeđuju kako je opisano za glavne otopine u stavku 20. DNCB treba upotrebljavati kao pozitivnu kontrolu za *mjerenje ekspresije CD86/CD54* pri jednoj konačnoj koncentraciji na ploči (obično 4,0 µg/ml). Kako bi se na ploči dobila koncentracija DNCB-a od 4,0 µg/ml, priprema se glavna otopina DNCB-a u DMSO-u od 2 mg/ml, koja se dodatno razrjeđuje 250 puta medijem za uzgoj kulture kako bi se dobila radna otopina od 8 µg/ml. Umjesto toga, kao koncentracija pozitivne kontrole može se upotrebljavati i CV75 DNCB-a, koji se utvrđuje u svakoj ustanovi koja provodi ispitivanje. Mogu se upotrijebiti druge prikladne pozitivne kontrole, pod uvjetom da su dostupni prijašnji podaci na temelju kojih se mogu odrediti usporedivi kriteriji prihvatljivosti ciklusa. Kod pozitivnih kontrola jedna konačna koncentracija na ploči ne bi trebala biti veća od 5 000 µg/ml (u slučaju fiziološke otopine ili medija) ili 1 000 µg/ml (u slučaju DMSO-a). Kriteriji prihvatljivosti ciklusa isti su kao i oni opisani za ispitivanu kemikaliju (vidjeti stavak 29.), osim u slučaju posljednjeg kriterija prihvatljivosti jer se pozitivna kontrola ispituje u samo jednoj koncentraciji.

Primjena ispitivanih kemikalija i kontrolnih tvari

22. Za svaku ispitivanu kemikaliju i kontrolnu tvar potreban je jedan pokus kako bi se dobilo predviđanje. Svaki se pokus sastoji od najmanje dva neovisna ciklusa za *mjerenje ekspresije CD86/CD54* (vidjeti stavke od 26. do 28.). Svaki se neovisni ciklus provodi na različite dane ili na isti dan ako su za svaki ciklus ispunjeni sljedeći uvjeti: a) pripremljene su svježje glavne i radne otopine ispitivane kemikalije i otopine s protutijelima i b) upotrebljavaju se neovisno izdvojene stanice (tj. stanice su prikupljene iz različitih tikvica s kulturom); međutim, stanice mogu biti iz iste pasaže. Ispitivane kemikalije i kontrolne tvari pripremljene kao radne otopine (500 µl) miješaju se s 500 µl suspendiranih stanica (1×10^6 stanica) u omjeru 1 : 1 te se stanice inkubiraju $24 \pm 0,5$ h kako je opisano u stavcima 20. i 21. U svakom je ciklusu dovoljno jedno ponavljanje za svaku koncentraciju ispitivane kemikalije i kontrolne tvari jer se predviđanje izvodi na temelju najmanje dva neovisna ciklusa.

Bojenje i analiza stanica

23. Nakon $24 \pm 0,5$ h izlaganja stanice se prenose s ploče s 24 jažice u epruvete za uzorke, prikupljaju se centrifugiranjem i zatim dvaput ispiru s 1 ml pufera za bojenje (ako je potrebno, mogu se provesti dodatni koraci ispiranja). Nakon ispiranja stanice se blokiraju sa 600 µl otopine za blokiranje (pufer za bojenje koji sadržava 0,01 % (w/v) globulina

(Cohnova frakcija II, III, humana; SIGMA, #G2388-10G ili ekvivalentno)) i inkubiraju 15 minuta na 4 °C. Nakon blokiranja stanice se podijele u tri alikvota od 180 µl na ploču s 96 jažica s okruglim dnom ili u mikroepruvetu.

24. Nakon centrifugiranja stanice se boje s 50 µl protutijela anti-CD86, anti-CD54 ili mišjih protutijela IgG1 (izotip) označenih FITC-om na 4 °C u trajanju od 30 minuta. Trebaju se upotrebljavati protutijela opisana u protokolu h-CLAT DB-ALM br. 158 (18.) razrjeđivanjem u omjeru 3 : 25 v/v (za CD86 (BD-PharMingen, #555657; klon: Fun-1)) ili 3 : 50 v/v (za CD54 (DAKO, #F7143; klon: 6.5B5) i IgG1 (DAKO, #X0927)) puferom za bojenje. Subjekti koji su razvili ispitivanje utvrdili su da ti faktori razrjeđenja protutijela daju najbolji omjer signala i šuma. Na temelju iskustva subjekata koji su razvili ispitivanje intenzitet fluorescencije protutijela obično je dosljedan među različitim serijama. Međutim, korisnici mogu razmotriti titraciju protutijela u uvjetima svojeg laboratorija kako bi utvrdili koje je koncentracije najbolje upotrebljavati. Mogu se koristiti i druga protutijela anti-CD86 i/ili anti-CD54 označena fluorokromom ako se može pokazati da ona daju slične rezultate kao i protutijela konjugirana FITC-om, na primjer, ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz Dodatka 1.2. Treba napomenuti da promjena klona ili dobavljača protutijela, kako je opisano u protokolu h-CLAT DB-ALM br. 158 (18.), može utjecati na rezultate. Nakon ispiranja sa 150 µl pufera za bojenje dva ili više puta stanice se ponovno suspendiraju u puferu za bojenje (npr. 400 µl) i dodaje se otopina propidijeva jodida (npr. 20 µl kako bi se dobila konačna koncentracija od 0,625 µg/ml) ili otopina drugog biljega citotoksičnosti (vidjeti stavak 18.). Razine ekspresije CD86 i CD54 te vijabilnost stanica analiziraju se upotrebom protočne citometrije.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Procjena podataka

25. Ekspresija CD86 i CD54 analiza se protočnom citometrijom s kanalom očitavanja FL-1. Na temelju geometrijske sredine intenziteta fluorescencije (MFI) relativni intenzitet fluorescencije (RFI) za CD86 i CD54 za stanice pozitivne kontrole (ctrl) i stanice tretirane kemikalijama računa se u skladu sa sljedećom jednadžbom:

$$RFI = \frac{MFI \text{ stanica tretiranih kemikalijom} - MFI \text{ stanica kontrole izotipa tretiranih kemikalijom}}{MFI \text{ stanica kontrole tretiranih otapalom/nosačem} - MFI \text{ stanica kontrole izotipa tretiranih otapalom/nosačem}} \times 100$$

Vijabilnost stanica iz stanica kontrole izotipa (ctrl) (koje se boje mišjim protutijelima IgG1 (izotip)) isto se računa prema jednadžbi opisanoj u stavku 19.

Model predviđanja

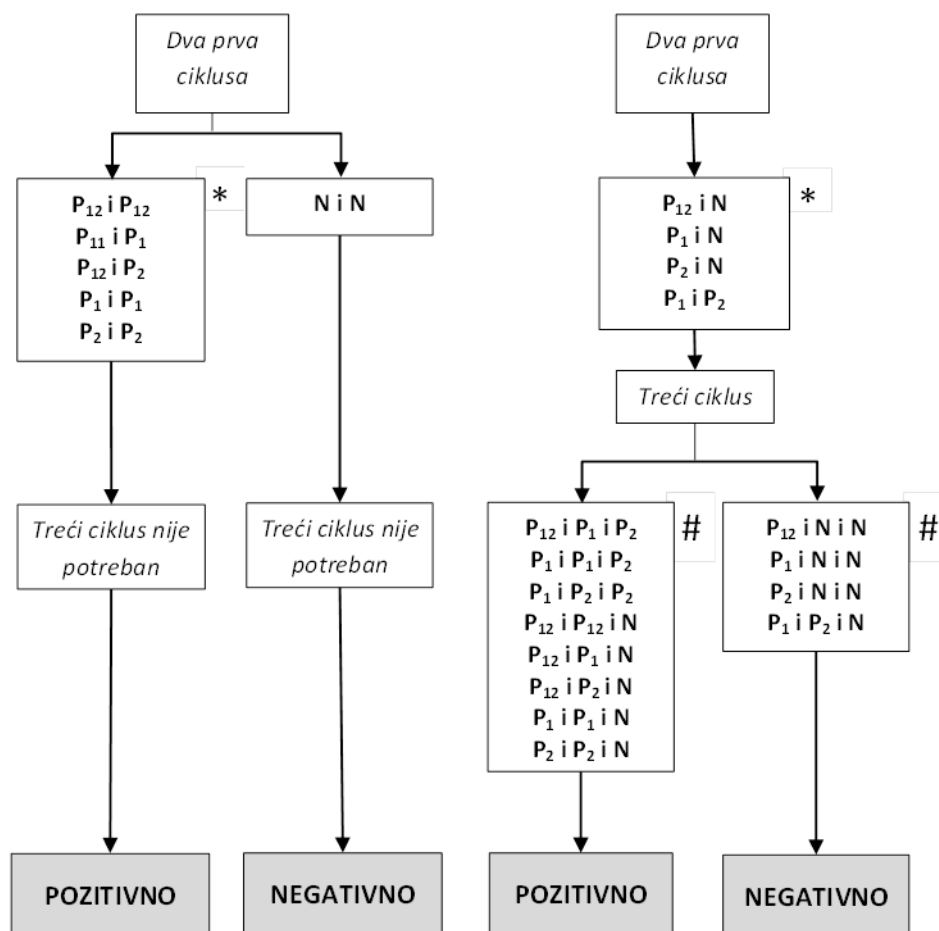
26. Kod mjerenja ekspresije *CD86/CD54* svaka ispitivana kemikalija ispituje se u najmanje dva neovisna ciklusa kako bi se izvelo jedno predviđanje (POZITIVNO ili NEGATIVNO).

Predviđanje na temelju testa h-CLAT smatra se POZITIVNIM ako je ispunjen barem jedan od sljedećih uvjeta u dva od dva neovisna ciklusa ili u barem dva od tri neovisna ciklusa; u protivnom se predviđanje na temelju testa h-CLAT smatra NEGATIVNIM (slika 1.):

- RFI za CD86 jednak je ili veći od 150 % pri svim ispitanim koncentracijama (uz vijabilnost stanica ≥ 50 %),
- RFI za CD54 jednak je ili veći od 200 % pri svim ispitanim koncentracijama (uz vijabilnost stanica ≥ 50 %).

27. Na temelju prethodno navedenoga, ako su prva dva ciklusa pozitivna za CD86 i/ili su oba pozitivna za CD54, predviđanje na temelju testa h-CLAT smatra se POZITIVNIM i ne mora se provoditi treći ciklus. Slično tomu, ako su prva dva ciklusa negativna za oba biljega, predviđanje na temelju testa h-CLAT smatra se NEGATIVNIM (uzimajući u obzir odredbe stavka 30.) i nije potreban treći ciklus. Međutim, ako prva dva ciklusa nisu usklađena za barem jedan od biljega (CD54 ili CD86), potreban je treći ciklus i konačno predviđanje temeljit će se na većinskom rezultatu triju neovisnih ciklusa (tj. na dva ciklusa od tri provedena). Kad je riječ o tome, treba napomenuti da je potreban treći ciklus ako se provode dva neovisna ciklusa i jedan je pozitivan samo za CD86 (dalje u tekstu „P₁”), a drugi je pozitivan samo za CD54 (dalje u tekstu „P₂”). Ako je treći ciklus negativan za oba biljega (dalje u tekstu „N”), predviđanje na temelju testa h-CLAT smatra se NEGATIVNIM. S druge strane, ako je treći ciklus pozitivan za bilo koji biljeg (P₁ ili P₂) ili za oba biljega (dalje u tekstu „P₁₂”), predviđanje na temelju testa h-CLAT smatra se POZITIVNIM.

Slika 1.: Model predviđanja koji se upotrebljava u metodi h-CLAT. Predviđanje na temelju testa h-CLAT trebalo bi razmatrati u okviru IATA-e te u skladu s odredbama stavaka 7. i 8. iz odjeljka „Opći uvod”.



P₁: ciklus u kojem je samo CD86 pozitivan; P₂: ciklus u kojem je samo CD54 pozitivan; P₁₂: ciklus u kojem su i CD86 i CD54 pozitivni; N: ciklus u kojem ni CD86 ni CD54 nisu pozitivni.

*U okvirima su prikazane relevantne kombinacije rezultata iz prva dva ciklusa, neovisno o redoslijedu kojim se mogu dobiti.

#U okvirima su prikazane relevantne kombinacije rezultata iz tri ciklusa na temelju rezultata dobivenih u prva dva ciklusa prikazana u prethodnom okviru, ali ne odražavaju redoslijed kojim se mogu dobiti.

28. Za ispitivane kemikalije koje se testom h-CLAT predvide kao POZITIVNE mogu se utvrditi dvije vrijednosti učinkovite koncentracije (EC), EC150 za CD86 i EC200 za CD54, tj. koncentracije pri kojima su ispitivane kemikalije inducirale RFI od 150 ili 200. Te bi vrijednosti EC potencijalno mogle pridonijeti procjeni jačine izazivanja preosjetljivosti (9.) ako se upotrebljavaju u okviru integriranih pristupa kao što je IATA (4., 5., 6., 7. i 8.). Mogu se izračunati prema sljedećim jednadžbama:

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

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

pri čemu je:

A_{conc} = najniža koncentracija u $\mu\text{g/ml}$ kod koje je $\text{RFI} > 150$ (CD86) ili 200 (CD54)

B_{conc} = najviša koncentracija u $\mu\text{g/ml}$ kod koje je $\text{RFI} < 150$ (CD86) ili 200 (CD54)

A_{RFI} = RFI pri najnižoj koncentraciji kod koje je $\text{RFI} > 150$ (CD86) ili 200 (CD54)

B_{RFI} = RFI pri najvišoj koncentraciji kod koje je $\text{RFI} < 150$ (CD86) ili 200 (CD54)

Radi preciznijeg izvođenja vrijednosti EC150 i EC200 možda će biti potrebna tri neovisna ciklusa za *mjerenje ekspresije CD86/CD54*. Konačne vrijednosti EC150 i EC200 zatim se određuju kao srednja vrijednost EC-ova izračunanih iz tri neovisna ciklusa. Ako samo dva od tri neovisna ciklusa ispunjavaju kriterije za pozitivan rezultat (vidjeti stavke 26. i 27.), prihvaća se viša vrijednost od dviju izračunanih vrijednosti EC150 ili EC200.

Kriteriji prihvatljivosti

29. Sljedeći bi kriteriji prihvatljivosti trebali biti ispunjeni kada se primjenjuje metoda h-CLAT (22. i 27.).

- Vijabilnost stanica u kontroli s medijem i kontrolama s otapalom/nosačem trebala bi biti veća od 90 %.
- Kod kontrole s otapalom/nosačem, vrijednosti RFI i za CD86 i za CD54 ne bi trebale biti veće od pozitivnog kriterija ($\text{RFI za CD86} \geq 150 \%$ i $\text{RFI za CD54} \geq 200 \%$). Vrijednosti RFI kontrole s otapalom/nosačem računaju se upotrebom formula opisanih u stavku 25. („MFI kemikalije” treba zamijeniti „MFI-jem otapala/nosača”, a „MFI otapala/nosača” treba zamijeniti „MFI-jem kontrole (s medijem)”).
- I za kontrole s medijem i kontrole s otapalom/nosačem omjer MFI-ja i za CD86 i za CD54 u odnosu na kontrolu izotipa treba biti $> 105 \%$.
- Kod pozitivne kontrole (DN CB), vrijednosti RFI i za CD86 i za CD54 trebaju ispuniti pozitivne kriterije ($\text{RFI za CD86} \geq 150$ i $\text{RFI za CD54} \geq 200$), a vijabilnost stanica treba biti veća od 50 %.
- Kod ispitivane kemikalije vijabilnost stanica treba biti veća od 50 % u najmanje četiri ispitane koncentracije u svakom ciklusu.

30. Negativni rezultati prihvatljivi su samo za ispitivane kemikalije koje pokazuju vijabilnost stanica manju od 90 % pri najvišoj ispitanoj koncentraciji (tj. $1,2 \times \text{CV75}$ u skladu s planom razrjeđivanja opisanim u stavku 20.). Ako vijabilnost stanica pri koncentraciji od $1,2 \times \text{CV75}$ iznosi 90 % ili više, negativan rezultat treba odbaciti. U tom se slučaju preporučuje da se pokuša preciznije odrediti odabir doze ponovnim utvrđivanjem vrijednosti CV75. Treba napomenuti da je negativan rezultat prihvatljiv čak i ako je vijabilnost stanica veća od 90 % ako se kao najveća ispitivana koncentracija ispitivane

kemikalije upotrebljava 5 000 µg/ml u fiziološkoj otopini (ili mediju ili drugim otapalima/nosačima), 1 000 µg/ml u DMSO-u ili najviša topljiva koncentracija.

Izvešće o ispitivanju

31. Izvešće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija

Tvar s jednim sastojkom:

- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,
- fizički izgled, Log Kow, topljivost u vodi, topljivost u DMSO-u, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),
- ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- obrazloženje za odabir otapala/nosača za svaku ispitivanu kemikaliju.

Tvar s više sastojaka, UVCB tvar i smjesa:

- opisane koliko god je to moguće npr. kemijskim identitetom (vidjeti prethodno), čistoćom, količinskom zastupljenošću i relevantnim fizikalno-kemijskim svojstvima sastojaka (vidjeti prethodno), u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- fizički izgled, topljivost u vodi, topljivost u DMSO-u te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- molekularna masa ili prividna molekularna masa u slučaju smjesa/polimera poznatog sastava ili druge informacije koje su relevantne za provođenje studije,
- obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),
- ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- obrazloženje za odabir otapala/nosača za svaku ispitivanu kemikaliju.

Kontrole

Pozitivna kontrola:

- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,
- fizički izgled, Log K_{ow} , topljivost u vodi, topljivost u DMSO-u, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni i ako je primjenjivo,
- čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),
- ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- upućivanje na rezultate koji se odnose na prijašnje pozitivne kontrole i pokazuju primjerenost kriterija prihvatljivosti ciklusa, ako je primjenjivo.

Negativna kontrola i kontrola s otapalom/nosačem:

- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,
- čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- fizički izgled, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva u slučaju da su upotrijebljene kontrole s otapalom/nosačem koje nisu navedene u smjernici za ispitivanje, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- obrazloženje za odabir otapala/nosača za svaku ispitivanu kemikaliju.

Ispitni uvjeti:

- naziv i adresa naručitelja, ustanove koja provodi ispitivanje i voditelja istraživanja,
- opis upotrijebljenog ispitivanja,
- upotrijebljena stanična linija, uvjeti njezina skladištenja i izvor (npr. objekt iz kojeg su dobiveni),
- upotrijebljena protočna citometrija (npr. model), uključujući upotrijebljene postavke instrumenta, globulin, protutijela i biljege citotoksičnosti,
- postupak koji je primijenjen za dokazivanje osposobljenosti laboratorija za izvođenje ispitivanja ispitivanjem tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti te postupak koji je primijenjen za dokazivanje obnovljive primjene ispitivanja tijekom vremena, npr. podaci o prijašnjim kontrolama i/ili prijašnjim provjerama reaktivnosti.

Kriteriji prihvatljivosti ispitivanja:

- vijabilnost stanica, vrijednosti MFI i RFI dobivene kontrolom s otapalom/nosačem u usporedbi s rasponima prihvatljivosti,
- vijabilnost stanica i vrijednosti RFI dobivene pozitivnom kontrolom u usporedbi s rasponima prihvatljivosti,
- vijabilnost stanica svih ispitanih koncentracija ispitane kemikalije.

Ispitni postupak:

- broj upotrijebljenih ciklusa,
- koncentracije ispitivane kemikalije, primjena i vrijeme izloženosti (ako je drukčije od preporučenog),
- trajanje izlaganja (ako je drukčije od preporučenog),
- opis primijenjenih kriterija ocjenjivanja i odlučivanja,
- opis mogućih izmjena ispitnog postupka.

Rezultati:

- tablični prikaz podataka, uključujući CV75 (ako je primjenjivo), geometrijski MFI, RFI, vrijednosti vijabilnosti stanica, vrijednosti EC150/EC200 (ako je primjenjivo) dobivene za ispitivanu kemikaliju i za pozitivnu kontrolu u svakom ciklusu te klasifikacija ispitivane kemikalije prema modelu predviđanja,
- opis svih drugih relevantnih opažanja, ako je primjenjivo.

Rasprava o rezultatima:

- rasprava o rezultatima dobivenima metodom h-CLAT,
- rasprava o rezultatima ispitivanja u kontekstu IATA-e ako su dostupni drugi relevantni podaci.

Zaključci

LITERATURA

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

9. Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch Toxicol.* 89, 2355.–2383.
10. Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol.* DOI 10.1002/jat.3281.
11. Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro* 26, 1150.–60.
12. EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Dostupno na: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing>.
13. EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report. Dostupno na: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>.
14. Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.* 38, 599.–609.
15. Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275.–284.
16. Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch Toxicol* 87, 1683.–1969.
17. Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6th report): A study for

- evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81.–88.
18. DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Dostupno na: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>.
 19. Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamoto K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70.–82.
 20. Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89.–96.
 21. OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz, Francuska, 2005., str. 96.
 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. Dostupno na: [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. Ujedinjeni narodi (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostupno na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
 24. ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).
 25. Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27.–35.

Dodatak 1.1.**DEFINICIJE**

Točnost: stupanj podudarnosti između rezultata ispitivanja i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Ona je mjerilo učinkovitosti testa i jedan od aspekata relevantnosti. Pojam je često međusobno zamjenjiv s pojmom „podudarnost” u smislu udjela točnih ishoda testa (21.).

AOP (engl. *Adverse Outcome Pathway* – put nastanka štetnog ishoda): slijed događaja od kemijske strukture ciljne kemikalije ili skupine sličnih kemikalija preko početnog molekularnog događaja do štetnog ishoda *in vivo* (22.).

Kemikalija: tvar ili smjesa.

CV75: procijenjena koncentracija koja pokazuje vijabilnost stanica od 75 %.

EC150: koncentracije koje pokazuju vrijednosti RFI od 150 u ekspresiji CD86.

EC200: koncentracije koje pokazuju vrijednosti RFI od 200 u ekspresiji CD54.

Protočna citometrija: citometrijska tehnika u kojoj stanice suspendirane u tekućini jedna po jedna protječu kroz fokus ekscitacijske svjetlosti koja se raspršuje u uzorcima koji se specifični za stanice i njihove komponente; stanice su često označene fluorescentnim biljezima tako da se svjetlost prvo apsorbira, a zatim emitira pri izmijenjenim frekvencijama.

Opasnost: intrinzično svojstvo nekog agensa ili stanje koje ima potencijal uzrokovanja štetnih učinaka kada su organizam, sustav ili (sub)populacija izloženi tom agensu.

IATA (engl. *Integrated Approach to Testing and Assessment* – integrirani pristup ispitivanju i procjeni): strukturiran pristup koji se primjenjuje za identifikaciju opasnosti (potencijal), karakterizaciju opasnosti (jakost) i/ili procjenu sigurnosti (potencijal/jakost i izloženost) kemikalije ili skupine kemikalija, kojim se na strateški način objedinjuju i ponderiraju svi relevantni podaci koji će služiti kao podloga za donošenje regulatornih odluka u vezi s potencijalnom opasnošću i/ili rizikom i/ili potrebom za daljnjim ciljnim, a time i minimalnim ispitivanjem.

Kontrola s medijem: netretirani ponovljeni uzorak koji sadržava sve sastavnice ispitnog sustava. Taj se uzorak obrađuje s uzorcima tretiranima ispitivanom kemikalijom i drugim kontrolnim uzorcima kako bi se utvrdilo je li otapalo/nosač u interakciji s ispitnim sustavom.

Smjesa: smjesa ili otopina koja se sastoji od dviju ili više tvari.

Tvar s jednim sastojkom: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je jedan glavni sastojak prisutan u koncentraciji od najmanje 80 % (w/w).

Tvar s više sastojaka: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je više od jednog glavnog sastojka prisutno u koncentraciji od 10 % (w/w) ili većoj te manjoj od 80 % (w/w). Tvar s više sastojaka rezultat je procesa proizvodnje. Smjesa i tvar s više sastojaka razlikuju se po tome što se smjesa dobiva miješanjem dviju ili više tvari bez kemijske reakcije. Tvar s više sastojaka rezultat je kemijske reakcije.

Pozitivna kontrola: ponovljeni uzorak koji sadržava sve komponente ispitnog sustava i tretiran je s tvari za koju je poznato da izaziva pozitivan odgovor. Kako bi se osigurala mogućnost procjene varijabilnosti odgovora pozitivne kontrole tijekom vremena, pozitivan odgovor ne bi smio biti presnažan.

Prehapteni: kemikalije koje abiotičkom pretvorbom postaju tvari koje izazivaju preosjetljivost.

Prohapteni: kemikalije kojima je potrebna enzimaska aktivacija da bi mogle pokazati potencijal izazivanja preosjetljivosti kože.

Relativni intenzitet fluorescencije (RFI): relativne vrijednosti geometrijske sredine intenziteta fluorescencije (MFI) kod stanica tretiranih kemikalijom u usporedbi s MFI-jem stanica tretiranih otapalom/nosačem.

Relevantnost: opis odnosa između ispitivanja i istraživnog učinka te je li ispitivanje prikladno i korisno za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri ispitivanjem točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje i razmatranje o točnosti (podudarnosti) ispitivanja (21.).

Pouzdanost: pokazuje u kojoj se mjeri ispitivanje može obnovljivo primijeniti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija tijekom vremena uz primjenu istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više njih te ponovljivosti unutar jednog laboratorija (21.).

Ciklus: ciklus se sastoji od jedne ispitivane kemikalije ili više njih koje se ispituju istodobno s kontrolom s otapalom/nosačem i pozitivnom kontrolom.

Osjetljivost: udio svih pozitivnih/aktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitivanja koje daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitivanja (21.).

Pufer za bojenje: fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom koja sadržava 0,1 % goveđeg serumskog albumina.

Kontrola s otapalom/nosačem: netretirani uzorak koji ne sadržava ispitivanu kemikaliju, ali sadržava sve ostale komponente ispitnog sustava te otapalo/nosač koji se upotrebljava u

ispitivanju. Upotrebljava se za utvrđivanje polaznog odgovora za uzorke koji se tretiraju ispitivanom kemikalijom otopljenom ili stabilno dispergiranom u istom otapalu/nosaču. Kada se ispituje s istodobnom kontrolom s medijem, taj uzorak isto tako pokazuje je li otapalo/nosač u interakciji s ispitnim sustavom.

Specifičnost: udio svih negativnih/neaktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitivanja koje daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitivanja (21.).

Tvar: kemijski element i njegovi spojevi u prirodnome stanju ili dobiveni proizvodnim postupkom, što uključuje i aditive koji su nužni za održavanje stabilnosti proizvoda te nečistoće koje proizlaze iz primijenjenoga postupka, ali isključuje otapala koja se mogu izdvojiti bez utjecaja na stabilnost tvari ili promjene njezina sastava.

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom metodom.

Globalno usklađeni sustav Ujedinjenih naroda za razvrstavanje i označivanje kemikalija (UN GHS): sustav za razvrstavanje kemikalija (tvari i smjesa) prema standardiziranim vrstama i stupnjevima fizičkih opasnosti i opasnosti za zdravlje i okoliš, kojim su obuhvaćena odgovarajuća komunikacijska sredstva kao što su piktogrami, oznake opasnosti, oznake upozorenja, oznake obavijesti i sigurnosno-tehnički listovi, kojima se prenose informacije o njihovim štetnim učincima u cilju zaštite ljudi (uključujući poslodavce, radnike, prijevoznike, potrošače i interventno osoblje) i okoliša (23.).

UVCB: tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi i biološki materijali.

Valjano ispitivanje: ispitivanje za koje se smatra da je dovoljno relevantno i pouzdano za određenu svrhu te koje se temelji na znanstveno utemeljenim načelima. ispitivanje nikada nije valjano u apsolutnom smislu nego samo u odnosu na određenu svrhu (21.).

Dodatak 1.2.**TVARI ZA DOKAZIVANJE TEHNIČKE OSPOSOBLJENOSTI**

Prije rutinske primjene ispitivanja opisanog u ovom Dodatku ispitnoj metodi B.71. laboratoriji bi trebali dokazati svoju tehničku osposobljenost tako što će za deset tvari preporučenih u tablici 1. dobiti očekivano predviđanje na temelju testa h-CLAT te za najmanje osam od deset tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti dobiti vrijednosti CV75, EC150 i EC200 koje su unutar odgovarajućeg referentnog raspona. Tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti izabrane su tako da predstavljaju niz odgovora povezanih s opasnostima od izazivanja preosjetljivosti kože. Ostali kriteriji za odabir uključivali su komercijalnu dostupnost tvari te dostupnost visokokvalitetnih *in vivo* referentnih podataka i visokokvalitetnih *in vitro* podataka dobivenih metodom h-CLAT. Isto tako, za metodu h-CLAT dostupni su objavljeni referentni podaci (3. i 14.).

Tablica 1.: Preporučene tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti za provedbu metode h-CLAT

Tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti	CAS br.	Agregatno stanje	Predviđanje <i>in vivo</i> ¹	Referentni raspon za CV75 u $\mu\text{g/ml}^2$	Rezultati testa h-CLAT za CD86 (referentni raspon za EC150 u $\mu\text{g/ml}$) ²	Rezultati testa h-CLAT za CD54 (referentni raspon za EC200 u $\mu\text{g/ml}$) ²
2,4-dinitroklorbenzen	97-00-7	Kruta tvar	Tvar koja izaziva preosjetljivost (ekstremno jaka)	2–12	Pozitivno (0,5–10)	Pozitivno (0,5–15)
4-fenilendiamin	106-50-3	Kruta tvar	Tvar koja izaziva preosjetljivost (jaka)	5–95	Pozitivno (< 40)	Negativno (> 1,5) ³
Niklov sulfat	10101-97-0	Kruta tvar	Tvar koja izaziva preosjetljivost (umjerena)	30–500	Pozitivno (< 100)	Pozitivno (10–100)
2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	Kruta tvar	Tvar koja izaziva preosjetljivost (umjerena)	30–400	Negativno (> 10) ³	Pozitivno (10–140)
R(+)-limonen	5989-27-5	Tekućina	Tvar koja izaziva preosjetljivost (slaba)	> 20	Negativno (> 5) ³	Pozitivno (< 250)
Imidazolidinil urea	39236-46-9	Kruta tvar	Tvar koja izaziva preosjetljivost (slaba)	25–100	Pozitivno (20–90)	Pozitivno (20–75)
Izopropanol	67-63-0	Tekućina	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	> 5000	Negativno (> 5 000)	Negativno (> 5 000)
Glicerol	56-81-5	Tekućina	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	> 5000	Negativno (> 5 000)	Negativno (> 5 000)
Mliječna kiselina	50-21-5	Tekućina	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	1500-5000	Negativno (> 5 000)	Negativno (> 5 000)

4-aminobenzojeva kiselina	150-13-0	Kruta tvar	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	> 1000	Negativno (> 1 000)	Negativno (> 1 000)
---------------------------	----------	------------	--	--------	------------------------	------------------------

Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima.

¹ Predviđanje opasnosti (i jakosti) *in vivo* temelji se na podacima dobivenima s pomoću analize LLNA (3. i 14.). Jakost *in vivo* utvrđena je prema kriterijima koje je predložio ECETOC (24.).

² Na temelju vrijednosti uočenih u prijašnjim ispitivanjima (13. i 25.).

³ U prijašnjim je ispitivanjima za taj biljeg dobivena većina negativnih rezultata i stoga se uglavnom očekuje negativan rezultat. Navedeni raspon utvrđen je na temelju nekoliko uočenih prijašnjih pozitivnih rezultata. Ako se dobije pozitivan rezultat, vrijednost EC treba biti unutar navedenog referentnog raspona.

Dodatak 2.**IZAZIVANJE PREOSJETLJIVOSTI KOŽE *IN VITRO*: TEST AKTIVIRANJA STANIČNE LINIJE U937 (U-SENS™)****POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA**

1. Testom U-SENS™ kvantificiraju se promjene u ekspresiji staničnih površinskih biljega povezanih s procesom aktiviranja monocita i dendritičnih stanica (DC) (tj. CD86) kod ljudske stanične linije histiocitnog limfoma U937, nakon izlaganja tvarima koje izazivaju preosjetljivost (1.). Izmjerene razine ekspresije staničnih površinskih biljega CD86 kod stanične linije U937 zatim se upotrebljavaju kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost.
2. Test U-SENS™ ocijenjen je u validacijskoj studiji (2.) kojom je koordinirao L'Oreal te ga je kasnije neovisno stručno pregledao Znanstveni savjetodavni odbor (ESAC) Referentnog laboratorija Europske unije za alternative ispitivanju na životinjama (EURL ECVAM) (3.). Uzimajući u obzir sve dostupne dokaze i informacije regulatornih tijela i dionika, EURL ECVAM je preporučio da se test U-SENS™ (4.) primjenjuje u okviru IATA-e kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost u svrhu razvrstavanja i označivanja prema opasnosti. U smjernicama za izvješćivanje o strukturiranim pristupima integraciji podataka i pojedinačnim izvorima informacija koji se upotrebljavaju u okviru IATA-e za preosjetljivost kože OECD trenutačno raspravlja o nizu studija slučaja u kojima se opisuju različite strategije ispitivanja i modeli predviđanja. Jedan od različitih utvrđenih pristupa temelji se na testu U-SENS (5.). Primjeri upotrebe podataka dobivenih testom U-SENS™ u kombinaciji s ostalim informacijama, uključujući prijašnje podatke i postojeće valjane podatke dobivene na ljudima (6.) navode se i u drugoj literaturi (4., 5. i 7.).
3. Pokazalo se da se test U-SENS™ može prenijeti u laboratorije koji imaju iskustva s tehnikama staničnih kultura i analizom protočnom citometrijom. Može se očekivati da će za predviđanja donesena s pomoću ovog testa razina obnovljivosti unutar jednog laboratorija biti reda veličine 90 %, a između više laboratorija 84 % (8.). Rezultati dobiveni u validacijskoj studiji (8.) i drugim objavljenim studijama (1.) ukupno pokazuju da, u usporedbi s rezultatima analize LLNA, točnost u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože (tj. kategorija 1. prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost iznosi 86 % (N = 166), uz osjetljivost od 91 % (118/129) i specifičnost od 65 % (24/37). U usporedbi s podacima dobivenima na ljudima, točnost u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost (tj. kategorija 1. prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost iznosi 77 % (N = 101) uz

osjetljivost od 100 % (58/58) i specifičnost od 47 % (20/43). U usporedbi s analizom LLNA, veća je vjerojatnost da će se metodom U-SENS™ dobiti lažno negativna predviđanja kod kemikalija koje pokazuju nisku do umjerenu jakost u izazivanju preosjetljivosti kože (tj. potkategorija 1.B prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) nego kod kemikalija koje pokazuju veliki potencijal izazivanja preosjetljivosti kože (tj. potkategorija 1.A prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) (1., 8. i 9.). Prethodno navedene informacije upućuju na korisnost testa U-SENS™ kao elementa koji pridonosi identifikaciji opasnosti od izazivanja preosjetljivosti kože. Međutim, navedene vrijednosti koje se odnose na točnost metode U-SENS™ kao samostalnog testa samo su okvirne jer je taj test potrebno kombinirati s drugim izvorima informacija u kontekstu IATA-e te u skladu s odredbama stavaka 7. i 8. iz odjeljka „Opći uvod”. Nadalje, pri ocjenjivanju metoda ispitivanja preosjetljivosti kože koje ne uključuju pokuse na životinjama potrebno je imati na umu da ispitivanje LLNA i druga ispitivanja na životinjama možda neće u potpunosti odražavati situaciju kod ljudi.

4. Na temelju podataka koji su trenutačno dostupni pokazalo se da je test U-SENS™ primjenjiv na ispitivane kemikalije (uključujući kozmetičke sastojke, npr. konzervanse, površinski aktivne tvari, aktivne tvari, boje) koje obuhvaćaju različite organske funkcionalne skupine, fizikalno-kemijska svojstva, jakost u izazivanju preosjetljivosti kože (kako je utvrđena u istraživanjima *in vivo*) i spektar mehanizama reakcije za koje je poznato da su povezani s preosjetljivošću kože (tj. Michaelov akceptor, nastanak Schiffovih baza, agens za prijenos acila, bimolekulska nukleofilna supstitucija [SN2] ili nukleofilna aromatska supstitucija [SNAr]) (1., 8., 9. i 10.). Test U-SENS™ primjenjiv je na ispitivane kemikalije koje su topljive ili tvore stabilnu disperziju (tj. koloid ili suspenziju u kojoj se ispitivana kemikalija ne taloži ili ne odvaja od otapala/nosača stvarajući različite faze) u odgovarajućem otapalu/nosaču (vidjeti stavak 13.). Za kemikalije u skupu podataka za koje je navedeno da su prehapteni (tj. tvari koje se aktiviraju oksidacijom) ili prohapteni (tj. tvari koje zahtijevaju enzimsku aktivaciju, na primjer enzimima P450) testom U-SENS™ dobivena su točna predviđanja (1. i 10.). Tvari koje djeluju disruptivno na membranu mogu dovesti do lažno pozitivnih rezultata zbog nespecifičnog povećanja ekspresije CD86, s obzirom na to da su tri lažno pozitivna rezultata od njih sedam, u odnosu na referentno razvrstavanje *in vivo*, dale površinski aktivne tvari (1.). Stoga bi pozitivne rezultate dobivene s površinski aktivnim tvarima trebalo uzeti u obzir s oprezom, dok bi se negativni rezultati i dalje mogli upotrebljavati kao pomoć u identifikaciji ispitivane kemikalije kao tvari koja ne izaziva preosjetljivost. Testom U-SENS™ mogu se ocijeniti fluorescentne ispitivane kemikalije (1.), ali snažne fluorescentne ispitivane kemikalije koje emitiraju na istoj valnoj duljini kao i fluorescein izotiocijanat (FITC) ili propidijev jodid (PI) ometat će otkrivanje protočnom citometrijom i stoga se ne mogu točno ocijeniti upotrebom protutijela konjugiranih FITC-om (potencijalno lažno negativni rezultati) ili propidijevim jodidom (ne može se izmjeriti vijabilnost). U tom

se slučaju mogu upotrijebiti druga protutijela označena fluorokromom ili drugi biljezi citotoksičnosti pod uvjetom da se može dokazati da daju slične rezultate kao i protutijela označena FITC-om ili propidijev jodid (vidjeti stavak 18.), npr. ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz Dodatka 2.2. S obzirom na navedeno, pozitivne rezultate s površinski aktivnim tvarima i negativne rezultate s jako fluorescentnim ispitivanim kemikalijama trebalo bi tumačiti u kontekstu navedenih ograničenja i zajedno s drugim izvorima informacija u okviru IATA-e. U slučajevima u kojima postoje dokazi da se test U-SENSTM ne može primijeniti za ispitivanje drugih specifičnih kategorija ispitivanih kemikalija, taj test ne bi trebalo upotrebljavati za te specifične kategorije.

5. Kao što je opisano, test U-SENSTM pomaže u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost. Međutim, ako se upotrebljava u okviru integriranih pristupa kao što je IATA, mogao bi pridonijeti i procjeni jačine izazivanja preosjetljivosti. Ipak, kako bi se moglo utvrditi na koji bi način rezultati dobiveni testom U-SENSTM mogli pomoći u toj procjeni, potreban je dodatan rad, koji će se po mogućnosti temeljiti na podacima dobivenima na ljudima.
6. Definicije su navedene u Dodatku 2.1.

NAČELO ISPITIVANJA

7. Test U-SENSTM je analiza *in vitro* kojom se kvantificiraju promjene u ekspresiji staničnih površinskih biljega CD86 na ljudskoj staničnoj liniji histiocitnog limfoma, stanicama U937, nakon izlaganja ispitivanoj kemikaliji 45 ± 3 h. Površinski biljeg CD86 jedan je tipični biljeg aktivacije stanica U937. Poznato je da je CD86 kostimulacijska molekula koja može oponašati aktiviranje monocita, koje ima ključnu ulogu u stimulaciji T-stanica. Promjene u ekspresiji staničnih površinskih biljega CD86 mjere se protočnom citometrijom nakon bojenja stanica, obično protutijelima označenima fluorescein izotiocijanatom (FITC). Istodobno se provodi i mjerenje citotoksičnosti (npr. upotrebom propidijeva jodida) kako bi se procijenilo dolazi li do povećanja ekspresije staničnih površinskih biljega CD86 pri subcitotoksičnim koncentracijama. Računa se indeks stimulacije (S.I.) staničnih površinskih biljega CD86 u usporedbi s kontrolom s otapalom/nosačem te se on upotrebljava u modelu predviđanja (vidjeti stavak 19.) kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost.

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

8. Prije rutinske primjene ispitivanja opisanog u ovom Dodatku ispitnoj metodi B.71. laboratoriji bi trebali dokazati svoju tehničku osposobljenost upotrebom deset tvari za

dokazivanje tehničke osposobljenosti navedenih u Dodatku 2.2. u skladu s dobrom praksom za metode *in vitro* (11.). Osim toga, korisnici ispitivanja trebaju održavati bazu prijašnjih podataka dobivenih provjerama reaktivnosti (vidjeti stavak 11.) te s pozitivnim kontrolama i kontrolama s otapalom/nosačem (vidjeti stavke 15. i 16.) i trebaju se koristiti tim podacima kako bi potvrdili da je njihov laboratorij održao obnovljivost ispitivanja tijekom vremena.

POSTUPAK

9. Ovaj se test temelji na protokolu U-SENSTM DB-ALM (usluga baze podataka o alternativnim metodama pokusima na životinjama) br. 183 (12.). Pri provedbi i primjeni testa U-SENSTM u laboratoriju treba primjenjivati standardne operativne postupke (SOP). Za provedbu testa U-SENSTM može se koristiti i automatizirani sustav ako se može pokazati da on daje slične rezultate, na primjer, ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz Dodatka 2.2. U nastavku su opisane glavne komponente i postupci za test U-SENSTM.

Priprema stanica

10. Za provedbu testa U-SENSTM treba upotrebljavati U937, ljudsku staničnu liniju histiocitnog limfoma (13.). Stanice (klon CRL1593.2) treba nabaviti iz kompetentne banke stanica kao što je American Type Culture Collection.
11. Stanice U937 uzgajaju se na 37 °C s 5 % CO₂ i u vlažnim atmosferskim uvjetima u mediju RPMI-1640 obogaćenom s 10 % fetalnog telećeg seruma (FCS), 2 mM L-glutamina, 100 jedinica/ml penicilina i 100 µg/ml streptomicina (potpuni medij). Stanice U937 rutinski se pasažiraju svaka 2–3 dana pri gustoći od 1,5 ili 3×10^5 stanica/ml. Gustoća stanica ne bi trebala biti veća od 2×10^6 stanica/ml, a vijabilnost stanica izmjerena izbacivanjem tripanskog modrila treba biti ≥ 90 % (ne primjenjuje se kod prve pasaže nakon odmrzavanja). Prije njihove upotrebe za ispitivanje treba provjeriti ispunjava li svaka šarža stanica, FCS-a ili protutijela zadane kriterije provjerom reaktivnosti. Provjeru reaktivnosti stanica treba provesti upotrebom pozitivne kontrole, 2,4,6-trinitrobenzensulfonske kiseline (TNBS) (CAS br. 2508-19-2, čistoće ≥ 99 %) i negativne kontrole, mliječne kiseline (LA) (CAS br. 50-21-5, čistoće ≥ 85 %), barem jedan tjedan nakon odmrzavanja. U provjeri reaktivnosti treba ispitati šest konačnih koncentracija za svaku od dviju kontrola (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 µg/ml te LA: 1, 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml). TNBS otopljen u potpunom mediju treba dati pozitivan odgovor za CD86 koji je povezan s koncentracijom (npr. kada pozitivnu koncentraciju, indeks stimulacije za CD86 ≥ 150 , prati koncentracija s rastućim indeksom stimulacije za CD86), a mliječna kiselina otopljena u potpunom mediju treba dati negativan odgovor za CD86 (vidjeti stavak 21.). Za test treba upotrebljavati samo šaržu stanica koja je dvaput prošla provjeru reaktivnosti. Stanice se mogu

razmnožavati do sedam tjedana nakon odmrzavanja. Broj pasaža ne bi trebao biti veći od 21. Reaktivnost treba provjeriti u skladu s postupcima opisanim u stavcima od 18. do 22.

12. Za ispitivanje se stanice U937 nasađuju pri gustoći od 3×10^5 stanica/ml ili 6×10^5 stanica/ml te se prethodno uzgajaju u tikvicama s kulturom dva dana ili jedan dan. Mogu se upotrebljavati drugačiji uvjeti za prethodni uzgoj od prethodno opisanih ako se navede dovoljno dobro znanstveno obrazloženje i ako se može pokazati da oni daju slične rezultate, na primjer, ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz Dodatka 2.2. Na dan ispitivanja stanice izdvojene iz tikvice s kulturom ponovno se suspendiraju svježim medijem za uzgoj kultura pri gustoći od 5×10^5 stanica/ml. Stanice se zatim distribuiraju na ploču s 96 jažica s ravnim dnom sa 100 μ l (konačna gustoća stanica od $0,5 \times 10^5$ stanica/jažici).

Priprema ispitivanih kemikalija i kontrolnih tvari

13. Prije ispitivanja procjenjuje se topljivost. U tu se svrhu ispitivane kemikalije otapaju ili stabilno dispergiraju pri koncentraciji od 50 mg/ml u potpunom mediju kao prvoj opciji za otapalo ili dimetil sulfoksidu (DMSO, čistoće $\geq 99\%$) kao drugoj opciji za otapalo/nosač ako ispitivana kemikalija nije topljiva u potpunom mediju kao otapalu/nosaču. Za ispitivanje se ispitivana kemikalija otapa do konačne koncentracije od 0,4 mg/ml u potpunom mediju ako je kemikalija topljiva u tom otapalu/nosaču. Ako je kemikalija topljiva samo u DMSO-u, kemikalija se otapa do koncentracije od 50 mg/ml. Mogu se upotrebljavati i druga otapala/nosači ako se navede dovoljno dobro znanstveno obrazloženje. Treba uzeti u obzir stabilnost ispitivane kemikalije u konačnom otapalu/nosaču.
14. Ispitivane kemikalije i kontrolne tvari pripremaju se na dan ispitivanja. Budući da se ne provodi test za utvrđivanje doze, u prvom ciklusu treba ispitati šest konačnih koncentracija (1, 10, 20, 50, 100 i 200 μ g/ml) u odgovarajućem otapalu/nosaču, odnosno potpunom mediju ili 0,4-postotnom DMSO-u u mediju. U naknadnim se ciklusima pripremaju barem četiri radne otopine ispitivane kemikalije (tj. barem četiri koncentracije) upotrebom odgovarajućeg otapala/nosača, počevši od 0,4 mg/ml u potpunom mediju ili 50 mg/ml u DMSO-u. Radne otopine naposljetku se koriste za tretiranje dodavanjem volumena suspenzije stanica U937 (vidjeti prethodni stavak 11.) koji je jednak volumenu radne otopine na ploči kako bi se dobilo dodatno dvostruko razrjeđenje (12.). Koncentracije (najmanje četiri koncentracije) za daljnje cikluse odabiru se na temelju pojedinačnih rezultata svih prethodnih ciklusa (8.). Mogu se upotrebljavati konačne koncentracije od 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 i 200 μ g/ml. Najveća konačna koncentracija iznosi 200 μ g/ml. Ako se pri koncentraciji od 1 μ g/ml uoči pozitivna vrijednost za CD86, ocjenjuje se 0,1 μ g/ml kako bi se pronašla koncentracija ispitivane kemikalije koja ne inducira CD86 veći od pozitivnog praga. Za

svaki se ciklus računa EC150 (koncentracija pri kojoj kemikalija dosegne pozitivni prag za CD86 od 150 %, vidjeti stavak 19.) ako se uoči pozitivan odgovor na koncentraciju za CD86. Ako ispitivana kemikalija inducira pozitivan odgovor za CD86 koji nije povezan s koncentracijom, izračun vrijednosti EC150 možda neće biti relevantan, kako je opisano u protokolu U-SENS™ DB-ALM br. 183 (12.). Za svaki se ciklus računa CV70 (koncentracija pri kojoj kemikalija dosegne prag citotoksičnosti od 70 %, vidjeti stavak 19.) kad god je to moguće (12.). Kako bi se istražio učinak odgovora na koncentraciju kod povećanja CD86, treba odabrati bilo koje koncentracije od upotrebljivih koncentracija koje su ravnomjerno raspoređene od EC150 (ili najveće koncentracije kod koje je CD86 negativan i koja nije citotoksična) do CV70 (ili najveće dopuštene koncentracije, tj. 200 µg/ml). Treba ispitati najmanje četiri koncentracije po ciklusu pri čemu barem dvije koncentracije trebaju biti iste kao i u prethodnom ciklusu radi usporedbe.

15. Kao kontrola s otapalom/nosačem u testu U-SENS™ upotrebljava se potpuni medij (za otopljene ili stabilno dispergirane ispitivane kemikalije) (vidjeti stavak 4.) ili 0,4-postotni DMSO u potpunom mediju (za ispitivane kemikalije otopljene ili stabilno dispergirane u DMSO-u).
16. Kao pozitivna kontrola u testu U-SENS™ upotrebljava se TNBS (vidjeti stavak 11.) pripremljen u potpunom mediju. TNBS treba upotrebljavati kao pozitivnu kontrolu za mjerenje ekspresije CD86 pri jednoj konačnoj koncentraciji na ploči (50 µg/ml) koja daje vijabilnost stanica > 70 %. Kako bi se na ploči dobila koncentracija TNBS-a od 50 µg/ml, priprema se glavna otopina TNBS-a od 1 M (tj. 293 mg/ml) u potpunom mediju, koja se dodatno razrjeđuje 2 930 puta potpunim medijem kako bi se dobila radna otopina od 100 µg/ml. Kao negativnu kontrolu treba upotrebljavati mliječnu kiselinu (LA, CAS 50-21-5) koncentracije 200 µg/ml, otopljenu u potpunom mediju (iz glavne otopine od 0,4 mg/ml). Na svakoj ploči svakog ciklusa pripremaju se tri ponavljanja netretirane kontrole s potpunim medijem, kontrole s otapalom/nosačem, negativne i pozitivne kontrole (12.). Mogu se upotrijebiti druge prikladne pozitivne kontrole, pod uvjetom da su dostupni prijašnji podaci na temelju kojih se mogu odrediti usporedivi kriteriji prihvatljivosti ciklusa. Kriteriji prihvatljivosti ciklusa isti su kao i oni opisani za ispitivanu kemikaliju (vidjeti stavak 12.).

Primjena ispitivanih kemikalija i kontrolnih tvari

17. Kontrola s otapalom/nosačem ili radne otopine opisane u stavcima od 14. do 16. miješaju se u omjeru 1 : 1 (v/v) sa suspenzijama stanica pripremljenima na ploči s 96 jažica s ravnim dnom (vidjeti stavak 12.). Tretirane se ploče potom inkubiraju 45 ± 3 h na temperaturi od 37 °C s 5 % CO₂. Ploče se prije inkubacije zatvaraju polupropusnom

membranom kako bi se spriječilo isparavanje hlapljivih ispitivanih kemikalija i unakrsna kontaminacija stanica tretiranih ispitivanim kemikalijama (12.).

Bojenje stanica

18. Nakon izlaganja od 45 ± 3 h stanice se prenose u mikrotitracijsku ploču u obliku slova „v” i prikupljaju centrifugiranjem. Interferencija s topljivošću definira se kao uočavanje kristala ili kapljica upotrebom mikroskopa 45 ± 3 h nakon tretiranja (prije bojenja stanica). Supernatanti se odbacuju, a preostale stanice ispiru se jednom sa 100 μ l vrlo hladne fiziološke otopine puferirane fosfatnim puferom (PBS) koja sadržava 5 % fetalnog telećeg seruma (pufer za bojenje). Nakon centrifugiranja stanice se ponovno suspendiraju sa 100 μ l pufera za bojenje i boje s 5 μ l (npr. 0,25 μ g) protutijela anti-CD86 ili mišjih protutijela IgG1 (izotip) označenih FITC-om na 4 °C u trajanju od 30 minuta, zaštićeno od svjetla. Treba upotrebljavati protutijela opisana u protokolu U-SENS™ DB-ALM br. 183 (12.) (za CD86: BD-PharMingen #555657 klon: Fun-1, ili Caltag/Invitrogen # MHCD8601 klon: BU63; a za IgG1: BD-PharMingen #555748 ili Caltag/Invitrogen # GM4992). Na temelju iskustva subjekata koji su razvili ispitivanje intenzitet fluorescencije protutijela obično je dosljedan među različitim serijama. Za test se mogu upotrebljavati i drugi klonovi ili dobavljači protutijela koji su prošli provjeru reaktivnosti (vidjeti stavak 11.). Međutim, korisnici mogu razmotriti titraciju protutijela u uvjetima svojeg laboratorija kako bi utvrdili koju je koncentraciju najbolje upotrebljavati. Mogu se koristiti i drugi detekcijski sustavi, npr. protutijela anti-CD86 označena fluorokromom, ako se može pokazati da daju slične rezultate kao i protutijela konjugirana FITC-om, na primjer, ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz Dodatka 2.2. Nakon ispiranja sa 100 μ l pufera za bojenje dva puta i jednom sa 100 μ l vrlo hladnog PBS-a, stanice se ponovno suspendiraju u vrlo hladnom PBS-u (npr. 125 μ l za uzorke koji se analiziraju ručno u pojedinačnim epruvetama ili 50 μ l ako se upotrebljava ploča za automatsko uzorkovanje) i dodaje se otopina propidijeva jodida (konačna koncentracija od 3 μ g/ml). Mogu se koristiti i drugi biljezi citotoksičnosti, kao što su 7-aminoaktinomicin D (7-AAD) ili tripansko modriilo, ako se može pokazati da alternativna bojila daju slične rezultate kao i propidijev jodid, na primjer, ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz Dodatka 2.2.

Analiza protočnom citometrijom

19. Razina ekspresije CD86 i vijabilnost stanica analiziraju se upotrebom protočne citometrije. Stanice se prikazuju u točkastom dijagramu s veličinom (FSC) i granularnošću (SSC) na logaritamskoj skali kako bi se jasno identificirala populacija u prvim vratima R1 i uklonili ostaci. Za svaku se jažicu nastoji očitati ukupno 10 000 stanica u vratima R1. Stanice iz istih vrata R1 prikazuju se u FL3 ili FL4/SSC točkastom dijagramu. Žive stanice ograničavaju se postavljanjem drugih vrata R2 kojima se odabire populacija stanica

negativnih na propidijev jodid (kanal FL3 ili FL4). Vijabilnost stanica može se izračunati tako da se u programu za analizu citometra upotrijebi sljedeća jednadžba. Ako je vijabilnost stanica niska, može se očitati do 20 000 stanica, uključujući mrtve stanice. Umjesto toga, podaci se mogu očitavati jednu minutu nakon početka analize.

$$\text{vijabilnost stanica} = \frac{\text{broj živih stanica}}{\text{ukupan broj očitanih stanica}} \times 100$$

Zatim se među tim živim stanicama ograničenima na vratima R2 (unutar R1) mjeri postotak pozitivnih stanica u kanalu FL1. Stanična površinska ekspresija za CD86 analizira se u FL1/SSC točkastom dijagramu ograničenom na žive stanice (R2).

Za jažice koje sadržavaju potpuni medij/IgG1 marker za analizu postavlja se blizu glavne populacije tako da je IgG1 kontrola s potpunim medijem unutar ciljanog područja od 0,6 do 0,9 %.

Interferencija s bojom definira se kao pomak u točkastom dijagramu za IgG1 označen FITC-om (IgG1 FL1 Geo srednja vrijednost S.I. ≥ 150 %).

Indeks stimulacije (S.I.) za CD86 za kontrolne stanice (netretirane ili u 0,4-postotnom DMSO-u) i stanice tretirane kemikalijama računa se u skladu sa sljedećom jednadžbom:

$$S.I. = \frac{\% CD86^{+} \text{ tretiranih stanica} - \% IgG1^{+} \text{ tretiranih stanica}}{\% CD86^{+} \text{ kontrolnih stanica} - \% IgG1^{+} \text{ kontrolnih stanica}} \times 100$$

% IgG1⁺ netretiranih kontrolnih stanica: odnosi se na postotak pozitivnih stanica IgG1 u kanalu FL1 koje se definiraju markerom za analizu (prihvaćeni raspon od $\geq 0,6$ % do $< 1,5$ %, vidjeti stavak 22.) među živim netretiranim stanicama.

% IgG1⁺/CD86⁺ kontrolnih/tretiranih stanica: odnosi se na postotak pozitivnih stanica IgG1/CD86 u kanalu FL1 koji se mjeri bez pomicanja markera za analizu među živim kontrolnim/tretiranim stanicama.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Procjena podataka

20. U testu U-SENSTM računaju se sljedeći parametri: vrijednost CV70, tj. koncentracija koja pokazuje preživljavanje stanica U937 od 70 % (citotoksičnost od 30 %), i vrijednost EC150, tj. koncentracija pri kojoj su ispitivane kemikalije inducirale indeks stimulacije (S.I.) za CD86 od 150 %.

CV70 se računa log-linearnom interpolacijom, upotrebom sljedeće jednadžbe:

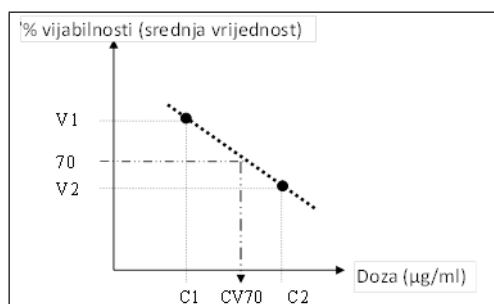
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

pri čemu je:

V1 najmanja vrijednost vijabilnosti stanica koja je veća od 70 %;

V2 najveća vrijednost vijabilnosti stanica koja je manja od 70 %;

C1 i C2 su koncentracije koje pokazuju vrijednost vijabilnosti stanica V1 odnosno V2.



Mogu se upotrebljavati i drugi pristupi za izvođenje vrijednosti CV70 pod uvjetom da se dokaže da to ne utječe na rezultate (npr. ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti).

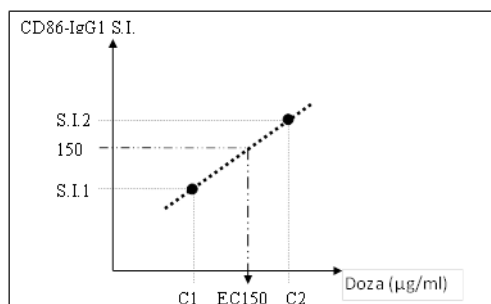
EC150 se računa log-linearnom interpolacijom, upotrebom sljedeće jednadžbe:

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

pri čemu je:

C1 = najviša koncentracija u µg/ml kod koje je S.I. za CD86 < 150 % (S.I. 1)

C2 = najniža koncentracija u µg/ml kod koje je S.I. za CD86 ≥ 150 % (S.I. 2).



Vrijednosti EC150 i CV70 računaju se:

- za svaki ciklus: pojedinačne vrijednosti EC150 i CV70 upotrebljavaju se kao alati za ispitivanje učinka odgovora na koncentraciju kod povećanja CD86 (vidjeti stavak 14.),
- na temelju prosječnih vijabilnosti utvrđuje se ukupni CV70 (12.),

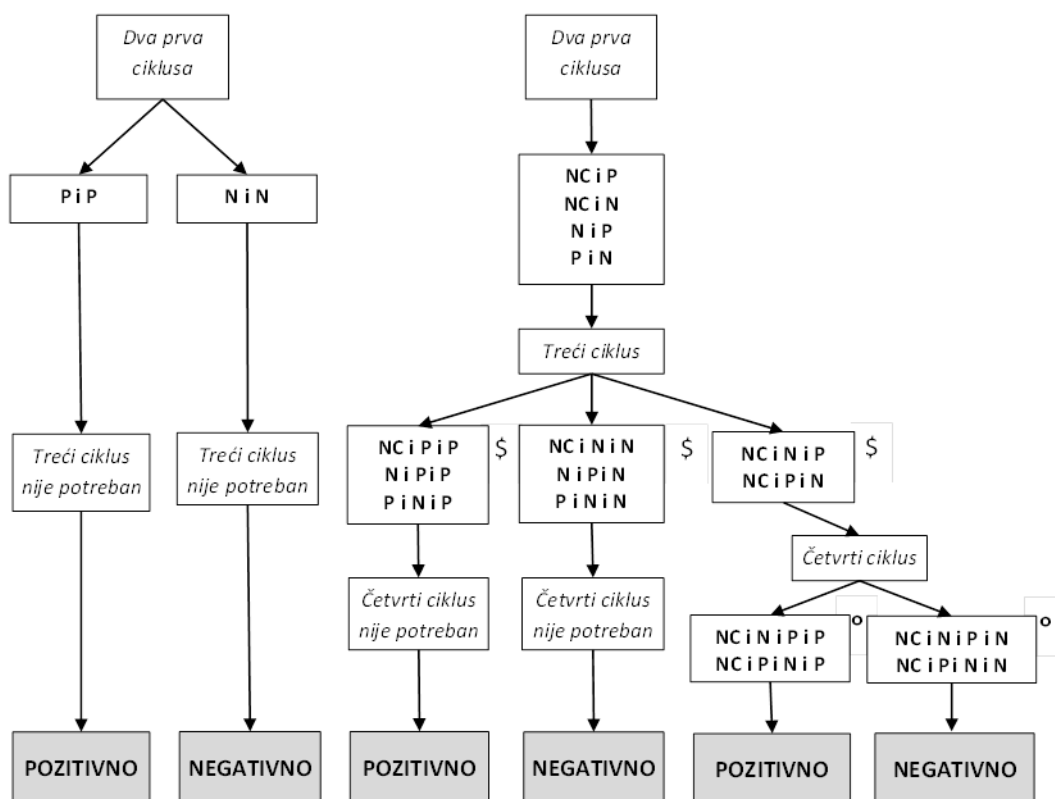
- na temelju prosječnog indeksa stimulacije vrijednosti CD86 utvrđuje se ukupni EC150 za ispitivanu kemikaliju za koju se testom U-SENS™ predvidi da je POZITIVNA (vidjeti stavak 21.) (12.).

Model predviđanja

21. Kod mjerenja ekspresije CD86 svaka ispitivana kemikalija ispituje se primjenom najmanje četiri koncentracije i u najmanje dva neovisna ciklusa (koji se provode na različite dane) kako bi se izvelo jedno predviđanje (NEGATIVNO ili POZITIVNO).

- Pojedinačni zaključak ciklusa U-SENS™ smatra se negativnim (dalje u tekstu „N”) ako je indeks stimulacije za CD86 manji od 150 % pri svim koncentracijama koje nisu citotoksične (vijabilnost stanica $\geq 70\%$) i ako se ne uoči nikakva interferencija (citotoksičnost, topljivost: vidjeti stavak 18. ili boja: vidjeti stavak 19., neovisno o necitotoksičnim koncentracijama pri kojima se opazi interferencija). U svim ostalim slučajevima: pojedinačni zaključak ciklusa U-SENS™ smatra se pozitivnim (dalje u tekstu „P”) ako je indeks stimulacije za CD86 jednak ili veći od 150 % i/ili ako se uoče interferencije.
- Predviđanje na temelju testa U-SENS™ smatra se NEGATIVNIM ako su negativna (N) barem dva neovisna ciklusa (slika 1.). Ako su prva dva ciklusa negativna (N), predviđanje na temelju testa U-SENS™ smatra se NEGATIVNIM i ne mora se provoditi treći ciklus.
- Predviđanje na temelju testa U-SENS™ smatra se POZITIVNIM ako su pozitivna (P) barem dva neovisna ciklusa (slika 1.). Ako su prva dva ciklusa pozitivna (P), predviđanje na temelju testa U-SENS™ smatra se POZITIVNIM i ne mora se provoditi treći ciklus.
- Budući da se ne provodi test za utvrđivanje doze primjenjuje se iznimka ako je u prvom ciklusu indeks stimulacije za CD86 jednak ili veći od 150 % samo pri najvišoj necitotoksičnoj koncentraciji. Smatra se da ciklus tada NIJE JEDNOZNAČAN (NC) i u dodatnim ciklusima treba ispitati dodatne koncentracije (između najviše koncentracije koja ne uzrokuje citotoksičnost i najniže koncentracije koja uzrokuje citotoksičnost – vidjeti stavak 20.). Ako se ciklus identificira kao NC, treba provesti barem dva dodatna ciklusa, a i četvrti ciklus ako drugi i treći nisu usklađeni (neovisno N i/ili P) (slika 1.). Naknadni ciklusi smatraju se pozitivnima čak i ako samo jedna necitotoksična koncentracija pokaže CD86 jednak ili veći od 150 % jer je postavka koncentracije prilagođena za specifičnu ispitivanu kemikaliju. Konačno predviđanje temeljit će se na većinskom rezultatu iz tri ili četiri pojedinačna ciklusa (tj. dva od tri ili dva od četiri) (slika 1.).

Slika 1.: Model predviđanja koji se upotrebljava u testu U-SENS™. Predviđanje na temelju testa U-SENS™ trebalo bi razmatrati u okviru IATA-e i u skladu s odredbama stavka 4. te stavaka 7., 8. i 9. iz odjeljka „Opći uvod”.



N: ciklus u kojem nije uočen pozitivan CD86 ili interferencija.

P: ciklus u kojem je uočen pozitivan CD86 i/ili interferencija.

NC: nije jednoznačno. Nije jednoznačno u prvom ciklusu ako je CD86 pozitivan samo pri najvišoj koncentraciji koja nije citotoksična.

#: pojedinačni zaključak koji nije jednoznačan (NC) koji se pripiše samo prvom ciklusu automatski podrazumijeva da je potreban treći ciklus kako bi se dobio većinski pozitivan (P) ili negativan (N) zaključak u barem dva od tri neovisna ciklusa.

\$: u okvirima su prikazane relevantne kombinacije rezultata iz tri ciklusa na temelju rezultata dobivenih u prva dva ciklusa prikazana u prethodnom okviru.

°: u okvirima su prikazane relevantne kombinacije rezultata iz četiri ciklusa na temelju rezultata dobivenih u prva tri ciklusa prikazana u prethodnom okviru.

Kriteriji prihvatljivosti

22. Sljedeći bi kriteriji prihvatljivosti trebali biti ispunjeni kada se primjenjuje test U-SENS™ (12.).

- Na kraju razdoblja izlaganja od 45 ± 3 h srednja vijabilnost kod tri ponavljanja netretiranih stanica U937 morala je biti $> 90 \%$ i bez uočenog pomaka u ekspresiji CD86. Bazalna ekspresija CD86 kod netretiranih stanica U937 morala je biti u rasponu od $\geq 2 \%$ do $\leq 25 \%$.

- Ako se kao otapalo upotrebljava DMSO, valjanost kontrole s nosačem DMSO procjenjuje se računanjem indeksa stimulacije za DMSO u usporedbi s netretiranim stanicama i srednja vijabilnost u tri ponavljanja stanica morala je biti $> 90 \%$. Kontrola s nosačem DMSO valjana je ako je srednja vrijednost S.I. za CD86 u tri ponavljanja bila manja od 250% srednje vrijednosti S.I. u tri ponavljanja za CD86 netretiranih stanica U937.
- Ciklusi se smatraju valjanima ako su barem dvije od tri vrijednosti IgG1 netretiranih stanica U937 bile u rasponu od $\geq 0,6 \%$ do $< 1,5 \%$.
- Istodobno ispitana negativna kontrola (mliječna kiselina) smatra se valjanom ako su barem dva od tri ponavljanja bila negativna (S.I. za CD86 $< 150 \%$) i necitotoksična (vijabilnost stanica $\geq 70 \%$).
- Pozitivna kontrola (TNBS) smatrala se valjanom ako su barem dva od tri ponavljanja bila pozitivna (S.I. za CD86 $\geq 150 \%$) i necitotoksična (vijabilnost stanica $\geq 70 \%$).

Izvešće o ispitivanju

23. Izvešće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija

Tvar s jednim sastojkom:

- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,
- fizički izgled, topljivost u potpunom mediju, topljivost u DMSO-u, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),
- ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- obrazloženje za odabir otapala/nosača za svaku ispitivanu kemikaliju.

Tvar s više sastojaka, UVCB tvar i smjesa:

- opisane koliko god je to moguće npr. kemijskim identitetom (vidjeti prethodno), čistoćom, količinskom zastupljenošću i relevantnim fizikalno-kemijskim svojstvima sastojaka (vidjeti prethodno), u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- fizički izgled, topljivost u potpunom mediju, topljivost u DMSO-u te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

- molekularna masa ili prividna molekularna masa u slučaju smjesa/polimera poznatog sastava ili druge informacije koje su relevantne za provođenje studije,
- obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),
- ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- obrazloženje za odabir otapala/nosača za svaku ispitivanu kemikaliju.

Kontrole

Pozitivna kontrola:

- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,
- fizički izgled, topljivost u DMSO-u, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni i ako je primjenjivo,
- čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),
- ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- upućivanje na rezultate koji se odnose na prijašnje pozitivne kontrole i pokazuju primjerenost kriterija prihvatljivosti ciklusa, ako je primjenjivo.

Negativna kontrola i kontrola s otapalom/nosačem:

- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,
- čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- fizički izgled, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva u slučaju da su upotrijebljene kontrole s otapalom/nosačem koje nisu navedene u smjernici za ispitivanje, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- obrazloženje za odabir otapala/nosača za svaku ispitivanu kemikaliju.

Ispitni uvjeti:

- naziv i adresa naručitelja, ustanove koja provodi ispitivanje i voditelja istraživanja,

- opis upotrijebljenog ispitivanja,
- upotrijebljena stanična linija, uvjeti njezina skladištenja i izvor (npr. objekt iz kojeg su dobiveni),
- upotrijebljena protočna citometrija (npr. model), uključujući upotrijebljene postavke instrumenta, protutijela i biljege citotoksičnosti,
- postupak koji je primijenjen za dokazivanje osposobljenosti laboratorija za izvođenje ispitivanja ispitivanjem tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti te postupak koji je primijenjen za dokazivanje obnovljive primjene ispitivanja tijekom vremena, npr. podaci o prijašnjim kontrolama i/ili prijašnjim provjerama reaktivnosti.

Kriteriji prihvatljivosti ispitivanja:

- vijabilnost stanica i vrijednosti indeksa stimulacije za CD86 dobivene kontrolom s otapalom/nosačem u usporedbi s rasponima prihvatljivosti,
- vijabilnost stanica i vrijednosti indeksa stimulacije dobivene pozitivnom kontrolom u usporedbi s rasponima prihvatljivosti,
- vijabilnost stanica svih ispitanih koncentracija ispitane kemikalije.

Ispitni postupak:

- broj upotrijebljenih ciklusa,
- koncentracije ispitivane kemikalije, primjena i vrijeme izloženosti (ako je drukčije od preporučenog),
- trajanje izlaganja,
- opis primijenjenih kriterija ocjenjivanja i odlučivanja,
- opis mogućih izmjena ispitnog postupka.

Rezultati:

- tablični prikaz podataka, uključujući CV70 (ako je primjenjivo), indeks stimulacije, vrijednosti vijabilnosti stanica, vrijednosti EC150 (ako je primjenjivo) dobivene za ispitivanu kemikaliju i za pozitivnu kontrolu u svakom ciklusu te klasifikacija ispitivane kemikalije prema modelu predviđanja,
- opis svih drugih relevantnih opažanja, ako je primjenjivo.

Rasprava o rezultatima:

- rasprava o rezultatima dobivenima testom U-SENS™,

- rasprava o rezultatima ispitivanja u kontekstu IATA-e ako su dostupni drugi relevantni podaci.

Zaključci

LITERATURA

1. Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901.–916.
2. EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Dostupno na: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations.
3. EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28178 EN; doi 10.2787/815737. Dostupno na: [\[http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705\]](http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705).
4. EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28553 EN; doi 10.2760/588955. Dostupno na: <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/euro-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing>.
5. Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014. *Cosmetics* 3, 14.
6. OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz. Dostupno na: [\[http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm\]](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm).
7. Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337.–351.
8. Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373.–382.

9. Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259.–270.
10. Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683.–1696.
11. OECD. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz. Dostupno na: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf.
12. DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENSTM), 33pp. Dostupno na: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].
13. Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565.–577.
14. OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz. Dostupno na: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
15. Ujedinjeni narodi (UN) (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: United Nations Publications. Dostupno na: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
16. OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz. Dostupno na: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
17. ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology &

Toxicology of Chemicals, Bruxelles. Dostupno na:
[https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETO
C_2003-TR87.pdf](https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETO
C_2003-TR87.pdf).

Dodatak 2.1.

DEFINICIJE

Točnost: stupanj podudarnosti između rezultata ispitivanja i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Ona je mjerilo učinkovitosti ispitivanja i jedan od aspekata relevantnosti. Pojam je često međusobno zamjenjiv s pojmom „podudarnost” u smislu udjela točnih ishoda ispitivanja (14.).

AOP (engl. *Adverse Outcome Pathway* – put nastanka štetnog ishoda): slijed događaja od kemijske strukture ciljne kemikalije ili skupine sličnih kemikalija preko početnog molekularnog događaja do *in vivo* štetnog ishoda (15.).

Odgovor na koncentraciju CD86: ovisnost o koncentraciji (ili odgovor na koncentraciju) postoji ako pozitivnu koncentraciju (S.I. za CD86 ≥ 150) prati koncentracija s rastućim indeksom stimulacije za CD86.

Kemikalija: tvar ili smjesa.

CV70: procijenjena koncentracija koja pokazuje vijabilnost stanica od 70 %.

Pomak: pomak se definira na sljedeći način: i. ispravljena vrijednost % CD86⁺ netretiranog kontrolnog ponavljanja 3 manja je od 50 % srednje ispravljene vrijednosti % CD86⁺ netretiranih kontrolnih ponavljanja 1 i 2 i ii. ispravljena vrijednost % CD86⁺ negativnog kontrolnog ponavljanja 3 manja je od 50 % srednje ispravljene vrijednosti % CD86⁺ negativnih kontrolnih ponavljanja 1 i 2.

EC150: procijenjene koncentracije koje pokazuju 150 % indeksa stimulacije ekspresije CD86.

Protočna citometrija: citometrijska tehnika u kojoj stanice suspendirane u tekućini jedna po jedna protječu kroz fokus ekscitacijske svjetlosti koja se raspršuje u uzorcima koji se specifični za stanice i njihove komponente; stanice su često označene fluorescentnim biljezima tako da se svjetlost prvo apsorbira, a zatim emitira pri izmijenjenim frekvencijama.

Opasnost: intrinzično svojstvo nekog agensa ili stanje koje ima potencijal uzrokovanja štetnih učinaka kada su organizam, sustav ili (sub)populacija izloženi tom agensu.

IATA (engl. *Integrated Approach to Testing and Assessment* – integrirani pristup ispitivanju i procjeni): strukturiran pristup koji se primjenjuje za identifikaciju opasnosti (potencijal), karakterizaciju opasnosti (jakost) i/ili procjenu sigurnosti (potencijal/jakost i izloženost) kemikalije ili skupine kemikalija, kojim se na strateški način objedinjuju i ponderiraju svi relevantni podaci koji će služiti kao podloga za donošenje regulatornih odluka u vezi s potencijalnom opasnošću i/ili rizikom i/ili potrebom za daljnjim ciljnim, a

time i minimalnim ispitivanjem.

Smjesa: smjesa ili otopina koja se sastoji od dviju ili više tvari.

Tvar s jednim sastojkom: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je jedan glavni sastojak prisutan u koncentraciji od najmanje 80 % (w/w).

Tvar s više sastojaka: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je više od jednog glavnog sastojka prisutno u koncentraciji od 10 % (w/w) ili većoj te manjoj od 80 % (w/w). Tvar s više sastojaka rezultat je procesa proizvodnje. Smjesa i tvar s više sastojaka razlikuju se po tome što se smjesa dobiva miješanjem dviju ili više tvari bez kemijske reakcije. Tvar s više sastojaka rezultat je kemijske reakcije.

Pozitivna kontrola: ponovljeni uzorak koji sadržava sve komponente ispitnog sustava i tretiran je s tvari za koju je poznato da izaziva pozitivan odgovor. Kako bi se osigurala mogućnost procjene varijabilnosti odgovora pozitivne kontrole tijekom vremena, pozitivan odgovor ne bi smio biti presnažan.

Prehapteni: kemikalije koje abiotičkom pretvorbom postaju tvari koje izazivaju preosjetljivost, npr. oksidacijom.

Prohapteni: kemikalije kojima je potrebna enzimaska aktivacija da bi mogle pokazati potencijal izazivanja preosjetljivosti kože.

Relevantnost: opis odnosa između ispitivanja i istraživnog učinka te je li ispitivanje prikladno i korisno za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri ispitivanjem točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje i razmatranje o točnosti (podudarnosti) ispitivanja (14.).

Pouzdanost: pokazuje u kojoj se mjeri ispitivanje može obnovljivo primijeniti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija tijekom vremena uz primjenu istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više njih te ponovljivosti unutar jednog laboratorija (14.).

Ciklus: ciklus se sastoji od jedne ispitivane kemikalije ili više njih koje se ispituju istodobno s kontrolom s otapalom/nosačem i pozitivnom kontrolom.

Osjetljivost: udio svih pozitivnih/aktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitivanja koje daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitivanja (14.).

S.I.: indeks stimulacije. Relativne vrijednosti geometrijske sredine intenziteta fluorescencije kod stanica tretiranih kemikalijom u usporedbi sa stanicama tretiranima otapalom.

Kontrola s otapalom/nosačem: netretirani uzorak koji ne sadržava ispitivanu kemikaliju, ali sadržava sve ostale komponente ispitnog sustava te otapalo/nosač koji se upotrebljava u ispitivanju. Upotrebljava se za utvrđivanje polaznog odgovora za uzorke koji se tretiraju

ispitivanom kemikalijom otopljenom ili stabilno dispergiranom u istom otapalu/nosaču. Kada se ispituje s istodobnom kontrolom s medijem, taj uzorak isto tako pokazuje je li otapalo/nosač u interakciji s ispitnim sustavom.

Specifičnost: udio svih negativnih/neaktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitivanja koje daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitivanja (14.).

Pufer za bojenje: fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom koja sadržava 5 % fetalnog telećeg seruma.

Tvar: kemijski element i njegovi spojevi u prirodnome stanju ili dobiveni proizvodnim postupkom, što uključuje i aditive koji su nužni za održavanje stabilnosti proizvoda te nečistoće koje proizlaze iz primijenjenoga postupka, ali isključuje otapala koja se mogu izdvojiti bez utjecaja na stabilnost tvari ili promjene njezina sastava.

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovim ispitivanjem.

Globalno usklađeni sustav Ujedinjenih naroda za razvrstavanje i označivanje kemikalija (UN GHS): sustav za razvrstavanje kemikalija (tvari i smjesa) prema standardiziranim vrstama i stupnjevima fizičkih opasnosti i opasnosti za zdravlje i okoliš, kojim su obuhvaćena odgovarajuća komunikacijska sredstva kao što su piktogrami, oznake opasnosti, oznake upozorenja, oznake obavijesti i sigurnosno-tehnički listovi, kojima se prenose informacije o njihovim štetnim učincima u cilju zaštite ljudi (uključujući poslodavce, radnike, prijevoznike, potrošače i interventno osoblje) i okoliša (16.).

UVCB: tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi i biološki materijali.

Valjano ispitivanje: ispitivanje za koje se smatra da je dovoljno relevantno i pouzdano za određenu svrhu te koje se temelji na znanstveno utemeljenim načelima. ispitivanje nikada nije valjano u apsolutnom smislu nego samo u odnosu na određenu svrhu (14.).

Dodatak 2.2.**TVARI ZA DOKAZIVANJE TEHNIČKE OSPOSOBLJENOSTI**

Prije rutinske primjene ispitivanja opisanog u ovom Dodatku ispitnoj metodi B.71. laboratoriji bi trebali dokazati svoju tehničku osposobljenost tako što će za deset tvari preporučenih u tablici 1. dobiti očekivano predviđanje na temelju testa U-SENS™ te za najmanje osam od deset tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti dobiti vrijednosti CV70 i EC150 koje su unutar odgovarajućeg referentnog raspona. Tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti izabrane su tako da predstavljaju niz odgovora povezanih s opasnostima od izazivanja preosjetljivosti kože. Ostali kriteriji za odabir uključivali su to da je tvar komercijalno dostupna te da su dostupni visokokvalitetni *in vivo* referentni podaci i visokokvalitetni *in vitro* podaci dobiveni testom U-SENS™. Isto tako, za test U-SENS™ dostupni su objavljeni referentni podaci (1. i 8.).

Tablica 1.: Preporučene tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti za izvođenje testa U-SENS™

Tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti	CAS br.	Agregatno stanje	Predviđanje <i>in vivo</i>¹	U-SENS™ Otapalo/ nosač	U-SENS™ Referentni raspon za CV70 u µg/ml²	U-SENS™ Referentni raspon za EC150 u µg/ml²
4-fenilendiamin	106-50-3	Kruta tvar	Tvar koja izaziva preosjetljivost (jaka)	Potpuni medij ³	< 30	Pozitivno (≤ 10)
2,4,6-trinitrobenzensulfonska kiselina	2508-19-2	Tekućina	Tvar koja izaziva preosjetljivost (jaka)	Potpuni medij	> 50	Pozitivno (≤ 50)
Dietil-maleat	141-05-9	Tekućina	Tvar koja izaziva preosjetljivost (umjerena)	DMSO	10–100	Pozitivno (≤ 20)
Rezorcinol	108-46-3	Kruta tvar	Tvar koja izaziva preosjetljivost (umjerena)	Potpuni medij	> 100	Pozitivno (≤ 50)
Cinaminski alkohol	104-54-1	Kruta tvar	Tvar koja izaziva preosjetljivost (slaba)	DMSO	> 100	Pozitivno (10–100)
4-alilanol	140-67-0	Tekućina	Tvar koja izaziva preosjetljivost (slaba)	DMSO	> 100	Pozitivno (< 200)
Saharin	81-07-2	Kruta tvar	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	DMSO	> 200	Negativno (> 200)

Glicerol	56-81-5	Tekućina	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	Potpuni medij	> 200	Negativno (> 200)
Mliječna kiselina	50-21-5	Tekućina	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	Potpuni medij	> 200	Negativno (> 200)
Salicilna kiselina	69-72-7	Kruta tvar	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	DMSO	> 200	Negativno (> 200)

Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima

¹ Predviđanje opasnosti (i jakosti) *in vivo* temelji se na podacima dobivenima s pomoću analize LLNA (1. i 8.). Jakost *in vivo* utvrđena je prema kriterijima koje je predložio ECETOC (17.).

² Na temelju vrijednosti uočenih u prijašnjim ispitivanjima (1. i 8.).

³ Potpuni medij: medij RPMI-1640 obogaćen s 10 % fetalnog telećeg seruma, 2 mM L-glutamina, 100 jedinica/ml penicilina i 100 µg/ml streptomicina (8.).

Dodatak 3.

IZAZIVANJE PREOSJETLJIVOSTI KOŽE *IN VITRO*: TEST IL-8 LUC

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

1. Za razliku od testova u kojima se analizira ekspresija staničnih površinskih biljega, testom IL8-Luc kvantificiraju se promjene u ekspresiji IL-8, citokina povezanog s aktiviranjem dendritičnih stanica (DC). Kod IL-8 reporterske stanične linije dobivene iz THP-1 (THP-G8, dobivena iz ljudske stanične linije akutne monocitne leukemije THP-1) ekspresija IL-8 mjeri se nakon izlaganja tvarima koje izazivaju preosjetljivost (1.). Ekspresija luciferaze zatim se upotrebljava kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost.
2. Test IL-8 Luc ocijenjen je u validacijskoj studiji (2.) koju su proveli JaCVAM (Japanski centar za validaciju alternativnih metoda), METI (**Ministarstvo gospodarstva, trgovine i industrije**) i JSAAE (**Japansko društvo za alternative pokusima na životinjama**) te je kasnije podvrgnut neovisnom stručnom pregledu (3.) pod pokroviteljstvom JaCVAM-a i Ministarstva zdravlja, rada i dobrobiti, uz potporu **Međunarodne suradnje u području alternativnih metoda ispitivanja** (ICATM). Uzimajući u obzir sve dostupne dokaze i informacije regulatornih tijela i dionika, test IL-8 Luc smatra se korisnim kao dio IATA-e kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost u svrhu razvrstavanja i označivanja prema opasnosti. U literaturi su navedeni primjeri upotrebe podataka dobivenih testom IL-8 Luc u kombinaciji s ostalim informacijama (4., 5. i 6.).
3. Pokazalo se da se test IL-8 Luc može prenijeti u laboratorije koji imaju iskustva sa staničnim kulturama i mjerenjem luciferaze. Obnovljivost unutar jednog laboratorija iznosila je 87,7 %, a između laboratorija 87,5 % (2.). Podaci dobiveni u validacijskoj studiji (2.) i drugim objavljenim radovima (1. i 6.) pokazuju da je testom IL-8 Luc, u usporedbi s analizom LLNA, 118 kemikalija od njih 143 procijenjeno kao pozitivno ili negativno, a 25 kemikalija kao nejednoznačno te točnost testa IL-8 Luc u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože (kategorija 1. prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost (bez kategorije prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) iznosi 86 % (101/118), uz osjetljivost od 96 % (92/96) i specifičnost od 41 % (9/22). Isključujući tvari izvan područja primjene opisane u nastavku (stavak 5.), testom IL-8 Luc 113 kemikalija od njih 136 procijenjeno je kao pozitivno ili negativno, a 23 kemikalije kao nejednoznačno te točnost testa IL-8 Luc iznosi 89 % (101/113), uz osjetljivost od 96 % (92/96) i specifičnost od 53 % (9/17). Upotrebom podataka dobivenih na ljudima koji su navedeni u Urbisch i dr. (7.), testom IL-8 Luc 76

kemikalija od njih 90 procijenjeno je kao pozitivno ili negativno, a 14 kemikalija kao nejednoznačno te točnost testa iznosi 80 % (61/76), osjetljivost 93 % (54/58), a specifičnost 39 % (7/18). Isključujući tvari izvan područja primjene, testom IL-8 Luc 71 kemikalija od njih 84 procijenjeno je kao pozitivno ili negativno, a 13 kemikalija kao nejednoznačno te točnost testa iznosi 86 % (61/71), uz osjetljivost od 93 % (54/58) i specifičnost od 54 % (7/13). Veća je vjerojatnost da će se testom IL-8 Luc dobiti lažno negativna predviđanja za kemikalije koje pokazuju nisku/umjerenu jakost u izazivanju preosjetljivosti kože (potkategorija 1.B prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) nego za kemikalije koje pokazuju visoku jakost (potkategorija 1.A prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) (6.). Navedene informacije idu u prilog upotrebi testa IL-8 Luc kao elementa koji pridonosi identifikaciji opasnosti od izazivanja preosjetljivosti kože. Točnost navedena za test IL-8 Luc kao samostalno ispitivanje služi samo kao smjernica jer je ispitivanje potrebno kombinirati s drugim izvorima informacija u kontekstu IATA-e te u skladu s odredbama stavaka 7. i 8. iz odjeljka „Opći uvod”. Nadalje, pri ocjenjivanju ispitivanja izazivanja preosjetljivosti kože koje ne uključuju pokuse na životinjama potrebno je imati na umu da analiza LLNA i druga ispitivanja na životinjama možda neće u potpunosti odražavati situaciju kod ljudi.

4. Trenutačno dostupni podaci pokazuju da se test IL-8 Luc može primijeniti za ispitivanje kemikalija koje obuhvaćaju različite organske funkcionalne skupine, mehanizme reakcije, jakosti u izazivanju preosjetljivosti kože (kako su utvrđene istraživanjima *in vivo*) te fizikalno-kemijska svojstva (2. i 6.).
5. Iako se u testu IL-8 Luc kao otapalo upotrebljava X-VIVO™ 15, njime su točno ocijenjene kemikalije čija je vrijednost $\text{Log } K_{ow} > 3,5$ i čija je topljivost u vodi približno 100 µg/ ml, kako je izračunano programom EPI Suite™, te je njegova uspješnost u otkrivanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože i koje su slabo topljive u vodi bolja nego kod testa IL-8 Luc u kojem se kao otapalo upotrebljava dimetil sulfoksid (DMSO) (2.). Međutim, negativni rezultati za ispitivane kemikalije koje se ne otapaju pri koncentraciji od 20 mg/ml mogu dati lažno negativne rezultate jer se one ne mogu otopiti u otapalu X-VIVO™ 15. Stoga negativne rezultate za te ispitivane kemikalije ne treba razmatrati. U validacijskoj studiji uočen je visok udio lažno negativnih rezultata za anhidride. Nadalje, zbog ograničene metaboličke sposobnosti stanične linije (8.) i uvjeta pokusa prohapteni (tj. tvari koje zahtijevaju metaboličku aktivaciju) i prehapteni (tj. tvari koje se aktiviraju zračnom oksidacijom) mogu dati negativne rezultate u testu. Međutim, iako negativne rezultate za tvari za koje se sumnja da su prehapteni ili prohapteni treba tumačiti s oprezom, testom IL-8 Luc točno je procijenjeno 11 prehaptena od njih 11, šest od šest prohaptena te šest od osam prehaptena i prohaptena u podatkovnom skupu testa IL-8 Luc (2.). Na temelju nedavnog sveobuhvatnog pregleda triju ispitivanja koja ne uključuju pokuse na životinjama (DPRA, KeratinoSens™ i h-CLAT) za otkrivanje prehaptena i

prohaptena (9.) te na temelju činjenice da su stanice THP-G8 koje se upotrebljavaju u testu IL-8 Luc stanična linija izvedena iz stanične linije THP-1 koja se upotrebljava u testu h-CLAT, test IL-8 Luc može pridonijeti i povećanju osjetljivosti ispitivanja koja ne uključuju pokuse na životinjama za otkrivanje prehaptena i prohaptena u kombinaciji s drugim ispitivanjima. Površinski aktivne tvari koje su dosad ispitane dale su (lažno) pozitivne rezultate neovisno o njihovoj vrsti (npr. kationske, anionske ili neionske). Naposljetku, kemikalije koje ometaju luciferazu mogu poremetiti njezinu aktivnost/mjerenje tako da uzrokuju prividnu inhibiciju ili povećanu luminiscenciju (10.). Na primjer, postoje izvješća o tome da su koncentracije fitoestrogena veće od $1 \mu\text{M}$ u drugim luciferaznim testovima ometale signale luminiscencije zbog pretjerane aktivacije reporterskog gena za luciferazu. Stoga je potrebno pažljivo ispitati ekspresiju luciferaze dobivenu pri visokim koncentracijama fitoestrogena ili spojeva za koje se pretpostavlja da dovode do aktivacije reporterskog gena za luciferazu slične aktivaciji fitoestrogenom (11.). Na temelju prethodno navedenog, površinski aktivne tvari, anhidridi i kemikalije koje ometaju luciferazu izvan su područja primjene ovog testa. U slučajevima u kojima se može dokazati da se test IL-8 Luc ne može primijeniti za ispitivanje drugih specifičnih kategorija kemikalija, taj test ne bi trebalo upotrebljavati za te specifične kategorije.

6. Kao što je opisano, test IL-8 Luc pomaže u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost. Potreban je dodatan rad, po mogućnosti na temelju podataka dobivenih na ljudima, da bi se moglo utvrditi mogu li rezultati dobiveni testom IL-8 Luc pridonijeti procjeni jakosti ako se kombiniraju s drugim izvorima informacija.
7. Definicije su navedene u Dodatku 3.1.

NAČELO ISPITIVANJA

8. U testu IL-8 Luc upotrebljava se ljudska stanična linija monocitne leukemije THP-1, koja se nabavlja iz banke stanica American Type Culture Collection (Manassas, VA, SAD). Upotrebom te stanične linije na Odjelu za dermatologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Tohoku (*Dept. of Dermatology, Tohoku University School of Medicine*) stvorena je stanična linija THP-G8, IL-8 reporterska stanična linija izvedena iz THP-1, koja nosi gene za stabilnu narančastu luciferazu (*Stable Luciferase Orange*; SLO) i stabilnu crvenu luciferazu (*Stable Luciferase Red*; SLR) koji su pod kontrolom promotora gena za IL-8 odnosno za gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenazu (GAPDH) (1.). To omogućuje kvantitativno mjerenje indukcije gena za luciferazu određivanjem luminiscencije iz supstrata luciferaze za koje je poznato da stvaraju svjetlost, kao pokazatelja aktivnosti IL-8 i GAPDH-a u stanicama nakon izlaganja kemikalijama koje izazivaju preosjetljivost.

9. Ispitni sustav s dvije boje sastoji se od luciferaze koja emitira narančastu boju (SLO; $\lambda_{\text{max}} = 580 \text{ nm}$) (12.) za gensku ekspresiju s promotora gena za IL-8 te luciferaze koja emitira crvenu boju (SLR; $\lambda_{\text{max}} = 630 \text{ nm}$) (13.) za gensku ekspresiju s promotora gena za GAPDH kao interne kontrole. Dvije luciferaze emitiraju različite boje nakon reakcije s d-luciferinom krijesnice i njihova se luminiscencija mjeri istovremeno u reakciji u jednom koraku tako da se emisija iz smjese za testiranje podijeli upotrebom optičkog filtra (14.) (Dodatak 3.2.).
10. Stanice THP-G8 tretiraju se ispitivanom kemikalijom 16 sati, nakon čega se mjeri aktivnost SLO luciferaze (SLO-LA), koja odražava aktivnost promotora gena za IL-8, te aktivnost SLR luciferaze (SLR-LA), koja odražava aktivnost promotora gena za GAPDH. Kako bi se kratice lakše razumjele, SLO-LA i SLR-LA određuju se kao IL8LA odnosno GAPLA. U tablici 1. naveden je opis termina povezanih s aktivnošću luciferaze u testu IL-8 Luc. Izmjerene vrijednosti upotrebljavaju se za izračun normalizirane IL8LA (nIL8LA), odnosno omjera IL8LA i GAPLA, indukcije nIL8LA (Ind-IL8LA), odnosno omjera aritmetičke sredine četverostruko izmjerenih vrijednosti nIL8LA stanica THP-G8 tretiranih ispitivanom kemikalijom i vrijednosti nIL8LA netretiranih stanica THP-G8, te inhibicije GAPLA (Inh-GAPLA), odnosno omjera aritmetičke sredine četverostruko izmjerenih vrijednosti GAPLA stanica THP-G8 tretiranih ispitivanom kemikalijom i vrijednosti GAPLA netretiranih stanica THP-G8 te se upotrebljavaju kao pokazatelj citotoksičnosti.

Tablica 1.: Opis termina povezanih s aktivnošću luciferaze u testu IL-8 Luc

Kratice	Definicija
GAPLA	aktivnost SLR luciferaze koja odražava aktivnost promotora gena za GAPDH
IL8LA	aktivnost SLO luciferaze koja odražava aktivnost promotora gena za IL-8
nIL8LA	IL8LA/GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA stanica THP-G8 tretiranih kemikalijama / nIL8LA netretiranih stanica
Inh-GAPLA	GAPLA stanica THP-G8 tretiranih kemikalijama / GAPLA netretiranih stanica
CV05	najniža koncentracija kemikalije pri kojoj Inh-GAPLA postaje $< 0,05$

11. Dostupni su zahtjevi izvedbe (15.) radi olakšavanja validacije izmijenjenih *in vitro* testova IL-8 s luciferazom sličnih testu IL-8 Luc te omogućivanja pravovremene izmjene Smjernice OECD-a za ispitivanje 442E radi njihova uključivanja. OECD-ovo uzajamno prihvaćanje podataka jamči se samo za ispitivanja koja su validirana u skladu sa zahtjevima izvedbe ako je OECD pregledao ta ispitivanja i uključio ih u Smjernicu OECD-a za ispitivanje 442E (16.).

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

12. Prije rutinske primjene ispitivanja opisanog u ovom Dodatku ispitnoj metodi B.71. laboratoriji bi trebali dokazati svoju tehničku osposobljenost upotrebom deset tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti navedenih u Dodatku 3.3. u skladu s dobrom praksom za *in vitro* metode (17.). Osim toga, korisnici ispitivanja trebaju održavati bazu prijašnjih podataka dobivenih provjerama reaktivnosti (vidjeti stavak 15.) te s pozitivnim kontrolama i kontrolama s otapalom/nosačem (vidjeti stavke od 21. do 24.) i trebaju se koristiti tim podacima kako bi potvrdili da je njihov laboratorij održao obnovljivost ispitivanja tijekom vremena.

POSTUPAK

13. Dostupni su standardni operativni postupci (SOP) za test IL-8 Luc te bi ih trebalo primjenjivati pri provedbi ispitivanja (18.). Laboratoriji koji su spremni provoditi ispitivanje mogu nabaviti rekombinantnu staničnu liniju THP-G8 od laboratorija GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan, nakon što potpišu sporazum o prijenosu materijala (MTA) u skladu s uvjetima iz OECD-ova predložka. U sljedećim stavcima opisuju se glavne sastavnice i postupci testa.

Priprema stanica

14. Za provedbu testa IL-8 Luc treba upotrebljavati staničnu liniju THP-G8 iz laboratorija GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan (vidjeti stavke 8. i 13.). Nakon primitka stanice se razmnožavaju (od dvije do četiri pasaže) te čuvaju zamrznute kao homogena zaliha. Stanice iz te zalihe mogu se razmnožavati do najviše 12 pasaža ili najdulje šest tjedana. Za razmnožavanje se kao medij upotrebljava RPMI-1640, medij za uzgoj kulture koji sadržava 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS), otopinu antibiotika/antimikotika (100 jedinica/ml penicilina G, 100 µg/ml streptomicina i 0,25 µg/ml amfotericina B u 0,85-postotnoj fiziološkoj otopini) (npr. GIBCO Cat#15240-062), 0,15 µg/ml puromicina (npr. CAS: 58-58-2) i 300 µg/ml G418 (npr. CAS: 108321-42-2).
15. Prije upotrebe za ispitivanje treba provjeriti ispunjavaju li stanice zadane kriterije provjerom reaktivnosti. Tu provjeru treba provesti od jedan do dva tjedna ili od dvije do četiri pasaže nakon odmrzavanja, upotrebom pozitivne kontrole, 4-nitrobenzil bromida (4-NBB) (CAS: 100-11-8, čistoća ≥ 99 %) i negativne kontrole, mliječne kiseline (LA) (CAS: 50-21-5, čistoća ≥ 85 %). 4-NBB trebao bi dati pozitivan odgovor na Ind-IL8LA ($\geq 1,4$), dok bi LA trebao dati negativan odgovor na Ind-IL8LA ($< 1,4$). Za test se upotrebljavaju samo stanice koje su prošle provjeru reaktivnosti. Provjeru treba provesti u skladu s postupcima opisanima u stavcima od 22. do 24.

16. Za ispitivanje se stanice THP-G8 nasađuju pri gustoći od 2 do 5×10^5 stanica/ml te se prethodno uzgajaju u tikvicama s kulturom od 48 do 96 sati. Na dan ispitivanja stanice izdvojene iz tikvice s kulturom ispiru se medijem RPMI-1640 koji sadržava 10 % FBS-a bez antibiotika, a zatim se ponovno suspendiraju medijem RPMI-1640 koji sadržava 10 % FBS-a bez antibiotika pri gustoći od 1×10^6 stanica/ml. Stanice se zatim distribuiraju na crnu ploču s 96 jažica s ravnim dnom (npr. Costar Cat#3603) s 50 μ l (5×10^4 stanica/jažici).

Priprema ispitivane kemikalije i kontrolnih tvari

17. Ispitivana kemikalija i kontrolne tvari pripremaju se na dan ispitivanja. Za test IL-8 Luc ispitivane kemikalije otapaju se u mediju X-VIVO™ 15, komercijalno dostupnom mediju bez seruma (Lonza, 04-418Q), tako da se dobije konačna koncentracija od 20 mg/ml. X-VIVO™ 15 dodaje se u 20 mg ispitivane kemikalije (neovisno o topljivosti kemikalije) u epruvetu za mikrocentrifugu i dovodi do volumena od 1 ml, a zatim se snažno vrtložno protresa i trese u rotoru pri najvećoj brzini od 8 o/min 30 minuta na sobnoj temperaturi od približno 20 °C. Nadalje, ako su kemikalije u krutom stanju i dalje netopljive, epruveta se ultrazvučno obrađuje dok se kemikalija potpuno ne otopi ili stabilno dispergira. Ako su ispitivane kemikalije topljive u mediju X-VIVO™ 15, otopina se razrjeđuje medijem X-VIVO™ 15 primjenom faktora razrjeđivanja od pet te se upotrebljava kao glavna otopina X-VIVO™ 15 ispitivane kemikalije (4 mg/ml). Ako ispitivana kemikalija nije topljiva u mediju X-VIVO™ 15, smjesa se ponovno protresa najmanje 30 minuta, a zatim se centrifugira pri 15 000 o/min ($\approx 20\,000\,g$) u trajanju od pet minuta; supernatant koji nastane upotrebljava se kao glavna otopina X-VIVO™ 15 ispitivane kemikalije. Upotrebu drugih otapala, kao što su DMSO, voda ili medij za uzgoj kulture, treba znanstveno obrazložiti. Podroban postupak za otapanje kemikalija prikazan je u Dodatku 3.5. Otopine medija X-VIVO™ 15 opisane u stavcima od 18. do 23. miješaju se u omjeru 1 : 1 (v/v) sa suspenzijama stanica pripremljenima na crnoj ploči s 96 jažica s ravnim dnom (vidjeti stavak 16.).
18. Prvi ciklus ispitivanja usmjeren je na utvrđivanje citotoksične koncentracije i ispitivanje potencijala kemikalija da izazovu preosjetljivost kože. Upotrebom medija X-VIVO™ 15, serijska razrjeđivanja glavne otopine X-VIVO™ 15 ispitivanih kemikalija prave se s faktorom razrjeđivanja od dva (vidjeti Dodatak 3.5.) upotrebom ploče za test s 96 jažica (npr. Costar Cat#EW-01729-03). Zatim se 50 μ l/jažici razrijeđene otopine dodaje u 50 μ l suspenzije stanica na crnoj ploči s 96 jažica s ravnim dnom. Stoga su konačne koncentracije ispitivanih kemikalija koje su topljive u mediju X-VIVO™ 15 u rasponu od 0,002 do 2 mg/ml (Dodatak 3.5.). U slučaju ispitivanih kemikalija koje nisu topljive u mediju X-VIVO™ 15 pri 20 mg/ml utvrđuju se samo faktori razrjeđivanja u rasponu od 2 do 2^{10} , iako stvarne konačne koncentracije ispitivanih kemikalija ostaju nesigurne i ovise o zasićenoj koncentraciji ispitivane kemikalije u glavnoj otopini medija X-VIVO™ 15.

19. U kasnijim ciklusima ispitivanja (tj. drugom, trećem i četvrtom ponavljanju), glavna otopina medija X-VIVO™ 15 pravi se pri koncentraciji koja je četiri puta viša od koncentracije vijabilnosti stanica 05 (CV05; najniža koncentracija pri kojoj Inh-GAPLA postaje $< 0,05$) u prvom pokusu. Ako Inh-GAPLA ne postane manji od 0,05 pri najvišoj koncentraciji u prvom ciklusu, glavna otopina medija X-VIVO™ 15 pravi se upotrebom najviše koncentracije prvog ciklusa. Koncentracija CV05 računa se tako da se koncentracija glavne otopine u prvom ciklusu podijeli faktorom razrjeđivanja za CV05 (X) (faktor razrjeđivanja CV05 (X); faktor razrjeđivanja potreban za razrjeđivanje glavne otopine na CV05) (vidjeti Dodatak 3.5.). Za ispitivane tvari koje nisu topljive u mediju X-VIVO pri 20 mg/ml, CV05 se utvrđuje koncentracijom glavne otopine $\times 1/X$. Za cikluse od drugog do četvrtog priprema se druga glavna otopina kao $4 \times CV50$ (Dodatak 3.5.).
20. Serijska razrjeđivanja drugih glavnih otopina X-VIVO™ 15 prave se upotrebom faktora razrjeđivanja od 1,5 upotrebom ploče za test s 96 jažica. Zatim se 50 μ l/jažici razrijeđene otopine dodaje u 50 μ l suspenzije stanica u jažicama crne ploče s 96 jažica s ravnim dnom. Svaku koncentraciju svake ispitivane kemikalije treba ispitati u četiri jažice. Uzorci se zatim miješaju u jedinici za miješanje za ploče i inkubiraju 16 sati na 37 °C i s 5 % CO₂, nakon čega se mjeri aktivnost luciferaze kako je opisano u nastavku.
21. Kontrolu s otapalom čini smjesa 50 μ l/jažici medija X-VIVO™ 15 i 50 μ l/jažici suspenzije stanica u mediju RPMI-1640 koji sadržava 10 % FBS-a.
22. Kao pozitivna kontrola preporučuje se 4-NBB. Priprema se 20 mg 4-NBB-a u epruveti za mikrocentrifugu od 1,5 ml, u koju se dodaje medij X-VIVO™ 15 do volumena od 1 ml. Epruveta se snažno vrtložno protresa i trese u rotoru pri najvećoj brzini od 8 o/min najmanje 30 minuta. Nakon centrifugiranja pri 20 000 g tijekom pet minuta supernatant se razrjeđuje faktorom od 4 medijem X-VIVO™ 15 i 500 μ l razrijeđenog supernatanta prenosi se u jažicu na ploči za test s 96 jažica. Razrijeđeni supernatant dodatno se razrjeđuje medijem X-VIVO™ 15 s faktorima razrjeđivanja od 2 i 4 te se 50 μ l otopine dodaje u 50 μ l suspenzije stanica THP-G8 u jažicama crne ploče s 96 jažica s ravnim dnom (Dodatak 3.6.). Svaku koncentraciju pozitivne kontrole treba ispitati u četiri jažice. Ploča se trese u jedinici za miješanje za ploče i inkubira 16 sati u inkubatoru CO₂ (37 °C, 5 % CO₂), nakon čega se mjeri aktivnost luciferaze kako je opisano u stavku 29.
23. Kao negativna kontrola preporučuje se mliječna kiselina. Priprema se 20 mg mliječne kiseline u epruveti za mikrocentrifugu od 1,5 ml, u koju se dodaje medij X-VIVO™ 15 do volumena od 1 ml (20 mg/ml). Dvadeset mg/ml otopine mliječne kiseline razrjeđuje se medijem X-VIVO™ 15 primjenom faktora od 5 (4 mg/ml); 500 μ l od tih 4 mg/ml otopine mliječne kiseline prenosi se u jažicu ploče za test s 96 jažica. Ta se otopina razrjeđuje medijem X-VIVO™ 15 primjenom faktora od 2 te se ponovno razrjeđuje primjenom faktora od 2 kako bi se dobile otopine od 2 mg/ml i 1 mg/ml. 50 μ l tih triju otopina i

kontrole s nosačem (X-VIVO™ 15) dodaje se u 50 µl suspenzije stanica THP-G8 u jažicama crne ploče s 96 jažica s ravnim dnom. Svaka koncentracija negativne kontrole ispituje se u četiri jažice. Ploča se trese u jedinici za miješanje za ploče i inkubira 16 sati u inkubatoru s CO₂ (37 °C, 5 % CO₂), nakon čega se mjeri aktivnost luciferaze kako je opisano u stavku 29.

24. Mogu se upotrijebiti druge prikladne pozitivne ili negativne kontrole pod uvjetom da su dostupni prijašnji podaci na temelju kojih se mogu odrediti usporedivi kriteriji prihvatljivosti ciklusa.
25. Treba paziti da ne dođe do isparavanja hlapljivih ispitivanih kemikalija te unakrsne kontaminacije jažica ispitivanim kemikalijama, npr. zatvaranjem ploče prije inkubacije s ispitivanim kemikalijama.
26. Za ispitivane kemikalije i kontrolu s otapalom potrebna su od dva do četiri ciklusa kako bi se došlo do pozitivnog ili negativnog predviđanja (vidjeti tablicu 2.). Svaki ciklus provodi se na različite dane sa svježom glavnom otopinom medija X-VIVO™ 15 ispitivanih kemikalija i neovisno izdvojenim stanicama. Stanice mogu biti iz iste pasaže.

Mjerenja aktivnosti luciferaze

27. Luminiscencija se mjeri luminometrom za mikrotitracijsku ploču s 96 jažica s optičkim filtrima, npr. Phelios (ATTO, Tokio, Japan), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Njemačka) i serijom ARVO (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD). Luminometar se mora kalibrirati za svako ispitivanje kako bi se osigurala obnovljivost (19.). Za tu su kalibraciju dostupne rekombinantne luciferaze koje emitiraju narančastu i crvenu svjetlost.
28. U svaku jažicu ploče na kojoj se nalazi suspenzija stanica tretirana kemikalijama ili bez kemikalija prenosi se 100 µl prethodno zagrijanog reagensa za test luciferaze Tripluc® (Tripluc). Ploča se protresa deset minuta na sobnoj temperaturi od približno 20 °C. Ploča se stavlja u luminometar kako bi se izmjerila aktivnost luciferaze. Bioluminiscencija se mjeri tri sekunde bez optičkog filtra (F0) i tri sekunde s optičkim filtrom (F1). Treba pružiti obrazloženje za upotrebu drugačijih postavki, npr. ovisno o modelu luminometra koji se upotrebljava.
29. Parametri za svaku koncentraciju računaju se iz izmjerenih vrijednosti, npr. IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, srednja vrijednost ± SD za IL8LA, srednja vrijednost ± SD za GAPLA, srednja vrijednost ± SD za nIL8LA, srednja vrijednost ± SD za Ind-IL8LA, srednja vrijednost ± SD za Inh-GAPLA i interval pouzdanosti od 95 % za Ind-IL8LA. Definicije parametara upotrijebljenih u ovom stavku navedene su u dodacima I. odnosno IV.

30. Prije mjerenja razlikovanje boja u reporterskim testovima s više boja obično se postiže upotrebom detektora (luminometar i čitač ploča) koji imaju optičke filtre, kao što su filtri s oštrom graničnom crtom valne duljine (dugo ili kratko prolazni) ili pojasno propusni filtri. Koeficijente prijenosa filtara za svaku signalnu boju bioluminiscencije treba kalibrirati prije ispitivanja, u skladu s Dodatkom 3.2.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Procjena podataka

31. Sljedeći kriteriji moraju se ispuniti u svakom ciklusu da bi se donijela pozitivna/negativna odluka:
- predviđanje na temelju testa IL-8 Luc smatra se pozitivnim ako je Ind-IL8LA ispitivane kemikalije $\geq 1,4$ i donja granica intervala pouzdanosti od 95 % za Ind-IL8LA $\geq 1,0$,
 - predviđanje na temelju testa IL-8 Luc smatra se negativnim ako je Ind-IL8LA ispitivane kemikalije $< 1,4$ i/ili donja granica intervala pouzdanosti od 95 % za Ind-IL8LA $< 1,0$.

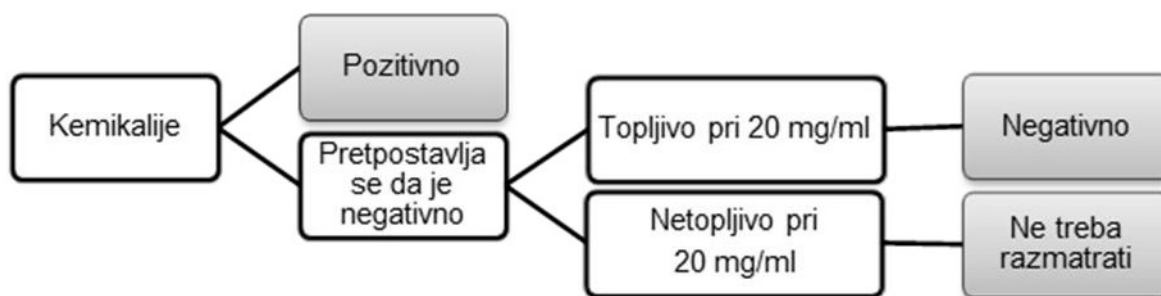
Model predviđanja

32. Ispitivane kemikalije koje daju dva pozitivna rezultata u 1., 2., 3. i 4. ciklusu identificiraju se kao pozitivne, dok se one koje daju tri negativna rezultata u 1., 2., 3. i 4. ciklusu identificiraju kao kemikalije za koje se pretpostavlja da su negativne (tablica 2.). Među kemikalijama za koje se pretpostavlja da su negativne, kemikalije koje se otapaju pri 20 mg/ml medija X-VOVO™ 15 procjenjuju se kao negativne, dok kemikalije koje se ne otapaju pri 20 mg/ml medija X-VOVO™ 15 ne treba razmatrati (slika 1.).

Tablica 2.: Kriteriji za identifikaciju pozitivnih i pretpostavljenih negativnih rezultata

1. ciklus	2. ciklus	3. ciklus	4. ciklus	Konačno predviđanje
Pozitivno	Pozitivno	–	–	Pozitivno
	Negativno	Pozitivno	–	Pozitivno
		Negativno	Pozitivno	Pozitivno
		Negativno	Pretpostavlja se da je negativno	
Negativno	Pozitivno	Pozitivno	–	Pozitivno
		Negativno	Pozitivno	Pozitivno
		Negativno	Pretpostavlja se da je negativno	
	Negativno	Pozitivno	Pozitivno	Pozitivno
		Negativno	Pretpostavlja se da je negativno	
		–	Pretpostavlja se da je negativno	

Slika 1.: Model predviđanja za konačnu odluku



Kriteriji prihvatljivosti

33. Sljedeći bi kriteriji prihvatljivosti trebali biti ispunjeni kada se primjenjuje test IL-8 Luc:

- Ind-IL8LA treba biti veći od 5,0 pri barem jednoj koncentraciji pozitivne kontrole, 4-NBB-a, u svakom ciklusu,
- Ind-IL8LA treba biti manji od 1,4 pri bilo kojoj koncentraciji negativne kontrole, mliječne kiseline, u svakom ciklusu,
- treba odbaciti podatke s ploča za koje je GAPLA kontrolnih jažica sa stanicama i Triplucom, ali bez kemikalija, za manje od pet puta veća od GAPLA jažica koje sadržavaju samo ispitni medij (50 μ l/jažici medija RPMI-1640 koji sadržava 10 % FBS-a i 50 μ l/jažici medija X-VIVO™ 15),
- treba odbaciti podatke s ploča za koje je Inh-GAPLA svih koncentracija ispitivanih ili kontrolnih kemikalija manja od 0,05. U tom slučaju treba ponoviti prvo ispitivanje tako da se kao najviša konačna koncentracija ponovljenog ispitivanja upotrijebi najniža konačna koncentracija prethodnog ispitivanja.

Izvešće o ispitivanju

34. Izvešće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivane kemikalije

Tvar s jednim sastojkom:

- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,
- fizički izgled, topljivost u vodi, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),
- topljivost u mediju X-VIVO™ 15. U slučaju kemikalija koje nisu topljive u mediju X-VIVO™ 15, je li nakon centrifugiranja uočeno taloženje ili plutanje,
- ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- obrazloženje za odabir otapala/nosača za svaku ispitivanu kemikaliju ako nije upotrijebljen X-VIVO™ 15.

Tvar s više sastojaka, UVCB tvar i smjesa:

- opisane koliko god je to moguće npr. kemijskim identitetom (vidjeti prethodno), čistoćom, količinskom zastupljenošću i relevantnim fizikalno-kemijskim svojstvima sastojaka (vidjeti prethodno), u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- fizički izgled, topljivost u vodi te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- molekularna masa ili prividna molekularna masa u slučaju smjesa/polimera poznatog sastava ili druge informacije koje su relevantne za provođenje studije,
- obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),
- topljivost u mediju X-VIVO™ 15. U slučaju kemikalija koje nisu topljive u mediju X-VIVO™ 15, je li nakon centrifugiranja uočeno taloženje ili plutanje,
- ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- obrazloženje za odabir otapala/nosača za svaku ispitivanu kemikaliju ako nije upotrijebljen X-VIVO™ 15.

Kontrole

Pozitivna kontrola:

- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,

- fizički izgled, topljivost u vodi, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni i ako je primjenjivo,
- čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),
- ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- upućivanje na rezultate koji se odnose na prijašnje pozitivne kontrole i pokazuju primjerenost kriterija prihvatljivosti, ako je primjenjivo.

Negativna kontrola:

- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi) i/ili druge identifikacijske oznake,
- čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- fizički izgled, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva u slučaju da su upotrijebljene negativne kontrole koje nisu navedene u smjernici za ispitivanje, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- obrazloženje za odabir otapala za svaku ispitanu kemikaliju.

Ispitni uvjeti:

- naziv i adresa naručitelja, ustanove koja provodi ispitivanje i voditelja istraživanja,
- opis upotrijebljenog ispitivanja,
- upotrijebljena stanična linija, uvjeti njezina skladištenja i izvor (npr. objekt iz kojeg je dobivena),
- broj serije i podrijetlo FBC-a, naziv dobavljača, broj serije crne ploče s 96 jažica s ravnim dnom te broj serije reagensa Tripluc,
- broj pasaža i gustoća stanica upotrijebljenih za ispitivanje,
- metoda brojenja stanica koja je upotrijebljena za nasađivanje prije ispitivanja i mjere koje su poduzete kako bi se osigurala ujednačena distribucija broja stanica,
- upotrijebljeni luminometar (npr. model), uključujući postavke instrumenta, upotrijebljeni supstrat luciferaze te dokaz o primjerenom mjerenju luminiscencije na temelju kontrolnog ispitivanja opisanog u Dodatku 3.2.,

- postupak koji je primijenjen za dokazivanje osposobljenosti laboratorija za izvođenje ispitivanja (npr. ispitivanjem tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti) ili za dokazivanje obnovljive primjene ispitivanja tijekom vremena.

Ispitni postupak:

- broj provedenih ponavljanja i ciklusa,
- koncentracije ispitivane kemikalije, postupci primjene i vrijeme izloženosti (ako je drukčije od preporučenog),
- opis primijenjenih kriterija ocjenjivanja i odlučivanja,
- opis primijenjenih kriterija prihvatljivosti istraživanja,
- opis mogućih izmjena ispitnog postupka.

Rezultati:

- mjerenje IL8LA i GAPLA,
- izračuni za nIL8LA, Ind-IL8LA i Inh-GAPLA,
- interval pouzdanosti od 95 % za Ind-IL8LA,
- grafički prikaz krivulja doza – odgovor za indukciju aktivnosti luciferaze i vijabilnost,
- opis svih drugih relevantnih opažanja, ako je primjenjivo.

Rasprava o rezultatima:

- rasprava o rezultatima dobivenima testom IL-8 Luc,
- rasprava o rezultatima testa u kontekstu IATA-e ako su dostupni drugi relevantni podaci.

Zaključak

LITERATURA

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

test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275.–84.

9. Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147.–155.
10. Thorne N, Inglese J, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646.–57.
11. OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Pariz. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en>.
12. Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286.–91.
13. Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271.–9.
14. Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891.–4.
15. OECD (2017). Objavit će se – Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Pariz, Francuska.
16. OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OECD, Pariz, Francuska.
17. OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz. Dostupno na: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD%20Final%20Draft%20GIVIMP.pdf).

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

Dodatak 3.1.**DEFINICIJE**

Točnost: stupanj podudarnosti između rezultata ispitivanja i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Ona je mjerilo učinkovitosti ispitivanja i jedan od aspekata relevantnosti. Pojam je često međusobno zamjenjiv s pojmom „podudarnost” u smislu udjela točnih ishoda ispitivanja (16.).

AOP (engl. *Adverse Outcome Pathway* – put nastanka štetnog ishoda): slijed događaja od kemijske strukture ciljne kemikalije ili skupine sličnih kemikalija preko početnog molekularnog događaja do *in vivo* štetnog ishoda (20.).

Kemikalija: tvar ili smjesa.

CV05: vijabilnost stanica 05, tj. najmanja koncentracija pri kojoj kemikalije pokazuju Inh-GAPLA manji od 0,05.

FInSLO-LA: kratica koja se upotrebljava u validacijskom izvješću i prethodnim publikacijama o testu IL-8 Luc za označivanje Ind-IL8LA. Vidjeti „Ind-IL8LA” za definiciju.

GAPLA: aktivnost stabilne crvene luciferaze (SLR) ($\lambda_{\text{max}} = 630 \text{ nm}$), koju regulira promotor gena za GAPDH i koja pokazuje vijabilnost stanica i broj živih stanica.

Opasnost: intrinzično svojstvo nekog agensa ili stanje koje ima potencijal uzrokovanja štetnih učinaka kada su organizam, sustav ili (sub)populacija izloženi tom agensu.

IATA (engl. *Integrated Approach to Testing and Assessment* – integrirani pristup ispitivanju i procjeni): strukturiran pristup koji se primjenjuje za identifikaciju opasnosti (potencijal), karakterizaciju opasnosti (jakost) i/ili procjenu sigurnosti (potencijal/jakost i izloženost) kemikalije ili skupine kemikalija, kojim se na strateški način objedinjuju i ponderiraju svi relevantni podaci koji će služiti kao podloga za donošenje regulatornih odluka u vezi s potencijalnom opasnošću i/ili rizikom i/ili potrebom za daljnjim ciljnim, a time i minimalnim ispitivanjem.

II-SLR-LA: kratica koja se upotrebljava u validacijskom izvješću i prethodnim publikacijama o testu IL-8 Luc za označivanje Inh-GAPLA. Vidjeti „Inh-GAPLA” za definiciju.

IL-8 (Interleukin-8): citokin izveden iz endotelnih stanica, fibroblasta, keratinocita, makrofaga i monocita koji uzrokuje kemotaksiju neutrofila i limfocita T-stanica.

IL8LA: aktivnost stabilne narančaste luciferaze (SLO) ($\lambda_{\text{max}} = 580 \text{ nm}$), koju regulira promotor gena za IL-8.

Ind-IL8LA: multiplikacijski faktor indukcije IL8LA. Dobiva se tako da se nIL8LA stanica THP-G8 tretiranih kemikalijama podijeli s nIL8LA stanica THP-G8 koje nisu stimulirane te predstavlja aktivnost promotora gena za IL-8 koju induciraju kemikalije.

Inh-GAPLA: inhibicija GAPLA. Dobiva se tako da se GAPLA stanica THP-G8 tretiranih kemikalijama podijeli s GAPLA stanica THP-G8 koje nisu tretirane te predstavlja citotoksičnost kemikalija.

Prag najmanje indukcije (MIT): najniža koncentracija pri kojoj kemikalija ispunjava pozitivne kriterije.

Smjesa: smjesa ili otopina koja se sastoji od dviju ili više tvari.

Tvar s jednim sastojkom: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je jedan glavni sastojak prisutan u koncentraciji od najmanje 80 % (w/w).

Tvar s više sastojaka: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je više od jednog glavnog sastojka prisutno u koncentraciji od 10 % ili većoj (w/w) te manjoj od 80 % (w/w). Tvar s više sastojaka rezultat je procesa proizvodnje. Smjesa i tvar s više sastojaka razlikuju se po tome što se smjesa dobiva miješanjem dviju ili više tvari bez kemijske reakcije. Tvar s više sastojaka rezultat je kemijske reakcije.

nIL8LA: aktivnost luciferaze SLO koja odražava aktivnost promotora gena za IL-8 (IL8LA) normalizirana aktivnošću luciferaze SLR koja odražava aktivnost promotora gena za GAPDH (GAPLA). To je aktivnost promotora gena za IL-8 nakon što se uzme u obzir vijabilnost stanica ili broj stanica.

nSLO-LA: kratica koja se upotrebljava u validacijskom izvješću i prethodnim publikacijama o testu IL-8 Luc za označavanje nIL8LA. Vidjeti „nIL8LA” za definiciju.

Pozitivna kontrola: ponovljeni uzorak koji sadržava sve komponente ispitnog sustava i tretiran je s tvari za koju je poznato da izaziva pozitivan odgovor. Kako bi se osigurala mogućnost procjene varijabilnosti odgovora pozitivne kontrole tijekom vremena, pozitivan odgovor ne bi smio biti presnažan.

Prehapteni: kemikalije koje abiotičkom pretvorbom postaju tvari koje izazivaju preosjetljivost.

Prohapteni: kemikalije kojima je potrebna enzimska aktivacija da bi mogle pokazati potencijal izazivanja preosjetljivosti kože.

Relevantnost: opis odnosa između ispitivanja i istraživanog učinka te je li ispitivanje prikladno i korisno za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri ispitivanjem točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje i razmatranje o točnosti (podudarnosti) ispitivanja (16.).

Pouzdanost: pokazuje u kojoj se mjeri ispitivanje može obnovljivo primijeniti unutar

jednog laboratorija i između više laboratorija tijekom vremena uz primjenu istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više njih te ponovljivosti unutar jednog laboratorija (16.).

Ciklus: ciklus se sastoji od jedne ispitivane kemikalije ili više njih koje se ispituju istodobno s kontrolom s otapalom/nosačem i pozitivnom kontrolom.

Osjetljivost: udio svih pozitivnih/aktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitivanja koje daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitivanja (16.).

SLO-LA: kratica koja se upotrebljava u validacijskom izvješću i prethodnim publikacijama o testu IL-8 Luc za označivanje IL8LA. Vidjeti „IL8LA” za definiciju.

SLR-LA: kratica koja se upotrebljava u validacijskom izvješću i prethodnim publikacijama o testu IL-8 Luc za označivanje GAPLA. Vidjeti „GAPLA” za definiciju.

Kontrola s otapalom/nosačem: netretirani uzorak koji ne sadržava ispitivanu kemikaliju, ali sadržava sve ostale komponente ispitnog sustava te otapalo/nosač koji se upotrebljava u ispitivanju. Upotrebljava se za utvrđivanje polaznog odgovora za uzorke koji se tretiraju ispitivanom kemikalijom otopljenom ili stabilno dispergiranom u istom otapalu/nosaču. Kada se ispituje s istodobnom kontrolom s medijem, taj uzorak isto tako pokazuje je li otapalo/nosač u interakciji s ispitnim sustavom.

Specifičnost: udio svih negativnih/neaktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitivanja koje daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitivanja (16.).

Tvar: kemijski elementi i njihovi spojevi u prirodnom stanju ili dobiveni proizvodnim postupkom, uključujući i dodatke (aditive) koji su nužni za održavanje stabilnosti proizvoda te nečistoće koje proizlaze iz primijenjenog postupka, ali isključujući otapala koja se mogu izdvojiti bez utjecaja na stabilnost tvari ili promjene njezina sastava.

Površinski aktivna tvar: tvar, kao npr. deterdžent, koju se naziva i površinski aktivnim agensom, kojom se može smanjiti površinska napetost tekućine i time omogućiti pjenjenje i prodiranje u krute tvari; poznata je i kao sredstvo za vlaženje (TG437).

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom metodom.

THP-G8: reporterska stanična linija IL-8 koja se upotrebljava u testu IL-8 Luc. Ljudska stanična linija THP-1 slična makrofagima transficirana je genima za luciferaze SLO i SLR pod kontrolom promotora gena za IL-8 i GAPDH.

Globalno usklađeni sustav Ujedinjenih naroda za razvrstavanje i označivanje kemikalija (UN GHS): sustav za razvrstavanje kemikalija (tvari i smjesa) prema standardiziranim vrstama i stupnjevima fizičkih opasnosti i opasnosti za zdravlje i okoliš,

kojim su obuhvaćena odgovarajuća komunikacijska sredstva kao što su piktogrami, oznake opasnosti, oznake upozorenja, oznake obavijesti i sigurnosno-tehnički listovi, kojima se prenose informacije o njihovim štetnim učincima u cilju zaštite ljudi (uključujući poslodavce, radnike, prijevoznike, potrošače i interventno osoblje) i okoliša (21.).

UVCB: tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi i biološki materijali.

Valjana ispitna metoda: ispitivanje za koje se smatra da je dovoljno relevantno i pouzdano za određenu svrhu te koje se temelji na znanstveno utemeljenim načelima. Ispitivanje nikada nije valjano u apsolutnom smislu nego samo u odnosu na određenu svrhu.

Dodatak 3.2.**NAČELO MJERENJA AKTIVNOSTI LUCIFERAZE I UTVRĐIVANJE KOEFICIJENATA PRIJENOSA OPTIČKOG FILTRA ZA SLO I SLR**

Može se upotrijebiti višereporterski ispitni sustav – Tripluc – s luminometrom za mikrotitracijske ploče koji ima višebojni detekcijski sustav na koji se može montirati optički filter (npr. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). Kao optički filter za mjerenje može se upotrijebiti dugo ili kratko prolazni filter od 600 do 620 nm ili pojasno propusni filter od 600 do 700 nm.

Mjerenje dvobojnih luciferaza optičkim filtrom

U ovom se primjeru upotrebljava Phelios AB-2350 (ATTO). Taj je luminometar opremljen dugo prolaznim filtrom od 600 nm (R60 HOYA Co.), 600 nm LP, filter 1 za razdvajanje luminiscencije SLO ($\lambda_{\max} = 580$ nm) i SLR ($\lambda_{\max} = 630$ nm).

Kako bi se utvrdili koeficijenti prijenosa kroz dugo prolazni filter od 600 nm, prvo se upotrebom pročišćenih enzima luciferaze SLO i SLR mjeri: i. intenzitet bioluminiscencije SLO i SLR bez filtra (F0), ii. intenzitet bioluminiscencije SLO i SLR koja je prošla kroz dugo prolazni filter od 600 nm (filter 1) te se iii. računaju koeficijenti prijenosa kroz dugo prolazni filter od 600 nm za SLO i SLR navedeni u nastavku.

Koeficijenti prijenosa		Kratice	Definicija
SLO	Koeficijenti prijenosa kroz filter 1	κO_{R60}	Koeficijent prijenosa filtra za SLO
SLR	Koeficijenti prijenosa kroz filter 1	κR_{R60}	Koeficijent prijenosa filtra za SLR

Ako se intenzitet SLO i SLR u ispitnom uzorku definiraju kao O i R: i. intenzitet svjetlosti bez filtra (potpuno optički) F0 i ii. intenzitet svjetlosti koja se emitira kroz dugo prolazni filter od 600 nm (filter 1) F1 opisuju se kako je prikazano u nastavku.

$$F0 = O + R$$

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

Te se formule mogu preoblikovati na sljedeći način:

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

Zatim se upotrebom izračunanih faktora propusnosti (κO_{R60} i κR_{R60}) te izmjerenih vrijednosti F0 i F1 mogu izračunati vrijednosti O i R na sljedeći način:

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

Materijali i metode za utvrđivanje faktora propusnosti

1. Reagensi

Jedinstveni pročišćeni enzimi luciferaze:

liofilizirani pročišćeni enzim SLO;

liofilizirani pročišćeni enzim SLR;

(koji su za validacijsku studiju dobiveni od laboratorija GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan sa staničnom linijom THP-G8).

Reagens za test:

reagens za test luciferaze Tripluc® (na primjer od TOYOBO Cat#MRA-301).

Medij: za test luciferaze (30 ml, pohranjeno na temperaturi od 2 do 8 °C)

Reagens	Konc.	Konačna konc. u mediju	Potrebna količina
RPMI-1640	—	—	27 ml
FBS	—	10 %	3 ml

2. Priprema otopine enzima

Otopiti liofilizirani pročišćeni enzim luciferaze u epruveti dodavanjem 200 µl pufera Tris/HCl od 10 ~ 100 mM ili Hepes/HCl (pH 7,5 ~ 8,0) obogaćenog s 10 % (w/v) glicerola, podijeliti otopinu enzima u alikvote od 10 µl u epruvetama za jednokratnu upotrebu od 1,5 ml i pohraniti ih u zamrzivač na temperaturi od – 80 °C. Zamrznuta otopina enzima može se upotrebljavati do najviše šest mjeseci. Pri upotrebi dodati 1 ml medija za test luciferaze (RPMI-1640 s 10 % FBS-a) u sve epruvete u kojima se nalaze otopine enzima (razrijeđena otopina enzima) i držati ih na ledu kako bi se spriječila deaktivacija.

3. Mjerenje bioluminiscencije

Odmrznuti reagens za test luciferaze Tripluc® (Tripluc) i držati ga na sobnoj temperaturi u vodenoj kupelji ili na sobnoj temperaturi. Uključiti luminometar 30 minuta prije početka mjerenja kako bi se omogućila stabilizacija fotomultiplikatora.

Prenijeti 100 µl razrijeđene otopine enzima na crnu ploču s 96 jažica (s ravnim dnom) (referentni uzorak SLO u #B1, #B2, #B3, a referentni uzorak SLR u #D1, #D2, #D3). Zatim pipetom prenijeti 100 µl unaprijed zagrijanog Tripluca u svaku jažicu ploče koja sadržava razrijeđenu otopinu enzima. Ploču protresati deset minuta na sobnoj temperaturi (približno 25 °C) u jedinici za miješanje. Ako se u otopini u jažicama pojave mjehurići, treba ih ukloniti. Ploču staviti u luminometar kako bi se izmjerila aktivnost luciferaze. Bioluminiscencija se mjeri tri sekunde bez optičkog filtra (F0) i tri sekunde s optičkim filtrom (F1).

Koeficijent prijenosa optičkog filtra izračunan je na sljedeći način:

Koeficijent prijenosa (SLO (κ_{OR60})) = (#B1 od F1 + #B2 od F1 + #B3 od F1) / (#B1 od F0 + #B2 od F0 + #B3 od F0)

Koeficijent prijenosa (SLR (κ_{R60})) = (#D1 od F1 + #D2 od F1 + #D3 od F1) / (#D1 od F0 + #D2 od F0 + #D3 od F0)

Izračunani faktori propusnosti upotrebljavaju se za sva mjerenja koja se obavljaju istim luminometrom.

Kontrola kvalitete opreme

Treba upotrebljavati postupke opisane u protokolu za IL-8 Luc (18.).

Dodatak 3.3.**TVARI ZA DOKAZIVANJE TEHNIČKE OSPOSOBLJENOSTI**

Prije rutinske primjene ispitivanja opisanog u ovom Dodatku ispitnoj metodi B.71. laboratoriji bi trebali dokazati svoju tehničku osposobljenost tako što će za deset tvari preporučenih u tablici 1. dobiti očekivano predviđanje na temelju testa IL-8 Luc te za najmanje osam od deset tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti (izabrane tako da predstavljaju niz odgovora povezanih s opasnostima od izazivanja preosjetljivosti kože) dobiti vrijednosti koje su unutar odgovarajućeg referentnog raspona. Ostali kriteriji za odabir uključivali su to da je tvar komercijalno dostupna te da su dostupni visokokvalitetni *in vivo* referentni podaci i visokokvalitetni *in vitro* podaci dobiveni testom IL-8 Luc. Isto tako, za test IL-8 Luc dostupni su objavljeni referentni podaci (6. i 1.).

Tablica 1.: Preporučene tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti za izvođenje testa IL-8 Luc

Tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti	CAS br.	Agregatno stanje	Topljivost u mediju X- VIVO15 pri 20 mg/ml	Predviđanje <i>in vivo</i> ¹	Predviđanje testom IL-8 Luc ²	Referentni raspon (µg/ml) ³	
						CV05 ⁴	MIT u testu IL- 8 Luc ⁵
2,4-dinitroklorbenzen	97-00-7	Kruta tvar	Netopljivo	Tvar koja izaziva preosjetljivost (ekstremno jaka)	Pozitivno	2,3–3,9	0,5–2,3
Formaldehid	50-00-0	Tekućina	Topljivo	Tvar koja izaziva preosjetljivost (jaka)	Pozitivno	9–30	4–9
2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	Kruta tvar	Netopljivo	Tvar koja izaziva preosjetljivost (umjerena)	Pozitivno	250–290	60–250
Etilendiamin	107-15-3	Tekućina	Topljivo	Tvar koja izaziva preosjetljivost (umjerena)	Pozitivno	500–700	0,1–0,4
Etilenglikol- dimetakrilat	97-90-5	Tekućina	Netopljivo	Tvar koja izaziva preosjetljivost (slaba)	Pozitivno	> 2000	0,04–0,1
4-alilanol (estragol)	140-67-0	Tekućina	Netopljivo	Tvar koja izaziva preosjetljivost (slaba)	Pozitivno	> 2000	0,01– 0,07
Streptomycin sulfat	3810-74-0	Kruta tvar	Topljivo	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	Negativno	> 2000	> 2000

Glicerol	56-81-5	Tekućina	Topljivo	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	Negativno	> 2000	> 2000
Izopropanol	67-63-0	Tekućina	Topljivo	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	Negativno	> 2000	> 2000

Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima

¹ Jakost *in vivo* utvrđena je prema kriterijima koje je predložio ECETOC (19.).

² Na temelju vrijednosti uočenih u prijašnjim ispitivanjima (1. i 6.).

³ CV05 i MIT u testu IL-8 Luc izračunani su upotrebom topljivosti u vodi koja je dobivena programom EPI SuiteTM.

⁴ CV05: najmanja koncentracija pri kojoj kemikalije pokazuju Inh-GAPLA manji od 0,05.

⁵ MIT: najniža koncentracija pri kojoj kemikalija ispunjava pozitivne kriterije.

Dodatak 3.4.**INDEKSI I KRITERIJI PROSUDBE****nIL8LA (nSLO-LA)**

J-to ponavljanje ($j = 1 - 4$) i-te koncentracije ($i = 0 - 11$) mjeri se za IL8LA (SLO-LA) i GAPLA (SLR-LA). Normalizirana IL8LA, koja se naziva nIL8LA (nSLO-LA), definira se kao:

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

To je osnovna mjerna jedinica u ovom testu.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Multiplikacijski faktor povećanja uprosječne nIL8LA (nSLO-LA) za ponavljanje i-te koncentracije u usporedbi s vrijednošću pri koncentraciji od 0, Ind-IL8LA, primarna je mjera ovog testa. Taj se omjer bilježi sljedećom formulom:

$$\text{Ind} - \text{IL8LA}_i = \{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{ij}\} / \{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{0j}\}$$

Glavni laboratorij predložio je da vrijednost od 1,4 odgovara pozitivnom rezultatu za ispitanu kemikaliju. Ta se vrijednost temelji na istraživanju prijašnjih podataka glavnog laboratorija. Tim za upravljanje podacima zatim je upotrebljavao tu vrijednost u svim fazama validacijske studije. Primarni ishod, Ind-IL8LA, omjer je dvije aritmetičke sredine, kako je prikazano u jednadžbi.

Interval pouzdanosti od 95 % (95 % CI)

Interval pouzdanosti od 95 % (95 % CI) koji se temelji na omjeru može se procijeniti kako bi se pokazala preciznost te mjere primarnog ishoda. Donja granica intervala pouzdanosti od 95 % ≥ 1 ukazuje na to da je nIL8LA s i-tom koncentracijom značajno veća od vrijednosti u kontroli s otapalom. Interval pouzdanosti od 95 % može se izvesti na nekoliko načina. U ovoj je studiji upotrijebljena metoda poznata kao Fiellerov teorem. Taj se teorem intervala pouzdanosti od 95 % dobiva prema sljedećoj formuli:

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

pri čemu je

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

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

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

$t_{0,975(v)}$ je percentil od 97,5 centralne t-distribucije s vrijednošću v stupnja slobode, pri čemu je

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

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Inh-GAPLA je omjer uprosječne GAPLA (SLR-LA) za ponavljanje i -te koncentracije u usporedbi s vrijednošću za kontrolu s otapalom, a bilježi se kao:

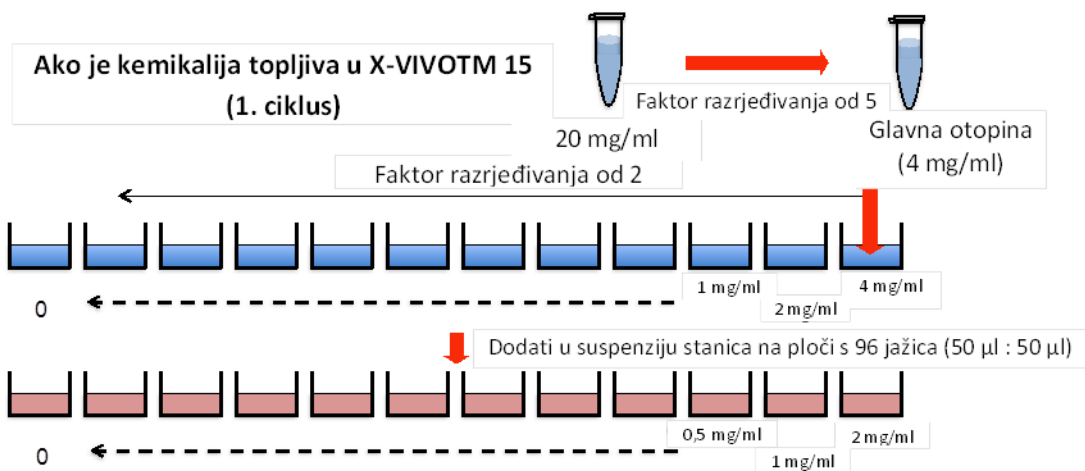
$$Inh - GAPLA_i = \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij}\} / \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j}\}.$$

Budući da je GAPLA nazivnik vrijednosti $nIL8LA$, iznimno male vrijednosti uzrokuju velike varijacije vrijednosti $nIL8LA$. Stoga se vrijednosti $Ind-IL8LA$ s iznimno malom vrijednosti $Inh-GAPLA$ (manja od 0,05) mogu smatrati slabom preciznošću.

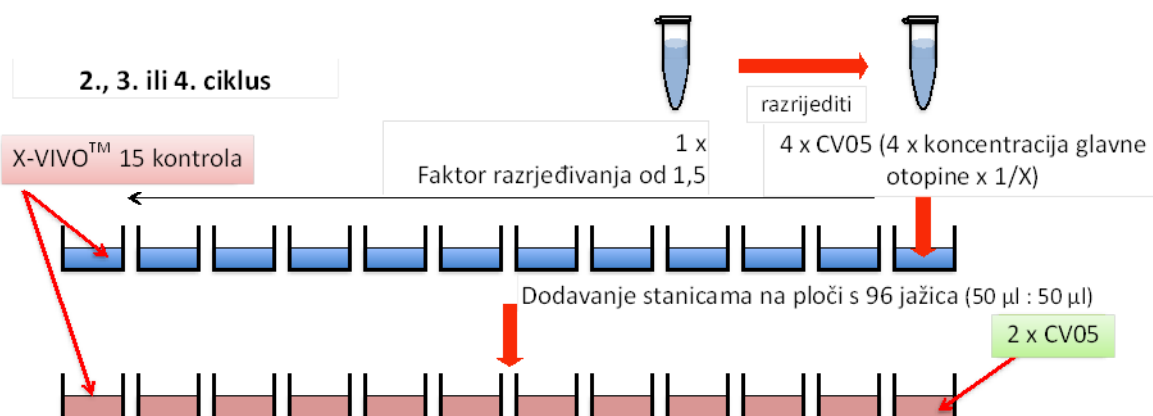
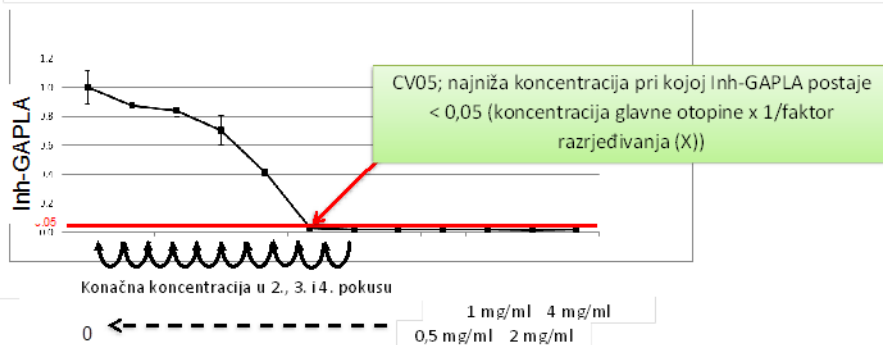
Dodatak 3.5.

PLAN METODA ZA OTAPANJE KEMIKA LIJA ZA TEST IL-8 LUC

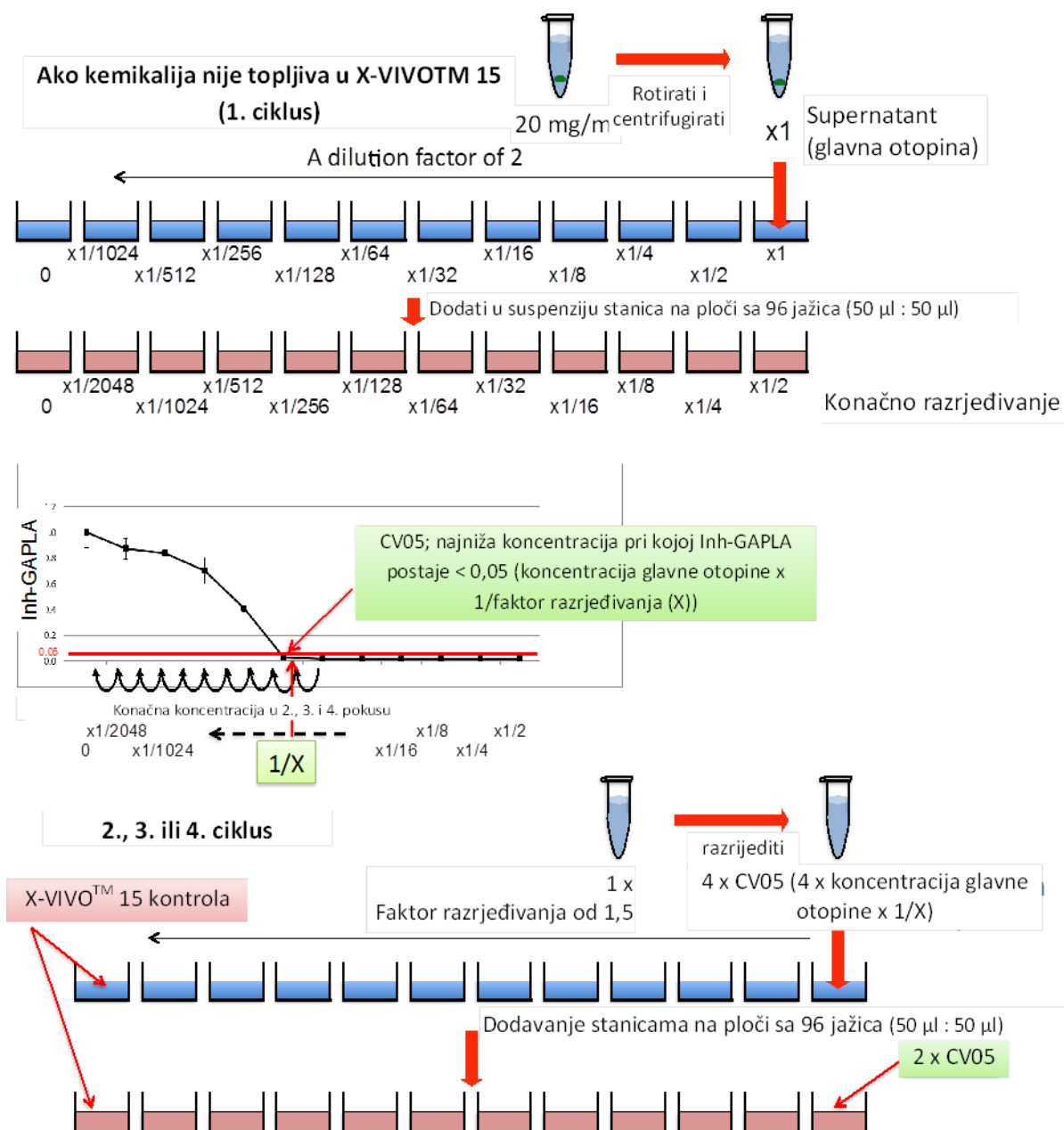
(a) Za kemikalije koje se otapaju u mediju X-VIVO™ 15 pri 20 mg/ml

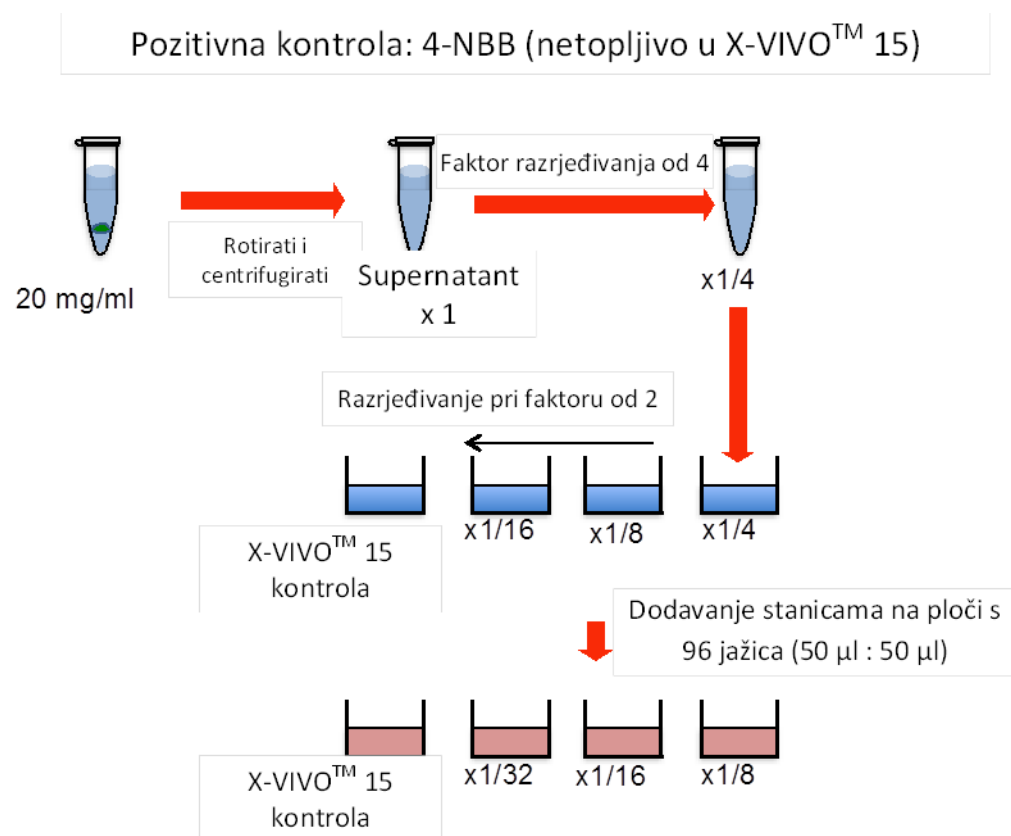


Utvrđiti najvišu koncentraciju sljedećih pokusa



(b) Za kemikalije koje nisu topljive u mediju X-VIVOTM 15 pri 20 mg/ml



Dodatak 3.6.**PLAN METODE ZA OTAPANJE 4-NBB-A ZA POZITIVNU KONTROLU U TESTU IL-8 LUC**”
”

(9) u dijelu C dodaju se sljedeća poglavlja:

„C.52. ISPITIVANJE REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI NA PRODULJENOJ GENERACIJI MEDAKE (MEOGRT)

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 240 (2015.). U ispitivanju reproduktivne toksičnosti na produljenoj generaciji medake (MEOGRT, engl. *Medaka Extended One Generation Reproduction Test*) opisuje se sveobuhvatna ispitna metoda koja se temelji na ribama koje su izlagane tijekom više generacija kako bi se dobili podaci o ekološkoj opasnosti i procjeni rizika kemikalija, uključujući navodno endokrino disruptivne kemikalije (EDC). Izlaganje u ispitivanju MEOGRT nastavlja se do valjenja (do dva tjedna nakon oplodnje) u drugoj (F2) generaciji. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se obrazložila korisnost produljenja generacije F2 poslije točke valjenja; trenutačno ne postoji dovoljno informacija koje pružaju relevantne uvjete ili kriterije koji zahtijevaju produljenje generacije F2. Međutim, ova se ispitna metoda može ažurirati nakon što se razmotre nove informacije i podaci. Na primjer, smjernice o produljenju generacije F2 reprodukcijom potencijalno bi mogle biti korisne u određenim okolnostima (npr. kemikalije s velikim potencijalom biokoncentracije ili naznake transgeneracijskih učinaka kod drugih taksona). Ova ispitna metoda može se primjenjivati za procjenu potencijalnih kroničnih učinaka kemikalija, uključujući potencijalno endokrino disruptivne kemikalije, na ribe. U metodi se najveća važnost pridaje učincima koji su potencijalno relevantni za populaciju (točnije, štetnim učincima na preživljavanje, razvoj, rast i razmnožavanje) za izračun najviše koncentracije bez vidljivog učinka (NOEC) ili koncentracije s učinkom (ECx), iako treba napomenuti da su pristupi u kojima se upotrebljava ECx rijetko primjereni za velike studije ove vrste u kojima povećanje broja ispitnih koncentracija kako bi se omogućilo utvrđivanje željene vrijednosti ECx može biti nepraktično, a može dovesti i do znatne zabrinutosti za dobrobit životinja zbog velikog broja upotrijebljenih životinja. Za kemikalije za koje nije potrebna procjena u više generacija ili za kemikalije koje nisu potencijalno endokrino disruptivne kemikalije mogu biti primjerenije druge ispitne metode (1.). Japanska medaka primjerena je vrsta za upotrebu u ovoj ispitnoj metodi zbog njezina kratkog životnog vijeka i mogućnosti utvrđivanja genetskog spola (2.), što se smatra ključnom sastavnicom ove ispitne metode. Specifične metode i krajnje točke promatranja opisane u ovoj ispitnoj metodi primjenjive su samo na japansku medaku. Druge riblje vrste manje veličine (npr. zebrica) mogu se prilagoditi sličnom protokolu ispitivanja.
2. Ovom se ispitnom metodom mjeri nekoliko bioloških krajnjih točaka. Najveća važnost pridaje se potencijalnim štetnim učincima na parametre koji su relevantni za populaciju,

uključujući preživljavanje, ukupni razvoj, rast i reprodukciju. Potom se, kako bi se pružile mehanističke informacije i poveznica s rezultatima iz drugih vrsta terenskih istraživanja i laboratorijskih studija ako postoje *a posteriori* dokazi da kemikalija potencijalno djeluje kao endokrini disruptor (npr. androgena ili estrogena aktivnost u drugim testovima i analizama), dobivaju druge korisne informacije mjerenjem mRNA za vitelogenin (*vgt*) (ili proteina vitelogenina, VTG), fenotipskih sekundarnih spolnih obilježja (SSC) koja se odnose na genetski spol te procjenom histopatologije. Treba napomenuti da, ako se ne sumnja u to da su ispitivana kemikalija ili njezini metaboliti endokrino disruptivne kemikalije, možda neće biti potrebno mjeriti te sekundarne krajnje točke te mogu biti primjerenije studije koje zahtijevaju manje resursa i manji broj životinja (1.). Definicije koje se upotrebljavaju u ovoj ispitnoj metodi navedene su u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

3. Zbog ograničenog broja ispitanih kemikalija i laboratorija uključenih u validaciju ovog poprilično složenog testa predviđa se da će se ispitna metoda revidirati i, prema potrebi, prilagoditi stečenom iskustvu kada za utvrđivanje učinka ovog novog dizajna studije bude dostupan dovoljan broj studija. Podaci se mogu upotrebljavati na petoj razini OECD-ova konceptualnog okvira za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih kemikalija (3.). Ispitna metoda započinje izlaganjem odraslih riba (generacija F0) ispitivanoj kemikaliji tijekom faze reprodukcije. Izlaganje se nastavlja tijekom razvoja i reprodukcije u generaciji F1 i valjenja u generaciji F2; stoga test omogućuje da se procijene i strukturni i aktivacijski endokrini putovi. Pri tumačenju krajnjih točaka povezanih s endokrinim sustavom može se primijeniti pristup snage dokaza.
4. U ispitivanju treba sudjelovati dovoljno jedinki kako bi se osigurala dovoljna snaga za procjenu krajnjih točaka relevantnih za reprodukciju (vidjeti Dodatak 3.), uz istovremeno osiguravanje upotrebe najmanjeg broja životinja potrebnog za ispitivanje radi dobrobiti životinja. Zbog velikog broja životinja koje se koriste važno je pažljivo razmotriti potrebu za provedbom ispitivanja u odnosu na postojeće podatke koji možda već sadržavaju relevantne informacije o brojnim krajnjim točkama u ispitivanju MEOGRT. OECD-ov okvir za ispitivanje toksičnosti za ribe može pružiti određene smjernice u tom pogledu (1.).
5. Ispitna metoda osmišljena je prvenstveno za razlikovanje učinaka jedne tvari. Međutim, ako je potrebno ispitivanje smjese, trebalo bi razmotriti hoće li se njime dobiti prihvatljivi rezultati za predviđenu regulatornu svrhu.
6. Prije započinjanja ispitivanja važno je imati informacije o fizikalno-kemijskim svojstvima ispitivane kemikalije, osobito kako bi se omogućilo dobivanje stabilnih otopina kemikalija. Važno je i imati dovoljno osjetljivu analitičku metodu za provjeru koncentracija ispitivane kemikalije.

NAČELO ISPITIVANJA

7. Ispitivanje započinje izlaganjem spolno zrelih mužjaka i ženki (najmanje 12 tjedana nakon oplodnje) u uzgojnim parovima u razdoblju od tri tjedna, tijekom kojih se ispitivana kemikalija distribuira u organizmu roditeljske generacije (F0) u skladu s njezinim toksikokinetičkim ponašanjem. Jajašca se prikupljaju što bliže prvom danu četvrtog tjedna kako bi se započela generacija F1. Tijekom uzgoja generacije F1 (ukupno 15 tjedana) procjenjuju se valjivost i preživljavanje. Osim toga ribe se uzorkuju 9–10 tjedana nakon oplodnje radi razvojnih krajnjih točaka i mriješćenje se procjenjuje tri tjedna, od 12. do 14. tjedna nakon oplodnje. Generacija F2 započinje se nakon trećeg tjedna procjene reprodukcije i uzgaja se do završetka valjenja.

KRITERIJI VALJANOSTI ISPITIVANJA

8. Primjenjuju se sljedeći kriteriji za valjanost ispitivanja:
 - tijekom cijelog ispitivanja koncentracija otopljenog kisika trebala bi iznositi $\geq 60 \%$ vrijednosti zasićenosti kisikom,
 - tijekom cijelog trajanja studije srednja temperatura vode treba biti od 24 do 26 °C. Kratka odstupanja pojedinačnih akvarija od srednje vrijednosti ne bi trebala biti veća od 2 °C,
 - srednja potencijalna plodnost kontrola u svakoj generaciji (F0 i F1) treba biti veća od 20 jajašaca po paru dnevno. Plodnost svih jajašaca koja nastanu tijekom procjene treba biti veća od 80 %. Osim toga, 16 parova od 24 preporučena kontrolna uzgojna para ($> 65 \%$) treba proizvesti više od 20 jajašaca po paru dnevno,
 - valjivost jajašaca u kontrolama treba biti $\geq 80 \%$ (prosjek) (u svakoj od generacija F1 i F2),
 - preživljavanje u kontrolama (F1) nakon valjenja do tri tjedna nakon oplodnje odnosno od tri tjedna nakon oplodnje do usmrćivanja za generaciju F1 (tj. 15 tjedana nakon oplodnje) treba biti $\geq 80 \%$ (prosjek) odnosno $\geq 90 \%$ (prosjek),
 - trebali bi postojati dokazi da su se koncentracije ispitivane kemikalije u otopini uspješno održavale u rasponu od $\pm 20 \%$ srednjih izmjerenih vrijednosti.

Kad je riječ o temperaturi vode, iako to nije kriterij valjanosti, ponavljanja u okviru tretiranja ne bi se trebala međusobno statistički razlikovati i ispitne skupine u ispitivanju ne bi se trebale međusobno razlikovati (na temelju svakodnevnog mjerenja temperature i isključujući kratka odstupanja).

9. Iako se smanjena reprodukcija može uočiti u skupinama s većim izlaganjem, reprodukcija bi se trebala odvijati u dovoljnoj mjeri barem u trećoj najvišoj skupini i svim nižim

skupinama generacije F0 kako bi se napunili inkubatori za valjenje. Nadalje, u trećoj najvišoj skupini i nižim skupinama izlaganja u generaciji F1 treba doći do primjerenog preživljavanja embrija kako bi se omogućila procjena krajnjih točaka na uzorcima riba koje nisu odrasle (vidjeti stavke 36. i 38. te Dodatak 9.). Osim toga, treba doći do barem minimalnog preživljavanja nakon valjenja (~ 20 %) u drugoj najvišoj skupini izlaganja generacije F1. To nisu kriteriji valjanosti sami po sebi, već preporuke kojima se omogućuje izračun pouzdanih vrijednosti NOEC.

10. Ako se uoči odstupanje od kriterija valjanosti ispitivanja, potrebno je razmotriti posljedice u odnosu na pouzdanost rezultata ispitivanja te ta odstupanja i razmatranja uključiti u izvješće o ispitivanju.

OPIS METODE

Oprema

11. Uobičajena laboratorijska oprema, posebno:

- (a) mjerači kisika i pH-vrijednosti;
- (b) oprema za utvrđivanje tvrdoće i lužnatosti vode;
- (c) odgovarajući uređaji za regulaciju temperature i po mogućnosti stalno praćenje;
- (d) akvariji izrađeni od kemijski inertnog materijala i odgovarajuće veličine s obzirom na preporučeno punjenje i gustoću nasada (vidjeti Dodatak 3.);
- (e) vaga prikladne točnosti (odnosno točnost u rasponu od $\pm 0,5$ mg).

Voda

12. Kao ispitna voda može se koristiti svaka voda koja je prikladna za preživljavanje i rast ispitne vrste u dovoljno dugom razdoblju. Ona treba biti stalne kakvoće tijekom razdoblja ispitivanja. Kako voda za razrjeđivanje ne bi neprimjereno utjecala na rezultat ispitivanja (npr. kompleksiranjem ispitivane kemikalije) ili imala negativan utjecaj na uspješnost uzgojnog jata, potrebno je u određenim razmacima uzimati uzorke na analizu. Mjerenja teških metala (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), glavnih aniona i kationa (npr. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), pesticida, ukupnog organskog ugljika i suspendirane krute tvari treba provoditi npr. svakih šest mjeseci ako se zna da je voda za razrjeđivanje relativno stalne kakvoće. Neka kemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeđivanje navedena su u Dodatku 2. pH vode treba biti u području od 6,5 do 8,5, ali tijekom jednog ispitivanja ne smije odstupati za više od $\pm 0,5$ pH jedinica.

Sustav izlaganja

13. Nisu utvrđeni dizajn i materijali koji se upotrebljavaju za sustav izlaganja. Za izgradnju ispitnog sustava koji nije kontaminiran tijekom prethodnih ispitivanja treba upotrebljavati staklo, nehrđajući čelik ili drugi kemijski inertan materijal. Za potrebe ovog ispitivanja primjeren sustav izlaganja može se sastojati od kontinuiranog protočnog sustava (4., 5., 6., 7., 8., 9., 10., 11., 12. i 13.).

Ispitne otopine

14. Glavnu otopinu ispitivane kemikalije treba uvesti u sustav izlaganja odgovarajućom crpkom. Brzinu protoka glavne otopine treba kalibrirati u skladu s analitičkom potvrdom ispitnih otopina prije početka izlaganja i tijekom ispitivanja periodično volumetrijski provjeravati. Ispitna otopina u svakoj komori primjereno se obnavlja (npr. najmanje pet obnavljanja volumena dnevno do 16 obnavljanja volumena dnevno ili do protoka od 20 ml/min), ovisno o stabilnosti ispitivane kemikalije i kvaliteti vode.
15. Ispitne otopine odabranih koncentracija pripremaju se razrjeđivanjem glavne otopine. Glavnu otopinu trebalo bi po mogućnosti pripremiti jednostavnim miješanjem ili mućkanjem ispitivane kemikalije u vodi za razrjeđivanje mehaničkim sredstvima (npr. miješanjem i/ili tretiranjem ultrazvukom). Za postizanje odgovarajuće koncentracije glavne otopine mogu se upotrebljavati kolone/sustavi za zasićivanje ili pasivne metode doziranja (14.). Treba nastojati izbjeći otapala ili nosače jer: 1. određena otapala sama po sebi mogu dovesti do toksičnosti i/ili nepoželjnih ili neočekivanih odgovora; 2. ispitivanje kemikalija iznad njihove topljivosti u vodi (što se često javlja upotrebom otapala) može dovesti do pogrešnih utvrđivanja učinkovitih koncentracija; 3. upotreba otapala u dugoročnim ispitivanjima može dovesti do znatnog stupnja nastanka „biofilma” povezanog s djelovanjem mikroba, što može utjecati na okolišne uvjete te sposobnost održavanja koncentracija izlaganja i 4. ako ne postoje prijašnji podaci koji pokazuju da otapalo ne utječe na ishod studije, upotreba otapala zahtijeva tretiranje kontrola s otapalom, što ima posljedice u pogledu dobrobiti životinja jer su potrebne dodatne životinje za provedbu ispitivanja. Za kemikalije koje se teško ispituju, otapalo se može upotrebljavati kao krajnje sredstvo i potrebno je proučiti Smjernicu OECD-a 23 za ispitivanje toksičnosti teških tvari i smjesa u vodi (15.) kako bi se utvrdila najbolja metoda. Odabir otapala ovisit će o kemijskim svojstvima ispitivane kemikalije i dostupnosti prijašnjih podataka o upotrebi otapala. Ako se upotrebljavaju otapala nosači, uz (negativne) kontrole bez otapala (samo voda za razrjeđivanje) treba procijeniti i primjerene kontrole s otapalom. Ako se ne može izbjeći upotreba otapala i dođe do djelovanja mikroba (nastanak biofilma), preporučuje se evidentiranje/izvješćivanje o nastanku biofilma po spremniku (najmanje jednom tjedno) tijekom cijelog ispitivanja. U idealnim uvjetima koncentraciju otapala u kontroli s otapalom i svim ispitnim obradama trebalo bi održavati stalnom. Ako se koncentracija otapala ne održava stalnom, najvišu koncentraciju otapala u ispitnoj obradi treba upotrijebiti u kontroli s otapalom. U slučajevima u kojima se upotrebljava otapalo nosač

najviše koncentracije otapala ne bi smjele biti veće od 100 µl/l ili 100 mg/l (15.) i preporučuje se da se koncentracija otapala održava što nižom (npr. < 20 µl/l) kako bi se izbjegao mogući učinak otapala na krajnje točke koje se mjere (16.).

Ispitne životinje

Odabir i držanje riba

16. Ispitna je vrsta japanska medaka *Oryzias latipes* zbog njezina kratkog životnog vijeka i mogućnosti utvrđivanja genetskog spola. Iako se druge riblje vrste manje veličine mogu prilagoditi sličnom protokolu ispitivanja, specifične metode i krajnje točke promatranja opisane u ovoj ispitnoj metodi primjenjive su samo na japansku medaku (vidjeti stavak 1.). Medaka se lako uzgaja u zatočeništvu; postoje objavljene metode za njezinu kulturu (17., 18. i 19.) te su dostupni podaci iz kratkoročnih ispitivanja smrtonosnog djelovanja, ispitivanja u ranim životnim stadijima i ispitivanja cijelog životnog ciklusa (5., 6., 8., 9. i 20.). Sve se ribe drže u fotoperiodu od 16 sati svjetla i osam sati tame. Riba se hrane živim ličinkama račića *Artemia* spp. koje se po potrebi mogu dopuniti komercijalno dostupnom hranom u listićima. Komercijalno dostupnu hranu u listićima treba redovito analizirati radi kontaminirajućih tvari.
17. Ako se primjenjuje odgovarajuće gospodarenje životinjama, nije potreban specifičan protokol za uzgoj. Na primjer, medake se mogu uzgajati u spremnicima od dvije litre s 240 ličinki riba po spremniku do četiri tjedna nakon oplodnje, a zatim se mogu uzgajati u spremnicima od dvije litre s deset riba po spremniku do osam tjedna nakon oplodnje, kada se raspoređuju u uzgojne parove u spremnicima od dvije litre.

Aklimatizacija i odabir riba

18. Ispitne ribe treba odabrati iz iste laboratorijske zalihe koja je najmanje dva tjedna prije ispitivanja aklimatizirana u uvjetima kakvoće vode i osvjetljenja koji su slični ispitnim uvjetima (napomena: to razdoblje aklimatizacije nije razdoblje prije izlaganja *in situ*). Preporučuje se da se ispitne ribe dobiju iz interne kulture jer je prijevoz odraslih riba stresan i može ometati pouzdano mriješćenje. Riba treba hraniti ličinkama račića *Artemia* dvaput dnevno tijekom cijelog razdoblja držanja i tijekom faze izlaganja, koje se po potrebi dopunjuju komercijalno dostupnom hranom u listićima. Smatra se da su za početak ovog ispitivanja potrebna najmanje 42 uzgojna para (54 uzgojna para ako je potrebna kontrola s otapalom, djelomično zbog nedostatka prijašnjih podataka kojima se podupire upotreba kontrole samo s otapalom) kako bi se osigurala primjerena replikacija. Osim toga, treba provjeriti ima li svaki uzgojni par generacije F0 gene XX-XY (tj. uobičajeni par spolnih kromosoma za svaki spol) kako bi se spriječilo moguće uključivanje mužjaka kod kojih se spontano javljaju parovi XX (vidjeti stavak 39.).

19. Tijekom faze aklimatizacije treba evidentirati smrtnost riba u kulturi i primijeniti sljedeće kriterije nakon razdoblja prilagodbe od 48 sati:
- smrtnost iznad 10 % populacije kulture u sedam dana prije prijenosa u ispitni sustav: odbacuje se cijela šarža,
 - smrtnost od 5 % do 10 % populacije u sedam dana prije prijenosa u ispitni sustav: aklimatizacija se nastavlja još sedam dana nakon razdoblja aklimatizacije od dva tjedna; ako je smrtnost tijekom drugih sedam dana veća od 5 %, odbacuje se cijela šarža,
 - smrtnost manja od 5 % populacije u sedam dana prije prijenosa u ispitni sustav: šarža se prihvaća.
20. Riba se ne smiju liječiti u razdoblju aklimatizacije od dva tjedna prije ispitivanja ni tijekom razdoblja izlaganja te liječenje treba u potpunosti izbjegavati ako je moguće. Riba s kliničkim znakovima bolesti ne treba koristiti u studiji. Treba voditi evidenciju opažanja i svih profilaktičkih i terapijskih liječenja tijekom razdoblja kulture koje prethodi ispitivanju.
21. Fazu izlaganja treba započeti spolno dimorfnom odraslom ribom, kojoj je genetski utvrđen spol, iz laboratorijske skupine reproduktivno zrelih životinja koje se uzgajaju na 25 ± 2 °C. Riba treba identificirati kao dokazane rasplodne životinje (tj. dale su žive potomke) tijekom tjedna koji prethodi izlaganju. Pojedinačne mase riba po spolu u cijeloj skupini koja se koristi u ispitivanju trebale bi se na početku ispitivanja nalaziti u granicama od ± 20 % aritmetičke srednje mase istog spola. Prije ispitivanja treba izvagati poduzorak riba radi procjene srednje mase. Treba odabrati ribe starosti od najmanje 12 tjedana nakon oplodnje, mase ≥ 300 mg za ženke i ≥ 250 mg za mužjake.

PLAN ISPITIVANJA

Ispitne koncentracije

22. Preporučuje se upotreba pet koncentracija kemikalija i kontrole. Pri odabiru raspona ispitnih koncentracija treba razmotriti sve izvore informacija, uključujući kvantitativne odnose strukture i djelovanja (QSAR), primjenu analogije s analognim kemikalijama, rezultate ispitivanja riba kao što su analize akutne smrtnosti (poglavljje C.1. ovog Priloga), kratkoročni reproduksijski test na ribama (poglavljje C.48. ovog Priloga) i druge ispitne metode, npr. poglavljja C.15., C.37., C.41., C.47. i C.49. ovog Priloga (21., 22., 23., 24., 25. i 26.), ako su dostupni, ili, prema potrebi, ispitivanje za utvrđivanje raspona koje može uključivati fazu reprodukcije. Ako je potrebno, ispitivanje za utvrđivanje raspona može se provesti u uvjetima (kakvoća vode, ispitni sustav, prostor za određeni broj životinja) koji su slični onima koji se upotrebljavaju u konačnom ispitivanju. Ako se mora upotrijebiti otapalo, a nisu dostupni prijašnji podaci, može se upotrijebiti ispitivanje za utvrđivanje

raspona kako bi se utvrdila prikladnost otapala. Najviša ispitna koncentracija ne smije biti viša od topljivosti u vodi, 10 mg/l ili 1/10 koncentracije LC50 u 96 h (27.). Najniža koncentracija trebala bi biti manja od najviše koncentracije za faktor od 10 do 100 puta. Upotrebom pet koncentracija u ovom ispitivanju ne omogućuje se samo mjerenje odnosa između doze i odgovora, već se dobiva i najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC) i NOEC, koji su potrebni za procjenu rizika u nekim regulatornim programima ili nadležnostima. Interval između nominalnih koncentracija ispitivane kemikalije između susjednih razina tretiranja obično je $\leq 3,2$.

Ponavljanja unutar ispitnih skupina i kontrola

23. Treba upotrijebiti najmanje šest ispitnih komora s ponavljanjem po ispitnoj koncentraciji (vidjeti Dodatak 7.). Tijekom reproduktivne faze (osim kod generacije F0), replikacijska struktura udvostručuje se za procjenu potencijalne plodnosti i za svako ponavljanje koristi se samo jedan uzgojni par (vidjeti stavak 42.).
24. Uz ispitne koncentracije trebalo bi provesti kontrolu s vodom za razrjeđivanje i, prema potrebi, kontrolu s otapalom. Za kontrole treba upotrijebiti udvostručeni broj komora s ponavljanjem kako bi se osigurala primjerena statistička snaga (tj. za kontrole treba upotrebljavati najmanje 12 ponavljanja). Tijekom reproduktivne faze broj ponavljanja u kontrolama udvostručuje se (tj. najmanje 24 ponavljanja i u svakom je ponavljanju samo jedan uzgojni par koji će se pariti). Nakon reprodukcije kontrolna ponavljanja trebaju sadržavati najviše 20 embrija (riba).

POSTUPAK

Početak ispitivanja

25. Reproktivno aktivne odrasle ribe koje se upotrebljavaju za započinjanje generacije F0 ispitivanja odabiru se na temelju dva kriterija: dobi (obično više od 12 tjedana nakon oplodnje, ali po mogućnosti ne više od 16 tjedana) i mase (treba biti ≥ 300 mg za ženke i ≥ 250 mg za mužjake).
26. Parovi ženki i mužjaka koji ispunjavaju prethodne specifikacije premještaju se kao pojedinačni parovi u svaki spremnik s ponavljanjem, tj. 12 ponavljanja u kontrolama i šest ponavljanja u tretiranjima kemikalijom na početku ispitivanja. Tim se spremnicima nasumično dodjeljuju oznake za tretiranje (npr. T1–T5 i kontrola) i ponavljanje (npr. A–L u kontrolama i A–F u tretiranjima) te se zatim stavljaju u sustav izlaganja s odgovarajućim protokom u svaki spremnik.

Uvjeti izlaganja

27. Potpuni sažetak ispitnih parametara i uvjeta dostupan je u Dodatku 3. Poštovanje tih specifikacija treba dovesti do kontrolnih riba čije su vrijednosti krajnjih točaka slične onima navedenima u Dodatku 4.
28. Otopljeni kisik, pH i temperaturu treba mjeriti u barem jednoj ispitnoj posudi svake ispitne skupine i kontrole tijekom ispitivanja. Ta mjerenja, osim temperature, treba obavljati barem jednom tjedno tijekom cijelog razdoblja izlaganja. Srednja temperatura vode tijekom cijelog trajanja studije treba biti od 24 do 26 °C. Temperaturu treba mjeriti svakog dana tijekom cijelog razdoblja izlaganja. pH vode treba biti u području od 6,5 do 8,5, ali tijekom jednog ispitivanja ne smije odstupati za više od $\pm 0,5$ pH jedinica. Ponavljanja u tretiranju međusobno se ne bi trebala statistički razlikovati i ispitne skupine u ispitivanju ne bi se trebale međusobno razlikovati (na temelju svakodnevnog mjerenja temperature i isključujući kratka odstupanja).

Trajanje izlaganja

29. U ispitivanju se spolno zrele ribe iz generacije F0 izlažu u trajanju od tri tjedna. Četvrtog tjedna, približno na 24. ispitni dan, uspostavlja se generacija F1 i uzgojni parovi generacije F0 humano se usmrćuju te se evidentiraju njihova masa i duljina (vidjeti stavak 34.). Nakon toga slijedi izlaganje generacije F1 u trajanju od još 14 tjedana (ukupno 15 tjedana za F1) i generacije F2 tijekom dva tjedna do valjenja. Ukupno trajanje ispitivanja iznosi u prvom redu 19 tjedana (tj. do valjenja generacije F2). Vremenski okvir za ispitivanje prikazan je u tablici 2. i dodatno podrobno objašnjen u Dodatku 9.

Režim hranjenja

30. Ribe se mogu hraniti *ad libitum* račićima *Artemia* spp. (stari 24 sata, ličinke), koji se po potrebi mogu dopuniti komercijalno dostupnom hranom u listićima. Komercijalno dostupnu hranu u listićima treba redovito analizirati radi kontaminirajućih tvari, kao što su organoklorni pesticidi, policiklički aromatski ugljikovodici (PAH-i), poliklorirani bifenili (PCB-i). Treba izbjegavati hranu s povišenom razinom endokrinološki aktivnih tvari (tj. fitoestrogena) koje bi mogle dovesti u pitanje odgovor ispitivanja. Nepojedenu hranu i izmet treba prema potrebi uklanjati iz ispitnih posuda, primjerice pažljivim čišćenjem dna svakog akvarija s pomoću sifona. Stranice i dno svakog akvarija isto treba čistiti jednom ili dvaput tjedno (npr. struganjem s pomoću lopatice). Primjer rasporeda hranjenja dostupan je u Dodatku 5. Količina hrane temelji se na broju riba po ponavljanju. Stoga se količina hrane smanjuje ako se u ponavljanju javi smrtnost.

Analitička utvrđivanja i mjerenja

31. Prije početka razdoblja izlaganja potrebno je osigurati pravilno funkcioniranje sustava dovoda kemikalije. Potrebno je utvrditi sve potrebne analitičke metode, uključujući dostatna saznanja o stabilnosti kemikalije u ispitnom sustavu. Koncentracije ispitivane

kemikalije utvrđuju se u primjerenim razmacima tijekom ispitivanja, po mogućnosti barem svakog tjedna u jednom ponavljanju za svaku ispitnu skupinu, uz rotaciju ponavljanja iz iste ispitne skupine svakog tjedna.

32. Brzine protoka sredstva za razrjeđivanje i glavne otopine treba provjeravati u odgovarajućim razmacima tijekom ispitivanja (npr. najmanje tri puta tjedno). Preporučuje se da se rezultati temelje na izmjerenim koncentracijama. Međutim, ako je tijekom ispitivanja koncentracija ispitivane kemikalije u otopini uspješno održavana unutar 20 % srednjih izmjerenih vrijednosti, tada se rezultati mogu temeljiti na nominalnim ili izmjerenim vrijednostima. U slučaju kemikalija koje se znatno akumuliraju u ribi, ispitne koncentracije mogu se smanjiti kako ribe rastu. U tim se slučajevima preporučuje da se prilagodi stopa obnavljanja ispitne otopine u svakoj komori kako bi se ispitne koncentracije održale što stabilnijima.

Opažanja i izmjerene krajnje točke

33. Krajnje točke koje se mjere uključuju potencijalnu plodnost, plodnost, valjenje, rast i preživljavanje radi procjene mogućih učinaka na razni populacije. Svakodnevno treba opažati i ponašanje te evidentirati svako neuobičajeno ponašanje. Ostale mehanističke krajnje točke uključuju imunotest za određivanje razine hepatskog *vtg* mRNA ili proteina VTG (28.), spolne fenotipske markere kao što papile na podrepnoj peraji karakteristične za mužjake, histološku ocjenu gonadnog spola te histopatološku ocjenu bubrega, jetre i gonada (vidjeti popis krajnjih točaka u tablici 1.). Sve se te specifične krajnje točke ocjenjuju u kontekstu utvrđivanja genetskog spola jedinke, na temelju prisustva ili odsustva gena *dmy*, kojim se određuje muški spol medake (vidjeti stavak 41.). Uz to se ocjenjuje i vrijeme mriješćenja. Osim toga, mogu se izvesti jednostavni omjeri fenotipskog spola upotrebom informacija o broju papila na podrepnoj peraji kako bi se pojedinačne medake utvrdile kao fenotipski mužjaci ili ženke. Ne očekuje se da će se ovom ispitnom metodom utvrditi mala odstupanja od očekivanog omjera spolova jer relativno mali broj riba po ponavljanju neće osigurati dovoljnu statističku snagu. Isto tako, tijekom histopatološke ocjene procjenjuju se gonade i provode se znatno pouzdanije analize za procjenu gonadnog fenotipa u kontekstu genetskog spola.
34. Primarni je cilj ove ispitne metode ocijeniti učinke ispitivane kemikalije koji su potencijalno relevantni za populaciju. Mehanističke krajnje točke (VTG, SSC-i i određeni histopatološki učinci na gonade) isto mogu pomoći da se utvrdi posreduje li endokrina aktivnost nekim učincima. Međutim, na te mehanističke krajnje točke mogu utjecati i sustavne i druge toksičnosti. Stoga se mogu detaljno ocijeniti i histopatološki pregledi jetre i bubrega kako bi se pomoglo u boljem razumijevanju mogućih odgovora na mehanističkim krajnjim točkama. Međutim, ako se ne provode te detaljne ocjene, ipak

treba evidentirati velike abnormalnosti koje su slučajno uočene tijekom histopatološke ocjene i treba izvijestiti o njima.

Humano usmrćivanje riba

35. Kod završetka izlaganja generacija F0 i F1, kada se uzimaju poduzorci riba koje nisu odrasle, ribe treba eutanazirati odgovarajućim količinama otopine anestetika (npr. trikain-metansulfonat, MS-222 (CAS.886-86-2), 100–500 mg/l) puferiranim s 300 mg/l NaHCO₃ (natrijev bikarbonat, CAS.144-55-8) kako bi se smanjilo nadraživanje sluznice. Ako ribe pokazuju znakove znatne patnje (vrlo teška patnja i smrt mogu se pouzdano predvidjeti) te se smatra da su na umoru, životinje treba anestezirati i eutanazirati, a u analizi podataka te se ribe tretiraju kao smrtnost. Ako se riba eutanazira zbog morbiditeta, to treba evidentirati i o tome treba izvijestiti. Riba se može zadržati radi provedbe histopatološke analize ovisno o tome u kojoj se fazi studije eutanazira (fiksiranje ribe za moguću histopatološku analizu).

Rukovanje jajašcima i ličinkama riba

Prikupljanje jajašaca uzgojnih parova radi razmnožavanja sljedeće generacije

36. Jajašca se prikupljaju prvog dana (ili po potrebi prva dva dana) četvrtog ispitnog tjedna za prelazak s generacije F0 na generaciju F1 te 18. ispitnog tjedna za prelazak s generacije F1 na generaciju F2. Osamnaesti ispitni tjedan odgovara generaciji F1, odraslim ribama 15 tjedana nakon oplodnje. Važno je iz svakog spremnika ukloniti sva jajašca jedan dan prije početka prikupljanja jajašaca kako bi se osiguralo da su sva jajašca koja se prikupe od uzgojnog para iz istog mriješta. Nakon mriješćenja ženke medake ponekad nose svoja jajašca blizu otvora dok ih ne polože na supstrat. Ako u spremniku nema supstrata, jajašca mogu biti pričvršćena na ženku ili na dnu spremnika. Ovisno o tome gdje se nalaze, jajašca se oprezno uklanjaju sa ženke ili se s pomoću sifona uklanjaju s dna četvrtog ispitnog tjedna generacije F0 i 18. ispitnog tjedna generacije F1. Sva jajašca prikupljena u okviru tretiranja objedinjuju se prije distribucije u inkubacijske komore.
37. Treba ukloniti filamente jajašaca, koji drže jajašca mriješta na okupu. Oplodena jajašca (do 20) prikupljaju se od svakog uzgojnog para (jedan par po ponavljanju), objedinjuju se prema tretiranju i sustavno distribuiraju u primjerene inkubacijske komore (dodaci 6. i 7.). Upotrebom kvalitetnog disekcijskog mikroskopa mogu se uočiti znakovi rane oplodnje/razvoja kao što su stvaranje fertilizacijske membrane (korion), dioba stanica koja je u tijeku ili nastanak blastule. Komore inkubatora mogu se staviti u posebne „inkubacijske akvarije” koji se uspostavljaju za svako tretiranje (u tom se slučaju u njima moraju izmjeriti parametri kakvoće vode i koncentracije ispitivanih kemikalija) ili u akvarij s ponavljanjem u kojem će se držati izvaljene ličinke (npr. eleutero-embrij). Ako je

potreban drugi dan prikupljanja (23. ispitni dan), sva jajašca iz oba dana treba objediniti i zatim sustavno raspodijeliti u svako od ponavljanja tretiranja.

Uzgoj jajašaca do valjenja

38. Oplođena jajašca kontinuirano se protresaju, npr. mjehurićima zraka u inkubatoru jajašaca ili vertikalnim njihanjem inkubatora jajašaca. Smrtnost oplođenih jajašaca (embrija) svakodnevno se provjerava i evidentira. Mrtva jajašca uklanjaju se iz inkubatora (Dodatak 9.). Sedmog dana nakon oplodnje protresanje se zaustavlja ili smanjuje kako bi se jajašca spustila na dno inkubatora. Time se potiče valjenje, do kojeg obično dolazi sljedećeg dana ili za dva dana. Mladunci (mlade ličinke; eleutero-embrij) broje se za svako tretiranje i kontrolu (osnova objedinjenih ponavljanja). Oplođena jajašca koja se ne izvale u razdoblju dvostruko duljem od srednjeg dana valjenja u kontroli (obično 16 ili 18 dana nakon oplodnje) smatraju se neodrživima te se odbacuju.
39. U svaki se spremnik s ponavljanjem premješta 12 mladunaca. Mladunci iz inkubacijskih komora objedinjuju se i sustavno distribuiraju u spremnike s ponavljanjem (Dodatak 7.). To se može obaviti nasumičnim odabirom mladunca iz skupine za tretiranje i uzastopnim dodavanjem mladunaca neselektivnim izvlačenjem u akvarij s ponavljanjem. Svaki spremnik treba sadržavati jednak broj ($n = 12$) izvaljenih ličinki (najviše 20 ličinki u svakom spremniku). Ako nema dovoljno mladunaca da bi se popunila sva ponavljanja tretiranja, preporučuje se da što više ponavljanja ima 12 mladunaca. Mladuncima se sigurno može rukovati s pomoću staklenih pipeta velikog promjera. Svi dodatni mladunci humano se usmrćuju anestetikom. Tijekom nekoliko tjedana prije uspostave uzgojnih parova treba evidentirati dan na koji se u svakom ponavljanju uoči prvo mriješćenje.

Uspostava uzgojnih parova

Obrezivanje peraja i utvrđivanje genotipskog spola

40. Utvrđivanje genotipskog spola rezanjem peraja obavlja se od devetog do desetog tjedna nakon oplodnje (tj. od 12. do 13. ispitnog tjedna za generaciju F1). Sve ribe u spremniku anesteziraju se (upotrebom odobrenih metoda, npr. IACUC) i uzima se mali uzorak s leđnog ili trbušnog vrha repne peraje svake ribe kako bi se utvrdio genotipski spol jedinke (29.). Ribe iz ponavljanja mogu se smjestiti u male kaveze (po mogućnosti jedna riba po kavezu) u spremniku s ponavljanjem. Umjesto toga, u kavezu se mogu držati dvije ribe ako ih se može razlikovati. Jedna je metoda da se pri uzimanju uzorka tkiva repna peraja različito odreže (npr. leđni ili trbušni vrh).
41. Genotipski spol medake utvrđuje se identificiranim i sekvenciranim genom (*dmy*) koji se nalazi na Y kromosomu. Prisustvo gena *dmy* ukazuje na jedinku XY bez obzira na fenotip, dok njegovo odsustvo ukazuje na jedinku XX bez obzira na fenotip (30.); (31.). Iz svakog uzorka peraje ekstrahira se deoksiribonukleinska kiselina (DNK), a prisustvo ili odsustvo

gena *dmy* može se utvrditi metodama lančane reakcije polimerazom (PCR) (vidjeti Dodatak 9. u poglavlju C.41. ovog Priloga ili dodatke 3. i 4. u literaturi pod 29.).

Utvrđivanje uzgojnih parova

42. Informacije o genotipskom spolu upotrebljavaju se za utvrđivanje uzgojnih parova XX-XY neovisno o vanjskom fenotipu koji se može izmijeniti izlaganjem ispitivanoj kemikaliji. Na dan nakon utvrđivanja genotipskog spola svake ribe nasumično se odabiru dvije ribe XX i dvije ribe XY iz svakog ponavljanja i utvrđuju se dva uzgojna para XX-XY. Ako u ponavljanju ne postoje dvije ribe XX ili dvije ribe XY, primjerene ribe treba uzeti iz drugih ponavljanja u tretiranju. Prioritet je dobiti preporučeni broj ponavljanja uzgojnih parova (12) u svakom tretiranju i u kontrolama (24). Riba s očiglednim abnormalnostima (problemi s plivačim mjehurom, deformacije kralježnice, iznimne varijacije u veličini itd.) trebalo bi isključiti pri utvrđivanju uzgojnih parova. Tijekom reproduktivske faze za generaciju F1 svaki spremnik s ponavljanjem treba sadržavati samo jedan uzgojni par.

Uzorkovanje riba koje nisu odrasle i ocjena krajnjih točaka

Uzorkovanje riba koje nisu u uzgojnim parovima

43. Nakon uspostave uzgojnih parova ribe koje nisu odabrane za daljnji uzgoj humano se usmrćuju radi mjerenja krajnjih točaka riba koje nisu odrasle u ispitnim tjednima od 12. do 13. (F1). Iznimno je važno da se s ribama postupa tako da se genotipski spol utvrđen za odabir uzgojnih parova i dalje može povezati s pojedinačnim ribama. Svi prikupljeni podaci analiziraju se u kontekstu genotipskog spola određene ribe. Svaka se riba upotrebljava za različita mjerenja krajnjih točaka, među ostalim: utvrđivanje stopa preživljavanja juvenilnih riba/riba koje nisu odrasle (od sedmog do 12. ili 13. ispitnog tjedna (F1)), rast u duljinu (standardna duljina može se izmjeriti ako je repna peraja skraćena u svrhu uzorkovanja radi analize genetskog spola). Ukupna duljina može se izmjeriti ako se samo dio repne peraje, leđni ili trbušni, uzorkuje za *dmy* i tjelesnu masu (tj. mokra masa, osušeno upijajućim materijalom), *vtg* mRNA (ili VTG) iz jetre i papile na podrepnoj peraji (vidjeti tablice 1. i 2.). Napominje se da su mase i duljine uzgojnih parova potrebne i za izračun srednjeg rasta u ispitnoj skupini.

Uzorkovanje tkiva i mjerenje vitelogenina

44. Jetra se disecira i treba je spremiti na temperaturu ≤ -70 °C do mjerenja *vtg* mRNA (ili VTG-a). Rep ribe, uključujući repnu peraju, čuva se u odgovarajućem fiksativu (npr. Davidsonov fiksativ) ili se fotografira tako da se papile na podrepnoj peraji mogu prebrojati u kasnijoj fazi. Po želji se istovremeno mogu uzorkovati i sačuvati i druga tkiva (npr. gonade). Koncentraciju VTG-a u jetri treba kvantificirati homolognom ELISA tehnikom (vidjeti preporučene postupke za medaku u Dodatku 6. u poglavlju C.48. ovog Priloga). Umjesto toga, Agencija SAD-a za zaštitu okoliša (U.S. EPA) utvrdila je metode

za kvantifikaciju vtg mRNA, tj. ekstrakciju mRNA gena *vtg I* iz uzorka jetre i kvantifikaciju broja kopija gena *vtg I* (po nanogramu ukupnog mRNA) s pomoću kvantitativne metode lančane reakcije polimerazom (29.). Umjesto utvrđivanja broja kopija gena *vtg* u kontrolnim i ispitnim skupinama, može se upotrijebiti i metoda koja je ekonomičnija i tehnički manje zahtjevena, odnosno utvrđivanje relativne promjene (omjer) u ekspresiji gena *vtg I* iz kontrolnih i ispitnih skupina.

Sekundarna spolna obilježja

45. U normalnim okolnostima samo spolno zreli mužjaci medake imaju papile, koje se razvijaju kao sekundarno spolno obilježje na kostima bodlje šipčice određenih podrepnih peraja, što čini potencijalni biomarker za endokrino disruptivne učinke. Metoda brojanja papila na podreпној peraji (broj kosti bodlje s papilama) nalazi se u Dodatku 8. Isto tako, broj papila na podreпној peraji po jedinki upotrebljava se za kategorizaciju te jedinke kao mužjaka ili ženke prema vanjskom fenotipu u svrhu izračuna jednostavnog omjera spolova po ponavljanju. Medaka s bilo kojim brojem većim od nule definira se kao mužjak; medaka bez papila na podreпној peraji definira se kao ženka.

Procjena potencijalne i stvarne plodnosti

46. Potencijalna i stvarna plodnost procjenjuju se od prvog do trećeg ispitnog tjedna kod generacije F0 te od 15. do 17. ispitnog tjedna kod generacije F1. Jajašca se prikupljaju svakodnevno od svakog uzgojnog para 21 uzastopan dan. Jajašca se svakog jutra nježno uklanjaju s ulovljenih ženki i/ili se s pomoću sifona uklanjaju s dna akvarija. I potencijalna i stvarna plodnost svakodnevno se evidentiraju za svaki uzgojni par ponavljanja. Potencijalna plodnost definira se kao broj izmriještenih jajašaca, a stvarna plodnost se funkcionalno definira kao broj oplodjenih i živih jajašaca u trenutku brojanja. Jajašca treba prebrojati što prije nakon prikupljanja.
47. Potencijalna plodnost ponavljanja svakodnevno se evidentira kao broj jajašaca po uzgojnom paru koji se analizira preporučenim statističkim postupcima upotrebom srednjih vrijednosti ponavljanja. Plodnost ponavljanja zbroj je plodnih jajašaca koje proizvede uzgojni par podijeljen zbrojem jajašaca koje proizvede taj uzgojni par. Statistički se plodnost analizira kao omjer po ponavljanju. Valjivost ponavljanja broj je mladunaca podijeljen brojem postavljenih embrija (obično 20). Statistički se valjivost analizira kao omjer po ponavljanju.

Uzorkovanje odraslih riba i ocjena krajnjih točaka

Uzorkovanje riba u uzgojnim parovima

48. Nakon 17. ispitnog tjedna (tj. nakon što uspješno započne generacija F2) odrasle ribe iz generacije F1 humano se usmrćuju i ocjenjuju se različite krajnje točke (vidjeti tablice 1. i

2.). Podrepna peraja slika se radi ocjene papila na podrepnoj peraji (vidjeti Dodatak 8.) i/ili se uklanja rep, neposredno ventralno od kloake, te se on fiksira za kasnije brojenje papila. Po želji se tada može uzorkovati i pohraniti dio repne peraje radi provjere genetskog spola (*dmy*). Po potrebi se može uzeti uzorak tkiva kako bi se ponovila analiza gena *dmy* radi potvrde genetskog spola određene ribe. Zatim se otvara trbušna šupljina kako bi se omogućila perfuzija odgovarajućim fiksativima (npr. Davidsonov fiksativ) prije uranjanja cijelog tijela u fiksativ. Međutim, ako se prije fiksiranja provodi odgovarajući korak permeabilizacije, ne treba se otvarati trbušna šupljina.

Histopatologija

49. Svaka se riba histološki ocjenjuje kako bi se utvrdila patologija u gonadnom tkivu (30.; 29.). Kako je navedeno u stavku 33., sustavne ili druge toksičnosti mogu utjecati na ostale mehanističke krajnje točke koje se ocjenjuju u ovoj analizi (tj. VTG, SSC-i i određeni histopatološki učinci na gonade). Stoga se mogu posebno ocijeniti i histopatološki pregledi jetre i bubrega kako bi se pomoglo u boljem razumijevanju mogućih odgovora na mehanističkim krajnjim točkama. Međutim, ako se ne provode te detaljne ocjene, ipak treba evidentirati velike abnormalnosti koje su slučajno uočene tijekom histopatološke ocjene i treba izvijestiti o njima. Može se razmotriti „silazno očitavanje” od ispitne skupine s najvećim učinkom (u usporedbi s kontrolom) do tretiranja kod kojeg nema učinka, ali preporučuje se proučavanje smjernica za histopatologiju (29.). Uzorci se obično obrađuju/seciraju, nakon čega ih tumači patolog. Ako se upotrebljava pristup „silaznog očitavanja”, napominje se da se u postupku RSCABS (engl. *Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices*) primjenjuje očekivanje da će se s povećanjem razina doza povećati i biološki učinak (patologija). Stoga će se izgubiti statistička snaga ako se promatra samo jedna visoka doza bez srednjih doza. Taj pristup može biti prihvatljiv ako nije potrebna statistička analiza kako bi se utvrdilo da visoka doza nema učinak. Iz te se ocjene izvodi i fenotip gonada.

Ostala opažanja

50. Ispitivanjem MEOGRT dobivaju se podaci koji se mogu upotrijebiti (npr. u pristupu snage dokaza) za istovremeno ocjenjivanje barem dvaju putova nastanka ishoda (AOP-i) koji završavaju narušavanjem reprodukcije: (a) putova kojima posreduje endokrini sustav koji uključuju disrupciju endokrine osi hipotalamus-hipofiza-gonade (HPG, engl. *hypothalamus-pituitary-gonadal endocrine axis*) i (b) putova koji uzrokuju smanjenje preživljavanja, rasta (dužina i masa) i reprodukcije putem toksičnosti kojom ne posreduje endokrini sustav. Krajnje točke koje se obično mjere u ispitivanjima kronične toksičnosti kao što su ispitivanje cijelog životnog ciklusa i ispitivanje u ranim životnim stadijima uključene su i u ovo ispitivanje i mogu se upotrebljavati za ocjenu opasnosti koju predstavljaju i načini djelovanja koji nisu posredovani endokrinim sustavom i putovi toksičnosti posredovani endokrinim sustavom. Tijekom ispitivanja svakodnevno treba

opažati ponašanje i evidentirati svako neuobičajeno ponašanje. Osim toga, treba evidentirati smrtnost i izračunati preživljavanje do izdvajanja riba (šesti/sedmi ispitni tjedan), preživljavanje od izdvajanja do uzorkovanja riba koje nisu odrasle (od devetog do desetog tjedna nakon oplodnje) i preživljavanje od uspostave parova do uzorkovanja odraslih riba.

Tablica 1.: Pregled krajnjih točaka u ispitivanju MEOGRT*

Faza života	Krajnja točka	Generacija
Embrij (2 tjedna nakon oplodnje)	Valjenje (% i vrijeme potrebno za valjenje)	F1, F2
Juvenilna riba (4 tjedna nakon oplodnje)	Preživljavanje	F1
Riba koja nije odrasla (9 ili 10 tjedana nakon oplodnje)	Preživljavanje	F1
	Rast (dužina i masa)	
	Vitelogenin (mRNA ili protein)	
	Sekundarna spolna obilježja (papile na podrepnoj peraji)	
	Omjer spolova prema vanjskim obilježjima	
	Vrijeme do 1. mrijesta	
Odrasla riba (12–14 tjedana nakon oplodnje)	Razmnožavanje (potencijalna i stvarna plodnost)	F0, F1
Odrasla riba (15 tjedana nakon oplodnje)	Preživljavanje	F1
	Rast (dužina i masa)	
	Sekundarna spolna obilježja (papile na podrepnoj peraji)	
	Histopatologija (gonada, jetra, bubreg)	

* Ove krajnje točke treba statistički analizirati.

VREMENSKI OKVIR

51. Vremenski okvir za ispitivanje MEOGRT prikazan u tablici 2. prikazuje ispitivanje. Ispitivanje MEOGRT uključuje četiri tjedna izlaganja odraslih riba generacije F0 i 15 tjedana izlaganja generacije F1 te razdoblje izlaganja za drugu generaciju (F2), do valjenja (dva tjedna nakon oplodnje). Aktivnosti tijekom ispitivanja MEOGRT sažete su u Dodatku 9.

Tablica 2.: Izlaganje i vremenski okvir za mjerenje krajnjih točaka u ispitivanju MEOGRT

Izlaganje i vremenski okvir krajnjih točaka u ispitivanju MEOGRT																				
F0	1.	2.	3.	4.																
F1				1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.		
F2																	1.	2.		
Ispitni tjedan	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	
Oznaka životne faze					Embrij				Ličinke				Juvenilna riba				Riba koja nije odrasla		Odrasla riba	
Krajnje točke																				
Potencijalna plodnost	F ₀														F ₁					- Plan izvođenja pokusa ima sedam skupina ponavljanja - pet za tretiranja ispitivanom kemikalijom - dva za kontrolna tretiranja (četiri ako se upotrebljava otapalo) - Plan unutar skupine 12 ponavljanja za reprodukciju, patologiju odraslih riba i SSC (od desetog do 18. tjedna) - šest ponavljanja za valjenje, preživljavanje, Vtg te SSC i rast riba koje nisu odrasle (od prvog do devetog tjedna) SSC: sekundarna spolna obilježja; t.: tjedni; Vtg: vitelogenin
Plodnost	F ₀														F ₁					
Valjenje					F ₁													F ₂		
Preživljavanje						F ₁						F ₁						F ₁		
Rast				F ₀								F ₁						F ₁		
Vitelogenin												F ₁								
Sekundarni spol												F ₁						F ₁		
Histopatologija																		F ₁		
Ispitni tjedan	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	

DOSTAVLJANJE PODATAKA**Statistička analiza**

52. Budući da se genotipski spol utvrđuje za sve ispitne ribe, podatke treba analizirati posebno za svaki genotipski spol (tj. mužjaci XY i ženke XX). Ako se to ne učini, znatno će se smanjiti statistička snaga bilo kakve analize. Statističke analize podataka trebale bi po mogućnosti poštovati postupke opisane u OECD-ovu dokumentu Sadašnji pristupi u statističkoj analizi podataka o ekotoksičnosti: Smjernice za primjenu (32.). Dodatne smjernice za statističku analizu navedene su u Dodatku 10.

53. Plan ispitivanja i odabir statističkog testa trebaju omogućiti odgovarajuću snagu za otkrivanje promjena od biološke važnosti na krajnjim točkama na kojima se izvješćuje o NOEC-u (32.). Izvješćivanje o koncentracijama s relevantnim učinkom i parametrima može ovisiti o zakonodavnom okviru. Treba utvrditi postotak promjene na svakoj krajnjoj točki koju je važno otkriti ili procijeniti. Plan ispitivanja trebao bi biti osmišljen tako da se

to omogućiti. Nije vjerojatno da će se isti postotak promjene odnositi na sve krajnje točke ni da će se moći osmisliti izvediv pokus koji bi zadovoljio te kriterije za sve krajnje točke i stoga je važno usredotočiti se na krajnje točke koje su bitne za pokus pri odgovarajućem planiranju pokusa. U Dodatku 10. dostupni su statistički dijagram toka i smjernice koji mogu pomoći u obradi podataka i odabiru najprimjerenijeg statističkog testa ili modela za upotrebu. Mogu se primjenjivati i drugi statistički pristupi uz uvjet da su znanstveno opravdani.

54. Bit će potrebna analiza varijacija u svakom skupu ponovljenih uzoraka primjenom analize varijance ili tablica kontingencije te primjena odgovarajućih metoda statističke analize na temelju te analize. Za višestruku usporedbu rezultata pojedinačnih koncentracija i kontrola preporučuje se postupak postupnog snižavanja za kontinuirane odgovore (npr. Jonckheere-Terpstraov test). Ako podaci nisu u skladu s monotoničnim odgovorom na koncentraciju, treba upotrijebiti Dunnettov ili Dunnov test (po potrebi nakon primjerene transformacije podataka).
55. Za potencijalnu plodnost jajašca se broje svakodnevno, ali se mogu analizirati kao ukupan broj jajašaca ili kao ponovljeno mjerenje. U Dodatku 10. navode se pojedinosti o načinu analiziranja te krajnje točke. Za histopatološke podatke u obliku ocjene ozbiljnosti razvijen je novi statistički test – RSCABS (engl. *Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices*) (33.).
56. Treba izvijestiti o svim krajnjim točkama uočenima u tretiranjima kemikalijom koja su znatno različita od odgovarajućih kontrola.

Razmatranja o analizi podataka

Upotreba kompromitirajućih razina obrade

57. Nekoliko čimbenika uzima se u obzir kako bi se utvrdilo pokazuje li ponavljanje ili cjelokupna obrada očitu toksičnost i je li potrebno ukloniti ih iz analize. Očita toksičnost definira se kao više od četiri smrtna slučaja u bilo kojem ponavljanju od trećeg do devetog tjedna nakon oplodnje koji se ne mogu objasniti tehničkom pogreškom. Ostali znakovi očite toksičnosti uključuju krvarenje, neobična ponašanja, neuobičajene načine plivanja, anoreksiju i bilo koje druge kliničke znakove bolesti. Za subletalne znakove toksičnosti mogu biti potrebne kvalitativne procjene i uvijek ih je potrebno obaviti u odnosu na kontrolnu skupinu s vodom za razrjeđivanje (samo čista voda). Ako je kod tretiranja s najvišim koncentracijama prisutna očita toksičnost, preporučuje se da se ta tretiranja isključe iz analize.

Kontrole s otapalom

58. Uporabu otapala potrebno je uzeti u obzir samo kao krajnje sredstvo, kada se razmotre sve druge opcije prijenosa kemikalije. Ako se upotrebljava otapalo, tada je potrebno paralelno provesti kontrolu s vodom za razrjeđivanje. Na kraju ispitivanja treba procijeniti moguće učinke otapala. To se radi statističkom usporedbom kontrolne skupine s otapalom i kontrolne skupine s vodom za razrjeđivanje. Najrelevantnije krajnje točke koje treba razmotriti u toj analizi determinante su rasta (masa) jer na njih mogu utjecati opće toksičnosti. Ako se na tim krajnjim točkama otkriju znatne razlike između kontrolnih skupina s vodom za razrjeđivanje i s otapalom, treba primijeniti stručnu prosudbu kako bi se utvrdilo je li narušena valjanost ispitivanja. Ako se dvije kontrole razlikuju, tretiranja izložena kemikaliji treba usporediti s kontrolom s otapalom osim ako je poznato da se prednost daje kontroli s vodom za razrjeđivanje. Ako nema statistički značajne razlike između dviju kontrolnih skupina, preporučuje se da se tretiranja izložena ispitivanoj kemikaliji usporede s objedinjenim kontrolama (kontrolne skupine s otapalom i s vodom za razrjeđivanje), osim ako je poznato da se prednost daje samo kontrolnoj skupini s vodom za razrjeđivanje ili s otapalom.

Izvešće o ispitivanju

59. Izvešće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija: fizikalno stanje i po potrebi fizikalno-kemijska svojstva,

- podaci za identifikaciju kemikalije.

Tvar s jednim sastojkom:

- fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd. (uključujući udio organskog ugljika, prema potrebi).

Tvar s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

- opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka.

Ispitne vrste:

- znanstveni naziv, soj ako je dostupno, podrijetlo, metoda sakupljanja oplodjenih jajašaca i kasnije postupanje.

Ispitni uvjeti:

- fotoperiodi,

- plan ispitivanja (npr. veličina komore, materijal i volumen vode, broj ispitnih komora i ponavljanja, broj mladunaca po ponavljanju),
- način pripreme glavnih otopina i učestalost obnavljanja (ako se koristi sredstvo za otapanje, trebalo bi ga navesti zajedno s koncentracijom),
- metoda doziranja ispitivane kemikalije (npr. crpkama, sustavima za razrjeđivanje),
- iskoristivost metode i nazivnih ispitnih koncentracija, granica kvantifikacije, srednje izmjerene vrijednosti i njihove standardne devijacije u ispitnim posudama te metoda kojom su one dobivene i dokazi da se izmjerene vrijednosti odnose na koncentracije ispitivane kemikalije u stvarnoj otopini,
- svojstva vode za razrjeđivanje: pH, tvrdoća, temperatura, koncentracija otopljenog kisika, rezidualni klor (ako se mjeri), ukupni organski ugljik (ako se mjeri), suspendirana kruta tvar (ako se mjeri), salinitet ispitnog medija (ako se mjeri) i ostala provedena mjerenja,
- nazivne ispitne koncentracije, srednje izmjerene vrijednosti i njihove standardne devijacije,
- kakvoća vode u ispitnim posudama, pH, temperatura (dnevno) i koncentracija otopljenog kisika,
- detaljne informacije o hranjenju (npr. vrsta hrane, izvor, količina hrane i učestalost hranjenja).

Rezultati:

- dokazi o usklađenosti kontrola s općim validacijskim kriterijima,
- sljedeći podaci za kontrolu (i kontrolu s otapalom ako se koristi) i ispitne skupine: valjenje (valjivost i vrijeme potrebno za valjenje) za generacije F1 i F2, preživljavanje nakon valjenja za F1, rast (dužina i tjelesna masa) za F1, genotipski spol i spolna diferencijacija (npr. sekundarna spolna obilježja na temelju papila na podreпноj peraji i gonadna histologija) za F1, fenotipski spol za F1, sekundarna spolna obilježja (papile na podreпноj peraji) za F1, vtg mRNA (ili protein VTG) za F1, histopatološka ocjena (gonade, jetra i bubreg) za F1 i reprodukcija (potencijalna i stvarna plodnost) za F0, F1 (vidjeti tablice 1. i 2.),
- pristup za statističku analizu (regresijska analiza ili analiza varijance) i obrada podataka (primijenjeni statistički testovi ili modeli),
- najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC) za svaki ocijenjeni odgovor,
- najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC) za svaki ocijenjeni odgovor (pri $p = 0,05$); EC_x za svaki ocijenjeni odgovor, ako je primjenjivo, te intervali pouzdanosti (npr. 90 % ili 95 %) i graf prilagođenog modela primijenjenog za izračun vrijednosti EC_x ,

nagib krivulje koncentracija – odgovor, formula regresijskog modela, procijenjeni parametri modela i njihove standardne pogreške,

- sva odstupanja od ove ispitne metode i odstupanja od kriterija prihvatljivosti te razmatranja potencijalnih posljedica na ishod ispitivanja.

60. Za rezultate mjerenja krajnjih točaka treba prikazati srednje vrijednosti i njihove standardne devijacije (ako je moguće, i na temelju ponavljanja i koncentracija).

LITERATURA

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

- 17 β -Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. *Aquatic Toxicology* 79: 288.–295.
10. Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 β -Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. *Aquatic Toxicology* 77: 78.–86.
 11. Nakamura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T and Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Journal of Applied Toxicology* 35:11.–23.
 12. U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Dostupno na: <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html>.
 13. Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P and McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. *Chemosphere* 86: 593.–599.
 14. OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 23.), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
 15. Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. *Aquatic Toxicology* 76: 69.–92.
 16. Denny JS, Spehar RL, Mead KE and Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.
 17. Koger CS, Teh SJ and Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Biology of Reproduction* 61: 1287.–1293.
 18. Kinoshita M, Murata K, Naruse K and Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley-Blackwell.
 19. Gormley K and Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 330.–338.

20. Poglavlje C.15. ovog Priloga, Test kratkotrajne toksičnosti na ribama u stadiju embrija i mlađi sa žumanjčanom vrećicom.
21. Poglavlje C.37. ovog Priloga, 21-dnevni test na ribama: kratkoročni test probira na estrogensku i androgensku aktivnost i inhibiciju aromataze.
22. Poglavlje C.41. ovog Priloga, Ispitivanje spolnog razvoja riba.
23. Poglavlje C.48. ovog Priloga, Kratkoročni reprodukcijski test na ribama.
24. Poglavlje C.47. ovog Priloga, Ispitivanje toksičnosti na ribama u ranim životnim stadijima.
25. Poglavlje C.49. ovog Priloga, Ispitivanje akutne toksičnosti na ribljim embrijima.
26. Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. *Chemosphere* 92: 1067.–1076.
27. Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50: 301.–308.
28. OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
29. Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Scharl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. *Genetics* 163: 245.–251.
30. Shinomiya, A, Otake H, Togashi K, Hamaguchi S and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, *Zoological Science* 21: 613.–619.
31. OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (prilozi ovoj publikaciji postoje kao zasebni dokument), OECD Publishing, Pariz.
32. Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1108.–1116.

Dodatak 1.**DEFINICIJE**

Kemikalija: tvar ili smjesa.

ELISA: imunoenzimski test (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Potencijalna plodnost = broj jajašaca.

Stvarna plodnost = broj živih jajašaca/potencijalna plodnost.

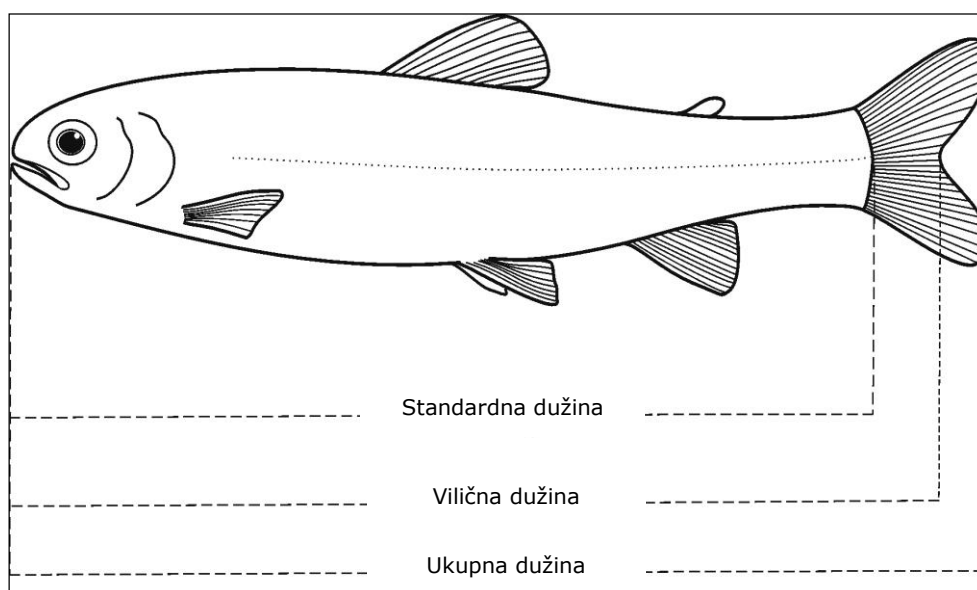
Vilična dužina (FL) odnosi se na dužinu od vrha usta do kraja srednjih šipčica repne peraje i primjenjuje se na ribe kod kojih je teško odrediti gdje završava kralježnica (www.fishbase.org).

Valjivost = mladunci/broj embrija kojima se inkubator napuni.

IACUC: institucionalni odbor za dobrobit i upotrebu životinja (engl. *Institutional Animal Care and Use Committee*).

Standardna dužina (SL) odnosi se na dužinu ribe izmjerenu od vrha usta do stražnjeg kraja zadnjeg kralješka ili do stražnjeg kraja srednjeg bočnog dijela hipuralne ploče. Jednostavnije rečeno, pri mjerenju se isključuje dužina repne peraje (www.fishbase.org).

Ukupna dužina (TL) odnosi se na dužinu od vrha usta do vrha dužeg režnja repne peraje, obično mjereno na režnjevima stisnutima duž središnje linije. Mjeri se u ravnoj liniji, a ne uz krivulju tijela (www.fishbase.org).



Slika 1.: opis različitih dužina koje se primjenjuju.

ECx: (koncentracija s x-postotnim učinkom) koncentracija je koja u određenom razdoblju izlaganja izaziva x-postotni učinak na ispitne organizme u usporedbi s kontrolom. Na primjer, EC50 je koncentracija za koju se procjenjuje da stvara učinak na krajnju točku ispitivanja u 50 % izložene populacije tijekom određenog razdoblja izlaganja.

Protočno ispitivanje je ispitivanje sa stalnim protokom ispitne otopine kroz ispitni sustav za vrijeme izlaganja.

Os HPG: os hipotalamus-hipofiza-gonade.

IUPAC: Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju.

Masa riba u odnosu na prostor: mokra masa ribe po volumenu vode.

Najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC) najniža je ispitana koncentracija ispitivane kemikalije kod koje je uočen statistički značajan učinak kemikalije (pri $p < 0,05$) u usporedbi s kontrolom. Međutim, sve ispitne koncentracije iznad LOEC-a trebale bi imati jednak ili veći štetan učinak od onoga koji je uočen pri LOEC-u. Ako se ne mogu ispuniti ta dva uvjeta, trebalo bi navesti detaljno objašnjenje za odabir LOEC-a (a time i NOEC-a). Smjernice se nalaze u dodacima 5. i 6.

Medijan smrtonosne koncentracije (LC50): koncentracija ispitivane kemikalije koja je procijenjena kao smrtonosna za 50 % ispitnih organizama za vrijeme ispitivanja.

Najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC) ispitna je koncentracija neposredno ispod LOEC-a koja unutar navedenog razdoblja izlaganja nema statistički značajan učinak ($p < 0,05$) u usporedbi s kontrolom.

SMILES: *Simplified Molecular Input Line Entry Specification.*

Broj riba u odnosu na prostor: broj riba po volumenu vode.

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

UVCB: tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi ili biološki materijali.

VTG: vitelogenin je fosfolipoglikoproteinski prekursor proteina žumanjka koji je u pravilu prisutan u spolno aktivnih ženki svih vrsta koje liježu jaja.

WPF: tjedana nakon oplodnje.

Dodatak 2.**NEKA KEMIJSKA SVOJSTVA PRIHVATLJIVE VODE ZA RAZRJEDIVANJE**

Tvar	Granična koncentracija
Lebdeće čestice	5 mg/l
Ukupni organski ugljik	2 mg/l
Neionizirani amonijak	1 µg/l
Rezidualni klor	10 µg/l
Ukupni organofosforni pesticidi	50 ng/l
Ukupni organoklorni pesticidi plus poliklorirani bifenili	50 ng/l
Ukupni organski klor	25 ng/l
Aluminij	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Krom	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Bakar	1 µg/l
Željezo	1 µg/l
Olovo	1 µg/l
Nikal	1 µg/l
Cink	1 µg/l
Kadmij	100 ng/l
Živa	100 ng/l
Srebro	100 ng/l

Dodatak 3.**ISPITNI UVJETI ZA MEOGRT**

- | | |
|--|--|
| 1. Preporučena vrsta | Japanska medaka (<i>Oryzias latipes</i>) |
| 2. Vrsta ispitivanja | Kontinuirano protočno |
| 3. Temperatura vode | Nominalna ispitna temperatura iznosi 25 °C. Srednja temperatura tijekom cijelog ispitivanja u svakom spremniku iznosi od 24 do 26 °C. |
| 4. Kvaliteta osvjetljenja | Fluorescentne žarulje (široki spektar i ~ 150 lumena/m ²) (~ 150 lx). |
| | 16 sati svjetla, osam sati tame |
| 6. Masa riba u odnosu na prostor | F0: dvije odrasle ribe po ponavljanju; F1: počinje se s najviše 20 jajašaca (embrija) po ponavljanju, smanjuje se na 12 embrija po ponavljanju pri valjenju i zatim dvije odrasle ribe (uzgojni par XX-XY) od devetog do desetog tjedna nakon oplodnje za reproduktivnu fazu |
| 7. Najmanji iskoristivi volumen ispitne komore | 1,8 l (npr. ispitna komora veličine: 18 x 9 x 15 cm) |
| 8. Izmjene volumena ispitnih otopina | Najmanje pet obnavljanja volumena dnevno do najviše 16 obnavljanja volumena dnevno (ili protok od 20 ml/min) |
| 9. Starost ispitnih organizama na početku | F0: > 12 tjedana nakon oplodnje, ali ne preporučuje se više od 16 tjedana nakon oplodnje |
| 10. Broj organizama po ponavljanju | F0: dvije ribe (par mužjaka i ženke); F1: najviše 20 riba (jajašaca) po ponavljanju (nastalih iz uzgojnih parova generacija F0 i F1). |
| 11. Broj tretiranja | Pet tretiranja ispitivanom kemikalijom i odgovarajuće kontrole |
| 12. Broj ponavljanja po tretiranju | Najmanje šest ponavljanja po tretiranju za ispitivanu kemikaliju i najmanje 12 ponavljanja za kontrolu i za kontrolu s otapalom, ako se upotrebljava (broj ponavljanja udvostručuje se u reproduktivnoj fazi generacije F1) |
| 13. Broj organizama po ispitivanju | Najmanje 84 ribe u generaciji F0 i 504 u generaciji F1 (ako se koristi kontrola s otapalom, 108 riba u generaciji F0 i 648 riba u generaciji F1). Jedinica koja se broji jest posteleutero-embrij. |
| 14. Režim hranjenja | Ribe se hrane <i>ad libitum</i> račićima <i>Artemia</i> spp. (ličinke stare 24 sata), koji se po potrebi mogu dopuniti komercijalno dostupnom hranom u listićima (primjer režima hranjenja kojim se osiguravaju odgovarajući rast i razvoj kojim se podupire pouzdana reprodukcija nalazi se u |

	Dodatku 6.).
15. Dozračivanje	Bez dozračivanja, osim ako se koncentracija otopljenog kisika približi vrijednosti < 60 % vrijednosti zasićenosti kisikom
16. Voda za razrjeđivanje	Čista površinska, izvorska ili rekonstituirana voda ili voda iz slavine iz koje je uklonjen klor.
17. Razdoblje izlaganja	U prvom redu 19 tjedana (od generacije F0 do valjenja generacije F2)
18. Biološke krajnje točke (primarne)	Valjivost (F1 i F2); preživljavanje (F1, od valjenja do 4. tjedna nakon oplodnje (kraj razdoblja ličinki/početak razdoblja juvenilnih riba), od 4. do 9. (ili 10.) tjedna nakon oplodnje (od početka razdoblja juvenilnih riba do riba koje nisu odrasle) i od 9. do 15. tjedna nakon oplodnje (od razdoblja riba koje nisu odrasle do usmrćivanja odraslih riba)); rast (F1, dužina i masa 9. i 15. tjedna nakon oplodnje); sekundarna spolna obilježja (F1, papile na podreпноj peraji 9. i 15. tjedna nakon oplodnje); vitelogenin (F1, <i>vtg</i> mRNA ili protein VTG 15. tjedna nakon oplodnje); fenotipski spol (F1, gonadnom histologijom 15. tjedna nakon oplodnje); reprodukcija (F0 i F1, potencijalna i stvarna plodnost za 21 dan); vrijeme mriješćenja (F1) i histopatologija (F1, gonade, jetra i bubreg 15. tjedna nakon oplodnje)
19. Kriteriji valjanosti ispitivanja	Otopljeni kisik trebao bi iznositi ≥ 60 % vrijednosti zasićenosti kisikom; srednja temperatura vode od 24 do 26 °C tijekom cijelog ispitivanja; uspješna reprodukcija ≥ 65 % ženki u kontrolama; srednja dnevna potencijalna plodnost ≥ 20 jajašaca u kontrolama; valjivost ≥ 80 % (prosjek) u kontrolama (i u generaciji F1 i F2); preživljavanje nakon valjenja do 3. tjedna nakon oplodnje ≥ 80 % (prosjek) i od 3. tjedna nakon oplodnje do usmrćivanja za generaciju ≥ 90 % (prosjek) u kontrolama (F1), koncentracije ispitivane kemikalije u otopini trebalo bi uspješno održavati u rasponu od ± 20 % srednjih izmjerenih vrijednosti.

Dodatak 4.

SMJERNICE ZA TIPIČNE KONTROLNE VRIJEDNOSTI

Treba napomenuti da se te kontrolne vrijednosti temelje na ograničenom broju validacijskih studija i podliježu izmjeni u kontekstu stjecanja novog iskustva.

Rast

Masa i dužina mjere se kod svih riba koje se uzorkuju devet (ili deset) i 15 tjedana nakon oplodnje. Ako se slijedi ovaj protokol, očekuje se da će se devetog tjedna nakon oplodnje dobiti mokra masa od 85 do 145 mg za mužjake i od 95 do 150 mg za ženke. Očekuje se da će se 15. tjedna nakon oplodnje dobiti masa od 250 do 330 mg za mužjake i od 280 do 350 mg za ženke. Iako su moguća znatna odstupanja od tih raspona za pojedinačne ribe, srednje kontrolne mase koje su znatno izvan tih raspona, a osobito manje, ukazuju na poteškoće s hranjenjem, kontrolom temperature, kakvoćom vode, bolešću ili bilo kojom kombinacijom tih čimbenika.

Valjenje

Uspješnost valjenja u kontrolama obično iznosi približno 90 %, ali nisu neuobičajene ni niže vrijednosti od približno 80 %. Uspješnost valjenja manja od 75 % može ukazivati na nedovoljno protresanje jajašaca koja se razvijaju ili nedovoljan oprez pri postupanju s jajašcima, na primjer nepravovremeno uklanjanje mrtvih jajašaca koje je dovelo do gljivične infekcije.

Preživljavanje

Stope preživljavanja do tri tjedna nakon oplodnje od valjenja i nakon tri tjedna nakon oplodnje obično iznose 90 % ili više za kontrole, ali ni niže stope preživljavanja od približno 80 % u ranim fazama života u kontrolama nisu razlog za zabrinutost. Stope preživljavanja u kontrolama manje od 80 % razlog su za zabrinutost i mogu ukazivati na nedovoljno čišćenje akvarija koje je dovelo do gubitka ličinki zbog bolesti ili gušenja do kojeg je došlo zbog niskih razina otopljenog kisika. Smrtnost može biti i posljedica ozljeda tijekom čišćenja spremnika i gubitka ličinki zbog odvodnog sustava spremnika.

Gen za vitelogenin

Iako se apsolutne razine ekspresije gena za *vitelogenin* (*vtg*) izražene kao kopije/ng ukupnog mRNA mogu znatno razlikovati među laboratorijima zbog postupaka ili instrumenata koji se koriste, omjer za *vtg* trebao bi biti približno 200 puta veći kod kontrolnih ženki nego kod kontrolnih mužjaka. Nije neuobičajeno da se taj omjer kreće čak i u rasponu od 1 000 do 2 000, ali omjeri manji od 200 sumnjivi su i mogu ukazivati na poteškoće s kontaminacijom uzorka ili poteškoće s korištenim postupcima i/ili reagensima.

Sekundarna spolna obilježja

Kod mužjaka normalni raspon sekundarnih spolnih obilježja, koja se definiraju kao ukupan broj segmenata u šipčicama peraje papila na podrepnoj peraji, iznosi od 40 do 80 segmenata od devetog do desetog tjedna nakon oplodnje. Do 15. tjedna nakon oplodnje raspon za kontrolne mužjake treba biti od približno 80 do 120, a 0 za kontrolne ženke. Iz neobjašnjenih razloga u rijetkim slučajevima neki mužjaci ne razviju papile do 9. tjedna nakon oplodnje, ali budući da svi kontrolni mužjaci razvijaju papile do 15. tjedna nakon oplodnje, uzrok je vjerojatno zakašnjeli razvoj. Prisutnost papila kod kontrolnih ženki ukazuje na prisutnost mužjaka XX u populaciji.

Mužjaci XX

Čini se da je normalna osnovna učestalost pojave mužjaka XX u kulturi približno 4 % ili manje na temperaturi od 25 °C, a učestalost se povećava s povećanjem temperature. Treba poduzeti korake za smanjenje udjela mužjaka XX u populaciji. Budući da se čini da učestalost pojave mužjaka XX ima genetsku komponentu te je stoga nasljedna, praćenje matične kulture i osiguravanje da se mužjaci XX ne upotrebljavaju za razmnožavanje matične kulture učinkovit je način smanjenja učestalosti pojave mužjaka XX u populaciji.

Aktivnost mriješćenja

Aktivnost mriješćenja u kontrolnim ponavljanjima treba svakodnevno pratiti prije ocjenjivanja potencijalne plodnosti. Kontrolni parovi mogu se kvalitativno ocijeniti kako bi se dokazala aktivnost mriješćenja. Većina kontrolnih parova trebala bi se mrijestiti od 12. do 14. tjedna nakon oplodnje. Ako se do tog trenutka mrijesti malen broj parova, to ukazuje na moguće poteškoće sa zdravljem, zrelošću ili dobrobiti riba.

Potencijalna plodnost

Zdrave medake koje se dobro hrane trebale bi se svakodnevno mrijestiti od 12. do 14. tjedna nakon oplodnje, pri čemu bi trebale proizvoditi od 15 do 50 jajašaca dnevno. Proizvodnja jajašaca za 16 parova od 24 preporučena kontrolna uzgojna para (> 65 %) treba biti veća od 20 jajašaca po paru dnevno i može iznositi čak i 40 jajašaca dnevno. Manji broj jajašaca može ukazivati na nezrele, pothranjene ili nezdrave parove koji se mrijeste.

Plodnost

Postotak plodnih jajašaca za kontrolne parove koji se mrijeste obično je u rasponu od 90 %, a nisu neuobičajene ni veće vrijednosti. Stope plodnosti manje od 80 % za kontrolna jajašca sumnjive su i mogu ukazivati na jedinke koje nisu zdrave ili na uvjete uzgoja kulture koji nisu idealni.

Dodatak 5.**PRIMJER REŽIMA HRANJENJA**

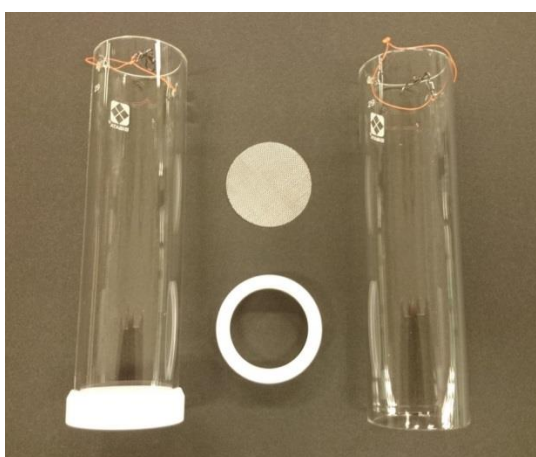
Primjer režima hranjenja kojim se osiguravaju primjereni rast i razvoj za potporu pouzdanoj reprodukciji prikazan je u Tablici 1. Odstupanja od tog režima hranjenja mogu biti prihvatljiva, ali preporučuje se da ih se ispita kako bi se potvrdilo da dolazi do prihvatljivog rasta i reprodukcije. Kako bi se slijedio predloženi režim hranjenja, prije početka ispitivanja treba utvrditi suhu masu račića *Artemia* po volumenu tekuće kaše račića. To se može napraviti vaganjem utvrđenog volumena tekuće kaše račića koja se sušila 24 sata na 60 °C na unaprijed odvaganim pliticama. Kako bi se uzela u obzir masa soli u tekućoj kaši, identičan volumen iste otopine soli koja se upotrebljava u tekućoj kaši treba sušiti, vagati i oduzeti od mase osušene kaše račića. Umjesto toga račići se mogu filtrirati i isprati destiliranom vodom prije sušenja, čime se uklanja potreba za mjerenjem mase same soli. Te se informacije upotrebljavaju za pretvaranje informacija iz tablice za suhu masu račića *Artemia* u volumen tekuće kaše račića koji se daje ribama. Osim toga, preporučuje se da se alikvoti tekuće kaše račića važu svakog tjedna kako bi se potvrdila točna suha masa račića koji se daju kao hrana.

Tablica 1.: Primjer režima hranjenja

Vrijeme (nakon valjenja)	Račići Artemia (mg suhe mase po ribi dnevno)
Dan 1.	0,5
Dan 2.	0,5
Dan 3.	0,6
Dan 4.	0,7
Dan 5.	0,8
Dan 6.	1,0
Dan 7.	1,3
Dan 8.	1,7
Dan 9.	2,2
Dan 10.	2,8
Dan 11.	3,5
Dan 12.	4,2
Dan 13.	4,5
Dan 14.	4,8
Dan 15.	5,2
Dani 16.–21.	5,6
Četvrti tjedan	7,7
Peti tjedan	9,0
Šesti tjedan	11,0
Sedmi tjedan	13,5
Osmi tjedan – usmrćivanje	22,5

Dodatak 6.**PRIMJER KOMORE ZA INKUBACIJU JAJAŠACA****Primjer A**

Ovaj se inkubator sastoji od prerezane staklene cijevi centrifuge povezane rukavom od nehrđajućeg čelika, koju drži navojni čep centrifuge. Kroz čep viri malena cijev od stakla ili nehrđajućeg čelika koja je postavljena u blizini zaobljenog dna; ona dovodi mjehuriće zraka kojima se suspendiraju jajašca i smanjuje prijenos saprofitnih gljivičnih infekcija među jajašcima uz istovremeno olakšavanje razmjene kemikalija između inkubatora i spremnika.

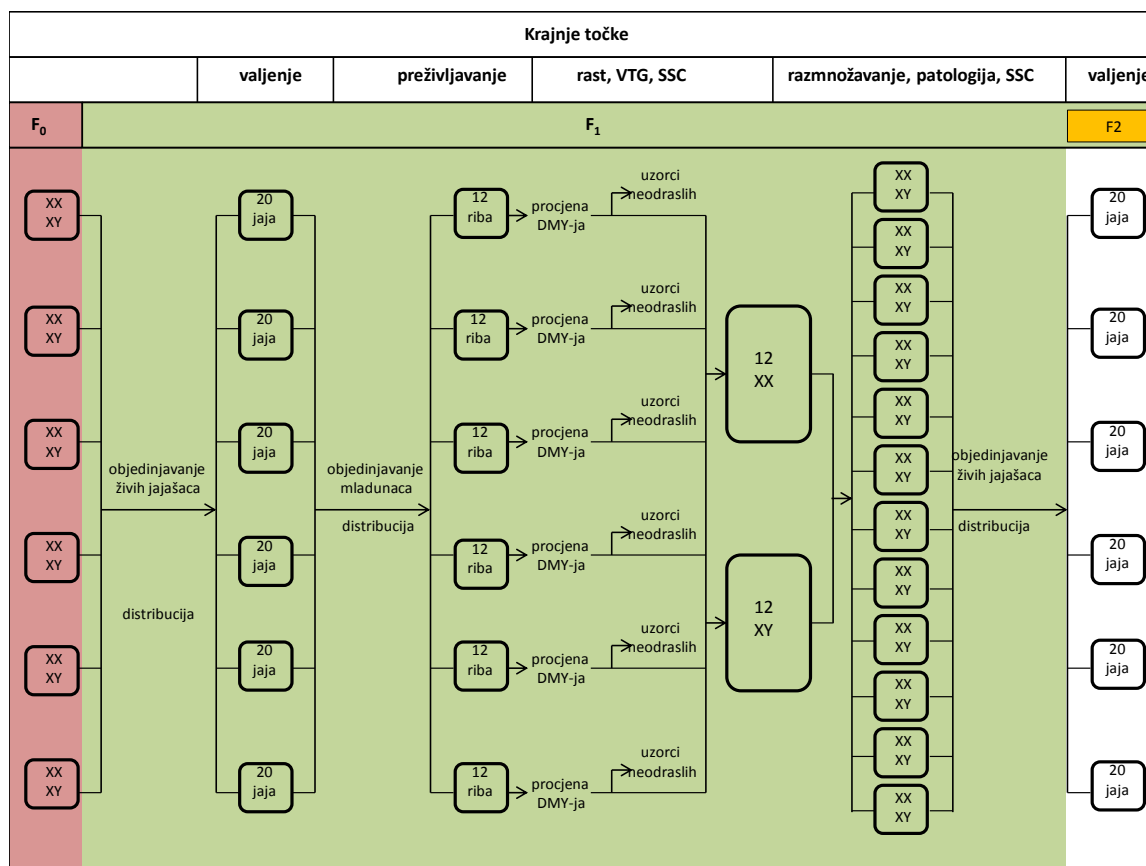
Primjer B



Ovaj inkubator sastoji se od staklene cilindrične osnove (promjer od 5 cm i visina od 10 cm) i nehrđajuće žičane mreže (0,25 ϕ i mrežice 32) koja se pričvršćuje na dno osnove PTFE prstenom. Inkubatori se mogu suspendirati na šipkama za podizanje u spremnicima i vertikalno protresati (amplituda od približno pet centimetara) u ciklusu (približno jednom svake četiri sekunde) koji je primjeren za jajašca medake.

Dodatak 7.**SHEMATSKI PRIKAZ ZA OBJEDINJAVANJE I POPUNJAVANJE PONAVLJANJA TIJEKOM CIJELE ISPITNE METODE MEOGRT**

Slika 1.: Objedinjavanje i ponovno popunjavanje ponavljanja tijekom cijelog ispitivanja MEOGRT. Slika predstavlja jedno tretiranje ili polovinu kontrole. Zbog objedinjavanja identitet ponavljanja nije kontinuiran tijekom cijelog ispitivanja. Napominje se da se izraz „jajašca” odnosi na živa, oplodena jajašca (ekvivalentno embrijima).

**Tretiranja i ponavljanje**

Za ispitnu metodu preporučuje se pet tretiranja ispitivanom kemikalijom upotrebom materijala tehničkog stupnja čistoće i negativne kontrole. Broj ponavljanja po tretiranju nije isti tijekom cijelog ispitivanja MEOGRT te je broj ponavljanja u kontrolnom tretiranju dvostruko veći od bilo kojeg pojedinačnog tretiranja ispitivanom kemikalijom. Kod generacije F₀ svako tretiranje ispitivanom kemikalijom ima šest ponavljanja, dok tretiranje negativnom kontrolom ima 12 ponavljanja. Ne preporučuje se upotreba otapala, a ako se ona upotrebljavaju, u izvješću o ispitivanju MEOGRT treba obrazložiti i zašto je otapalo potrebno i odabir specifičnog otapala. Isto tako, ako se upotrebljava otapalo, potrebne su dvije vrste kontrole: a) kontrola s otapalom i b) negativna kontrola. Te dvije kontrolne

skupine trebale bi se sastojati od cijelog skupa ponavljanja u svim točkama vremenskog okvira ispitivanja MEOGRT. Ta struktura ponavljanja ostaje ista tijekom cijelog razvoja organizama iz generacije F1 (i F2 do valjenja). Međutim, u fazi odraslih riba, kada se uspostave uzgojni parovi generacije F1, optimalno je da se broj ponavljanja parova za reprodukciju po tretiranju udvostruči; stoga u svakom tretiranju ispitivanom kemikalijom ima do 12 parova ponavljanja, a u kontrolnoj skupini 24 para ponavljanja (i po potrebi još 24 para ponavljanja u kontroli s otapalom). Utvrđivanje valjenja i embrija koje su izmrijestili parovi generacije F1 obavlja se prema istoj strukturi ponavljanja kao i za embrije koje su izmrijestili parovi generacije F0, što podrazumijeva prvo šest ponavljanja po tretiranju ispitivanom kemikalijom i 12 ponavljanja u kontrolnim skupinama.

Dodatak 8.

BROJANJE PAPILA NA PODREPNOJ PERAJI

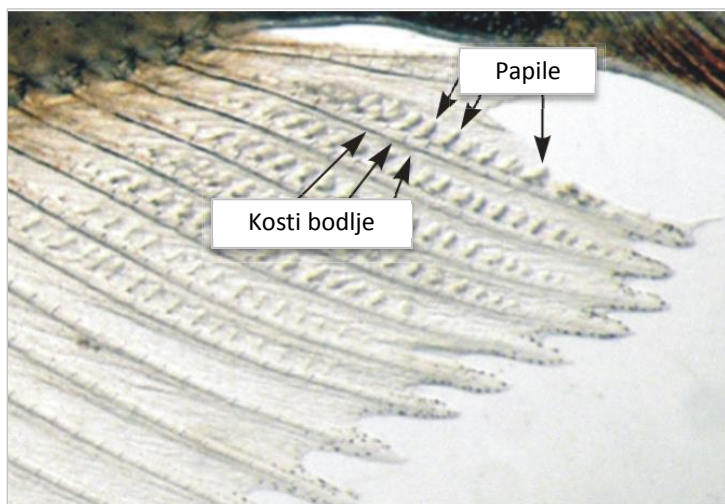
Glavni materijali i reagensi

- Disekcijski mikroskop (s pričvršćenom kamerom koja nije obvezna)
- Fiksativ (npr. Davidsonov fiksativ (ne preporučuje se Bouinov fiksativ)), ako se ne broji sa slike

Postupci

Nakon nekropsije treba slikati podrepnu peraju kako bi se omogućilo praktično brojanje papila na podrepnoj peraji. Iako je slikanje preporučena metoda, podrepna peraja može se fiksirati Davidsonovim fiksativom ili drugim odgovarajućim fiksativom približno jednu minutu. Važno je tijekom fiksacije držati podrepnu peraju ravnom kako bi se omogućilo lakše brojanje papila. Truplo s podrepnom perajom može se pohraniti u Davidsonovu fiksativu ili drugom odgovarajućem fiksativu do analize. Broji se broj kosti bodlje (vidjeti **sliku 1.**) s papilama koje vire na stražnjem dijelu kosti bodlje.

Slika 1.: Papile na podrepnoj peraji



Dodatak 9.

PODROBAN VREMENSKI OKVIR ISPITIVANJA MEOGRT

1.–3. ispitni tjedan (F0)

Ribe iz generacije F0 koje se mrijeste i koje su ispunile kriterije za odabir (vidjeti stavke od 16. do 20.) izlažu se tri tjedna kako bi se omogućilo izlaganje gameta i gonadnih tkiva u razvoju ispitivanoj kemikaliji. U svaki se spremnik s ponavljanjem stavlja jedan uzgojni par riba (uzgojni par ženke XX i mužjaka XY). Izmriješćena jajašca prikupljaju se, broje i procjenjuje se njihova plodnost tijekom 21 uzastopnog dana, počevši od prvog ispitnog dana.

4. ispitni tjedan (F0 i F1)

Preporučuje se da se oplođena i živa jajašca (embriji) prikupljaju istog dana; međutim, ako nema dovoljno embrija, mogu se prikupljati tijekom dva dana. Ako se prikupljaju dva dana, svi embriji u tretiranjima koji su prikupljeni prvog dana objedinjuju se s onima koji su prikupljeni drugog dana. Zatim se svi objedinjeni embriji za svako tretiranje nasumično raspodjeljuju u sve inkubatore ponavljanja tako da u svakom inkubatoru bude 20 embrija. Smrtnost oplođenih jajašaca (embrija) svakodnevno se provjerava i evidentira. Mrtva jajašca uklanjaju se iz inkubatora (na smrt oplođenih jajašaca može ukazivati, posebno u ranim stadijima, vidan gubitak prozirnosti i promjena boje zbog koagulacije i/ili taloženja proteina, što rezultira bjelkasto-mutnim izgledom; OECD 210).

Napomena: ako je za jednokratno tretiranje potreban drugi dan prikupljanja, kod svih se tretiranja (uključujući kontrole) mora poštovati taj postupak. Ako nakon drugog dana prikupljanja u tretiranju nema dovoljno embrija da bi se napunilo 20 embrija po inkubatoru, broj embrija kojima se pune inkubatori treba smanjiti na 15. Ako nema dovoljno embrija da bi se napunilo 15 embrija po inkubatoru, treba smanjiti broj ponavljanja inkubatora tako da bude dovoljno embrija za 15 embrija po inkubatoru. Osim toga, moglo bi se dodati više uzgojnih parova po tretiranju i kontrolama u generaciji F0 kako bi se dobilo više jajašaca i dosegao preporučeni broj od 20 jajašaca po ponavljanju.

Uzgojni parovi generacije F0 humano se usmrćuju 24. ispitnog dana te se evidentiraju njihova masa i duljina. Uzgojni parovi generacije F0 po potrebi se mogu držati još jedan ili dva dana kako bi se ponovno započela generacija F1.

5.–6. ispitni tjedan (F1)

Od jednog do dva dana prije predviđenog početka valjenja, treba zaustaviti ili smanjiti protresanje jajašaca koja se inkubiraju kako bi se ubrzalo valjenje. Budući da se embriji vale svakog dana, mladunci se objedinjuju prema tretiranju i sustavno raspodjeljuju u svaki spremnik s ponavljanjem za ličinke u okviru specifičnog tretiranja s najviše 12 mladunaca. To se obavlja nasumičnim odabirom mladunaca i stavljanjem pojedinačnih mladunaca u uzastopna ponavljanja neselektivnim izvlačenjem, krećući se redom kroz specifična

ponavljanja tretiranja dok sva ponavljanja u okviru tretiranja ne budu imala 12 mladunaca. Ako nema dovoljno mladunaca da se popune sva ponavljanja, treba osigurati da što više ponavljanja ima 12 mladunaca da bi se započela faza F1.

Jajašca koja se ne izvale u razdoblju dvostruko duljem od srednjeg dana valjenja u kontroli smatraju se neodrživima te se odbacuju. Evidentira se broj mladunaca i računa se uspješnost valjenja (valjivost) u svakom ponavljanju.

7.–11. ispitni tjedan (F1)

Preživljavanje ličinki riba svakodnevno se provjerava i evidentira u svim ponavljanjima. Evidentira se broj preživjelih riba u svakom ponavljanju 43. ispitnog dana te početni broj mladunaca koji su stavljeni u ponavljanje (najbolje dvanaest). To omogućuje izračun postotka preživljavanja od valjenja do faze riba koje nisu odrasle.

Ispitni tjedni (F1)

Od 78. do 85. ispitnog dana uzima se mali uzorak s repne peraje svake ribe kako bi se utvrdio genotipski spol jedinke (tj. obrezivanje peraja) za sve ribe. Te se informacije koriste za utvrđivanje uzgojnih parova.

U roku od tri dana od utvrđivanja genotipskog spola svake ribe, nasumično se utvrđuje 12 uzgojnih parova po tretiranju i 24 para po kontroli. Dvije ribe XX i XY iz svakog ponavljanja nasumično se odabiru i objedinjuju prema spolu te se zatim nasumično odabiru za uspostavu uzgojnog para (tj. par XX-XY). Uspostavlja se najmanje 12 ponavljanja po tretiranju kemikalijom i najmanje 24 ponavljanja za kontrolu s jednim uzgojnim parom po ponavljanju. Ako u ponavljanju ne postoje dvije ribe XX ili dvije ribe XY koje su dostupne za objedinjavanje, ribe s genotipom odgovarajućeg spola treba uzeti iz drugih ponavljanja u tretiranju.

Preostale ribe (najviše osam riba po ponavljanju) humano se usmrćuju i uzorkuju za različite krajnje točke riba koje nisu odrasle. Podaci o genu *dmy* (XX ili XY) za sve uzorke riba koje nisu odrasle zadržavaju se kako bi se osiguralo da se svi podaci o krajnjim točkama mogu povezati s genetskim spolom svake pojedinačne ribe.

13.–14. ispitni tjedan (F1)

Izlaganje se nastavlja kako se uzgojni parovi riba koje nisu odrasle razvijaju u odrasle ribe. Na 98. ispitni dan (tj. dan prije početka prikupljanja jajašaca) jajašca se uklanjaju i iz akvarija i sa ženki.

15.–17. ispitni tjedan (F1)

Izmriješčena jajašca prikupljaju se svakodnevno 21 uzastopan dan u svakom ponavljanju te se procjenjuju u pogledu potencijalne i stvarne plodnosti.

18. ispitni tjedan (ponavljanje 4. ispitnog tjedna) (F1 i F2)

Na 120. ispitni dan prikupljanje jajašaca obavlja se ujutro u svakom spremniku s ponavljanjem. Procjenjuju se prikupljena jajašca te se oplođena jajašca (uklonjeni filamenti) od svakog uzgojnog para objedinjuju prema tretiranju i sustavno distribuiraju u komore inkubatora jajašaca s 20 oplođenih jajašaca po inkubatoru. Inkubatori se mogu staviti u posebne „spremnike inkubatora” uspostavljene za svako tretiranje ili u spremnik s ponavljanjem u kojem će se ličinke držati nakon valjenja. Preporučuje se da se embriji prikupljaju istog dana; međutim, ako nema dovoljno embrija, mogu se prikupljati tijekom dva dana. Ako se prikupljaju dva dana, svi embriji u tretiranjima koji su prikupljeni prvog dana objedinjuju se s onima koji su prikupljeni drugog dana. Zatim se svi objedinjeni embriji za svako tretiranje nasumično raspodjeljuju u sve inkubatore ponavljanja tako da u svakom inkubatoru bude 20 embrija. Napomena: ako je za jednokratno tretiranje potreban drugi dan prikupljanja, kod svih se tretiranja (uključujući kontrole) mora poštovati taj postupak. Ako nakon drugog dana prikupljanja u tretiranju nema dovoljno embrija da bi se napunilo 20 embrija po inkubatoru, broj embrija kojima se pune inkubatori treba smanjiti na 15. Ako nema dovoljno embrija da bi se napunilo 15 embrija po inkubatoru, treba smanjiti broj ponavljanja inkubatora tako da bude dovoljno embrija za 15 embrija po inkubatoru.

Na 121. ispitni dan (ili 122. ispitni dan, kako bi se osiguralo da se generacija F2 dobro započne) uzgojni parovi generacije F1 humano se usmrćuju i analiziraju u pogledu krajnjih točaka odraslih riba. Uzgojni parovi generacije F1 po potrebi se mogu držati još jedan ili dva dana kako bi se ponovno započela generacija F2.

19.–20. ispitni tjedan (F2)

Od jednog do dva dana prije predviđenog početka valjenja, treba zaustaviti ili smanjiti protresanje jajašaca koja se inkubiraju kako bi se ubrzalo valjenje. Ako ispitivanje završi dovršetkom valjenja generacije F2, mladunci se evidentiraju i odbacuju (embriji koji se ne izvale nakon produljenog vremena inkubacije, koje se definira kao razdoblje dvostruko dulje od srednjeg dana valjenja u kontroli, smatraju se neodrživima).

Dodatak 10.

STATISTIČKA ANALIZA

Vrste bioloških podataka koji nastanu u ispitivanju MEOGRT nisu jedinstveni za to ispitivanje i, osim za patološke podatke, razvijene su mnoge primjerene statističke metodologije za pravilnu analizu sličnih podataka ovisno o značajkama podataka, među ostalim, normalnosti, homogenosti varijance, omogućuje li plan studije ispitivanje hipoteza ili regresijsku analizu, parametrijska ispitivanja u odnosu na neparametrijska itd. Općenito, u predloženim statističkim metodama poštuju se preporuke OECD-a za podatke o ekotoksičnosti (OECD, 2006.), a na slici 2. može se vidjeti grafikon odluke za analizu podataka dobivenih ispitivanjem MEOGRT.

Pretpostavlja se da će skupovi podataka najčešće pokazivati monotonične odgovore. Osim toga, treba razmotriti pitanje upotrebe jednosmjernog statističkog testiranja ili dvosmjernog statističkog testiranja. Predlaže se upotreba jednosmjernih statističkih testiranja osim ako postoji biološki razlog zbog kojeg ono ne bi bilo primjereno. Iako se u sljedećem odjeljku predlažu određeni statistički testovi, ako se razviju primjerenije i/ili snažnije statističke metode za primjenu na specifičnim podacima koji se dobiju ispitivanjem MEOGRT, upotrebljavali bi se ti statistički testovi kako bi se iskoristile te prednosti.

Podatke dobivene ispitivanjem MEOGRT treba analizirati zasebno za svaki genotipski spol. Postoje dvije strategije za analizu podataka o ribama s promijenjenim spolom (mužjaci XX ili ženke XY): 1) isključivanje svih podataka o ribama s promijenjenim spolom iz cijelog ispitivanja, osim učestalosti pojave promjene spola u svakom ponavljanju; 2) zadržavanje podataka o svim ribama s promijenjenim spolom u skupu podataka i analiza na temelju genotipa.

Histopatološki podaci

Histopatološki podaci navode se kao ocjene ozbiljnosti koje se procjenjuju upotrebom novog statističkog postupka – RSCABS (engl. *Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices*), (Green i dr., 2014.). U prilagodbama *Rao-Scottova* postupka zadržavaju se informacije iz ponavljanja ispitivanja; postupak *u dijelovima* (engl. *by Slices*) uključuje biološko očekivanje da se ocjene ozbiljnosti obično povećavaju s povećanjem koncentracija u tretiranjima. Za svaku se dijagnozu u ishodu RSCABS-a navodi kod kojih se tretiranja javlja veća učestalost pojave patologije nego u kontrolama te povezane razine ozbiljnosti.

Podaci o potencijalnoj plodnosti

Analize za podatke o potencijalnoj plodnosti sastoje se od Jonckheere-Terpstraova ili Williamsova testa postupnog snižavanja kako bi se utvrdili učinci tretiranja, pod uvjetom da su podaci usklađeni s monotoničnim odgovorom na koncentraciju. Kod testa postupnog snižavanja sve se usporedbe obavljaju pri razini značajnosti od 0,05 i nema prilagodbi za broj usporedbi. Očekuje se da su podaci usklađeni s monotoničnim odgovorom na koncentraciju, ali to se može provjeriti vizualnim pregledom podataka ili izradom linearnih i

kvadratnih kontrasta srednjih vrijednosti tretiranja nakon transformacije podataka u redoslijed rangova. Test trenda dovršen je osim ako je kvadratni kontrast značajan, a linearni kontrast nije značajan. U suprotnom se obavlja Dunnettov test kako bi se utvrdili učinci tretiranja ako su podaci normalno distribuirani s homogenim varijancama. Ako ti zahtjevi nisu ispunjeni, upotrebljava se Dunnov test s Bonferonni-Holmovom prilagodbom. Svi navedeni testovi obavljaju se neovisno o bilo kakvom općem F-testu ili Kruskal-Wallisovu testu. Dodatne pojedinosti nalaze se u OECD-ovoj publikaciji iz 2006.

Mogu se koristiti i alternativne metode, kao što su općeniti linearni model s Poissonovim pogreškama za brojeve jajašaca (bez transformacije), ako se to statistički obrazloži (Cameron i Trividi, 2013.). Ako se upotrebljava alternativni pristup, preporučuje se statističko savjetovanje.

Dnevni broj jajašaca u jednoj generaciji

Model ANOVA računa se kao $Y = \text{Vrijeme} * \text{Vrijeme} + \text{Tretiranje} + * \text{Tretiranje} + \text{Vrijeme} * \text{Tretiranje} + * \text{Vrijeme} * \text{Tretiranje}$, s nasumičnim učincima ponavljanja (Generacija * Tretiranje) i $\text{Vrijeme} * \text{Ponavljanje}$ (Tretiranje), pri čemu se dopuštaju nejednake komponente varijance oba tipa kroz generacije. Vrijeme se ovdje odnosi na učestalost brojenja jajašaca (npr. dan ili tjedan). Ovo je analiza ponovljenog mjerenja, s korelacijama između opažanja na istim ponavljanjima kojima se uzima u obzir priroda ponovljenih mjerenja podataka.

Glavni učinci tretiranja ispituju se upotrebom Dunnettova (ili Dunnett-Hsuova) testa, kojim se prilagođava broj usporedbi. Potrebne su prilagodbe za glavni učinak generacije ili vremena jer za ta dva čimbenika ne postoji razina „kontrola” i svaki je par razina usporedba od mogućeg interesa. U slučaju tih dvaju glavnih učinaka, ako je F-test za glavni učinak značajan na razini od 0,05, usporedbe u parovima među razinama tog čimbenika zatim se mogu ispitati na razini od 0,05 bez daljnje prilagodbe.

Model uključuje interakcije s dva i tri čimbenika, tako da glavni učinak za, na primjer, vrijeme, ne može biti značajan iako vrijeme znatno utječe na rezultate. Stoga, ako je interakcija s dva ili tri čimbenika koja uključuje vrijeme značajna na razini od 0,05, mogu se prihvatiti usporedbe razina vremena na razini značajnosti od 0,05 bez daljnje prilagodbe.

Zatim slijede F-testovi za značajnost tretiranja u vremenu, takozvani dijelovi u tablici ANOVA. Ako je, na primjer, dio za tretiranje u generaciji F1 i vremenu 12 značajan na razini od 0,05, usporedbe u parovima za tretiranje u generaciji F1 i vremenu 12 mogu se prihvatiti na razini od 0,05 bez daljnje prilagodbe. Slične izjave primjenjuju se na testove za vrijeme u generaciji F1 i tretiranju te za generaciju u okviru vremena i tretiranja.

Naposljetku, u slučaju usporedbi koje ne pripadaju nijednoj od prethodno navedenih kategorija, usporedbe treba prilagoditi upotrebom Bonferonni-Holmove prilagodbe p-vrijednostima. Daljnje informacije o analizama tih modela mogu se pronaći u Hocking (1985.) te Hochberg i Tamhane (1987.).

Umjesto toga, neobrađeni podaci evidentiraju se i prikazuju u izvješću o studiji kao potencijalna plodnost (broj jajašaca) po ponavljanju za svaki dan. Treba izračunati srednju vrijednost ponavljanja iz neobrađenih podataka i zatim primijeniti drugi korijen transformacija. Treba izračunati jednosmjernu ANOVA-u na transformiranim srednjim vrijednostima ponavljanja, nakon čega slijede Dunnettovi kontrasti. Može biti korisno i vizualno pregledati podatke o potencijalnoj plodnosti svakog tretiranja i/ili ponavljanja s pomoću dijagrama raspršenosti na kojem se prikazuju podaci kroz vrijeme. Time će se omogućiti neformalna procjena potencijalnih učinaka kroz vrijeme.

Svi ostali biološki podaci

Statističke analize temelje se na temeljnoj pretpostavci da će podaci biti monotonični ako je doza pravilno odabrana. Stoga se pretpostavlja da su podaci monotonični te se oni formalno procjenjuju u pogledu monotoničnosti upotrebom linearnih i kvadratnih kontrasta. Ako su podaci monotonični, preporučuje se Jonckheere-Terpstraov test trenda na srednjim vrijednostima ponavljanja (kako se savjetuje u publikaciji OECD-a iz 2006.). Ako je kvadratni kontrast značajan, a linearni kontrast nije, smatra se da podaci nisu monotonični.

Ako podaci nisu monotonični, osobito zbog smanjenog odgovora najvišeg tretiranja ili prva dva najviša tretiranja, treba razmotriti isključivanje tih tretiranja iz skupa podataka za analizu. Za tu odluku potrebna je stručna prosudba i svi dostupni podaci, posebno podaci koji ukazuju na očitu toksičnost na tim razinama tretiranja.

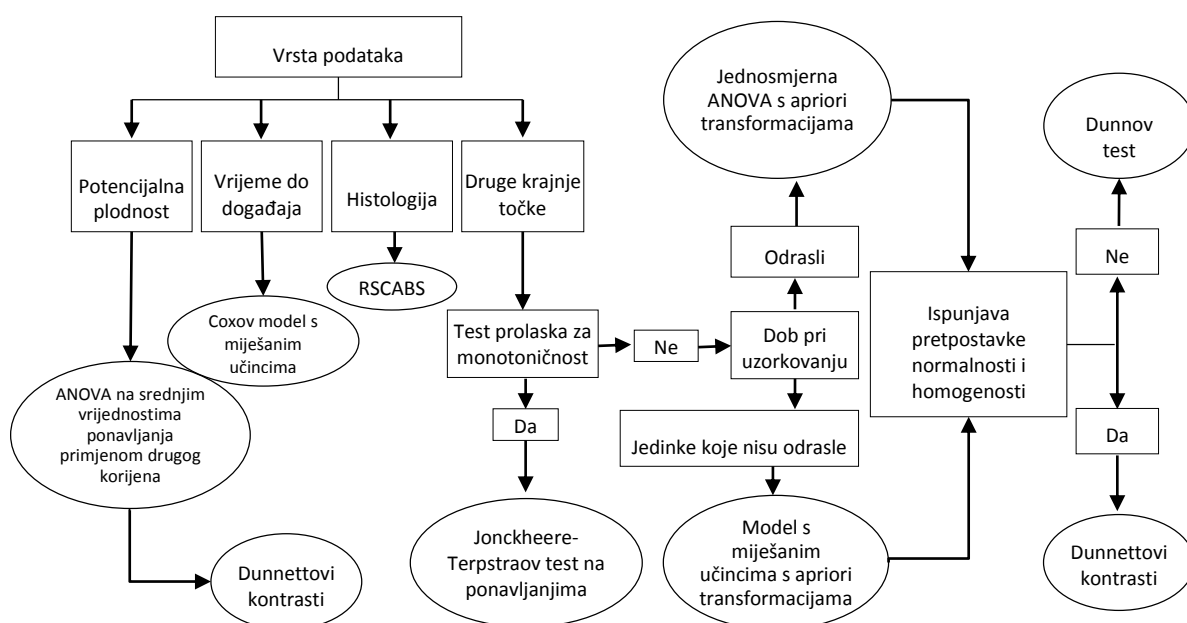
Za masu i dužinu ne preporučuju se nikakve prilagodbe, iako ponekad mogu biti potrebne. Međutim, za podatke o vitelogeninu preporučuje se log transformacija; za podatke o SSC-u preporučuje se log transformacija (papile na podrepnoj peraji); za podatke o udjelu valjenja, postotku preživljavanja, omjeru spolova i postotku plodnih jajašaca preporučuje se transformacija arkus sinusa drugog korijena. Vrijeme do valjenja i vrijeme do prvog mriješćenja treba tretirati kao podatke o vremenu do događaja, pri čemu se pojedinačni embriji koji se ne izvale u utvrđenom razdoblju ili ponavljanja u kojima ne dođe do mriješćenja tretiraju kao podaci koji se cenzuriraju desno. Vrijeme do valjenja treba računati od srednjeg dana valjenja svakog ponavljanja. Te krajnje točke treba analizirati upotrebom Coxova modela proporcionalne opasnosti s miješanim učincima.

Biološki podaci uzoraka odraslih riba imaju jedno mjerenje po ponavljanju, odnosno postoji jedna riba XX i jedna riba XY po akvariju s ponavljanjem. Stoga se preporučuje da se na srednjim vrijednostima ponavljanja provede jednosmjerna ANOVA. Ako se ispune pretpostavke ANOVA-e (normalnost i homogenost varijanci, kako su procijenjeni na rezidualima ANOVA-e Shapiro-Wilksovim odnosno Leveneovim testom), treba upotrijebiti Dunnettove kontraste kako bi se utvrdila tretiranja koja su različita od kontrole. S druge strane, ako se ne ispune pretpostavke ANOVA-e, treba provesti Dunnov test kako bi se utvrdilo koja su tretiranja različita od kontrole. Sličan se postupak preporučuje za podatke koji su u obliku postotaka (plodnost, valjenje i preživljavanje).

Biološki podaci uzoraka riba koje nisu odrasle imaju od jednog do osam mjerenja po ponavljanju, odnosno može postojati različit broj jedinki koje pridonose srednjoj vrijednosti

ponavljanja za svaki genotipski spol. Stoga se preporučuje upotreba modela ANOVA s miješanim učincima, nakon čega slijede Dunnettovi kontrasti ako su ispunjene pretpostavke normalnosti i homogenosti varijanci (na rezidualima ANOVA-e s miješanim učincima). Ako one nisu ispunjene, treba provesti Dunnov test kako bi se utvrdilo koja su tretiranja različita od kontrole.

Slika 2.: Dijagram toka za preporučene statističke postupke za analizu podataka u ispitivanju MEOGRT



Literatura

1. OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (prilozi ovoj publikaciji postoje kao zasebni dokument), OECD Publishing, Pariz.
2. Cameron AC and Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.
3. Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.
4. Hochberg Y and Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

C.53. TEST RASTA I RAZVOJA VODOZEMACA U FAZI LIČINKI (LAGDA)

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 241 (2015.). Potreba za razvojem i validacijom testa kojim se mogu identificirati i opisati štetne posljedice izlaganja toksičnim kemikalijama u vodozemaca pojavila se zbog zabrinutosti da razine kemikalija u okolišu mogu štetno utjecati i na ljude i na životinje. U Smjernici OECD-a za ispitivanje pod nazivom Test rasta i razvoja vodozemaca u fazi ličinki (LAGDA, engl. *Larval Amphibian Growth and Development Assay*) opisuje se toksikološko ispitivanje s vrstom vodozemaca u kojem se razmatraju rast i razvoj od oplodnje i tijekom ranog juvenilnog razdoblja. To je test (obično 16 tjedana) u kojem se procjenjuju rani razvoj, metamorfoza, preživljavanje, rast i djelomično reproduktivno sazrijevanje. U njemu se omogućuje i mjerenje skupa drugih krajnjih točaka koje omogućuju dijagnostičku ocjenu kemikalija za koje se sumnja da su endokrino disruptivne ili drugih vrsta razvojnih i reproduktivnih toksikanata. Metoda opisana u ovoj ispitnoj metodi izvedena je iz validacijske studije s afričkom pandžašicom (*Xenopus laevis*) koju je provela Agencija SAD-a za zaštitu okoliša (U.S. EPA) uz popratni rad obavljen u Japanu (1.). Iako se druge vrste vodozemaca mogu prilagoditi protokolu testa rasta i razvoja, pri čemu je mogućnost utvrđivanja genetskog spola važna sastavnica, specifične metode i krajnje točke promatranja opisane u ovoj ispitnoj metodi primjenjive su samo na vrstu *Xenopus laevis*.
2. LAGDA služi kao ispitivanje više razine na vodozemcima za prikupljanje sveobuhvatnijih informacija o odnosu koncentracije i odgovora u pogledu štetnih učinaka, a primjereno je za identifikaciju i opis opasnosti te za procjenu rizika za okoliš. Test pripada četvrtoj razini OECD-ova konceptualnog okvira za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih kemikalija, na kojoj *in vivo* testovi pružaju i informacije o štetnim učincima na relevantne endokrine krajnje točke (2.). Opći plan izvođenja pokusa obuhvaća izlaganje embrija vrste *X. laevis* u 8.–10. stadiju prema Nieuwkoopu i Faberu (NF) (3.) najmanje četirima različitim koncentracijama ispitivane kemikalije (obično raspoređene barem u polulogaritamske intervale) i kontrolama do deset tjedana nakon srednjeg vremena do 62. stadija NF-a u kontroli, s jednim međuvremenim poduzorkom u 62. stadiju NF-a (≤ 45 nakon oplodnje; obično približno 45 dana (dana nakon oplodnje)). Svaka se ispitivana koncentracija sastoji od četiri ponavljanja s osam ponavljanja za kontrolu. Krajnje točke koje se ocjenjuju tijekom izlaganja (kod međuvremenog poduzorka i konačnog uzorka na kraju ispitivanja) uključuju točke koje ukazuju na opću toksičnost: smrtnost, abnormalno ponašanje i utvrđivanja rasta (duljina i masa) te krajnje točke koje su osmišljene za opis specifičnih načina djelovanja endokrine toksičnosti koji su usmjereni na fiziološke procese kojima posreduje estrogen, androgen ili hormon štitnjače. U metodi se najveća važnost

pridaje učincima koji su potencijalno relevantni za populaciju (točnije, štetnim učincima na preživljavanje, razvoj, rast i reproduktivni razvoj) za izračun najviše koncentracije bez vidljivog učinka (NOEC) ili koncentracije s x-postotnim učinkom (ECx) na krajnjoj točki koja se mjeri. Iako treba napomenuti da su pristupi u kojima se upotrebljava ECx rijetko primjereni za velike studije ove vrste kod kojih povećanje broja ispitnih koncentracija kako bi se omogućilo utvrđivanje željenog ECx može biti nepraktično. Treba napomenuti i da metodom nije obuhvaćena sama reproduktivna faza. Definicije koje se upotrebljavaju u ovoj ispitnoj metodi navedene su u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

3. Zbog ograničenog broja ispitanih kemikalija i laboratorija uključenih u validaciju ovog poprilično složenog testa (osobito obnovljivost između više laboratorija za sada nije dokumentirana s eksperimentalnim podacima) predviđa se da će se Smjernica OECD-a za ispitivanje 241 revidirati i, prema potrebi, prilagoditi stečenom iskustvu kada za utvrđivanje učinka ovog novog dizajna studije bude dostupan dovoljan broj studija. LAGDA je važan test za rasvjetljavanje čimbenika koji potencijalno pridonose smanjenju populacije vodozemaca procjenom učinaka izlaganja kemikalijama tijekom osjetljivog stadija ličinke, u kojem učinci na preživljavanje i razvoj, uključujući normalan razvoj reproduktivnih organa, mogu štetno utjecati na populacije.
4. Ispitivanje je osmišljeno za otkrivanje apikalnih učinaka koji su rezultat i endokrinih mehanizama i mehanizama koji nisu endokrini te uključuje dijagnostičke krajnje točke koje su djelomično specifične za ključne endokrine modalitete. Treba napomenuti da prije razvoja testa LAGDA nije postojao validirani test koji je služio toj svrsi za vodozemce.
5. Prije započinjanja testa važno je imati informacije o fizikalno-kemijskim svojstvima ispitivane kemikalije, osobito kako bi se omogućilo dobivanje stabilnih otopina kemikalija. Važno je i imati dovoljno osjetljivu analitičku metodu za provjeru koncentracija ispitivane kemikalije. Za test, koji traje približno 16 tjedana, potrebno je ukupno 480 životinja, tj. embrija vrste *X. laevis* (ili 640 embrija ako se upotrebljava kontrola s otapalom) kako bi se osigurala dovoljna snaga ispitivanja za ocjenu krajnjih točaka koje su relevantne za populaciju, kao što su rast, razvoj i reproduktivno sazrijevanje.
6. Prije primjene ispitne metode za regulatorno ispitivanje smjese trebalo bi razmotriti hoće li se njome dobiti prihvatljivi rezultati za predviđenu regulatornu svrhu. Nadalje, ovim se testom potencijalna plodnost ne ocjenjuje izravno pa možda neće biti primjenjiv za upotrebu na razini višoj od četvrte razine OECD-ova konceptualnog okvira za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih tvari.

ZNANSTVENA OSNOVA ZA ISPITNU METODU

7. Velik dio trenutačnih spoznaja o biologiji vodozemaca dobiven je upotrebom ogledne laboratorijske vrste *X. laevis*. Ta se vrsta može rutinski uzgajati u laboratoriju, ovulacija se može inducirati upotrebom humanog korionskog gonadotropina (hCG) i zalihe životinja lako su dostupne kod komercijalnih uzgajivača.
8. Kao i kod svih kralježnjaka, razmnožavanje vodozemaca pod kontrolom je osi hipotalamus-hipofiza-gonade (HPG) (4.). Estrogeni i androgeni posrednici su tog endokrinog sustava, koji određuju razvoj i fiziologiju spolno dimorfnih tkiva. U životnom ciklusu vodozemaca postoje tri posebne faze kada je ta os osobito aktivna: 1. gonadna diferencijacija tijekom razvoja ličinki, 2. razvoj sekundarnih spolnih obilježja i gonadno sazrijevanje tijekom juvenilne faze te 3. funkcionalno razmnožavanje odraslih jedinki. Sve te točke u razvoju vjerojatno su osjetljive na endokrine poremećaje koje uzrokuju određene kemikalije kao što su estrogeni i androgeni, što naposljetku dovodi do gubitka reproduktivne sposobnosti organizama.
9. Gonade se počinju razvijati u 43. stadiju NF-a, kada se prvo razvija bipotencijalni genitalni greben. Diferencijacija gonada počinje u 52. stadiju NF-a, kada primordijalne zametne stanice migriraju u medularno tkivo (mužjaci) ili ostaju u kortikalnoj regiji (ženke) gonada u razvoju (3.). Prvi je put navedeno da je taj proces spolne diferencijacije gonada osjetljiv na kemijske promjene kod roda *Xenopus* pedesetih godina 20. stoljeća (5. i 6.). Izlaganje punoglavaca estradiolu tijekom tog razdoblja diferencijacije gonada dovodi do promjene spola mužjaka koji postaju potpuno funkcionalne ženke kada dosegnu odraslu dob (7. i 8.). Moguća je i funkcionalna promjena spola ženki u mužjake i navedeno je da do nje dolazi nakon implantacije tkiva testisa kod punoglavaca (9.). Međutim, iako izlaganje inhibitoru aromataze uzrokuje funkcionalnu promjenu spola i kod vrste *X. tropicalis* (10.), nije dokazano da do toga dolazi i kod vrste *X. laevis*. U prijašnjim su se ispitivanjima učinci toksičnih tvari na gonadnu diferencijaciju procjenjivali histološkim ispitivanjem gonada pri metamorfozi i promjena spola mogla se utvrditi samo analizom omjera spolova. Donedavno nisu postojala sredstva za izravno utvrđivanje genetskog spola kod roda *Xenopus*. Međutim, nedavno su kod vrste *X. laevis* utvrđeni markeri povezani sa spolom, što omogućuje utvrđivanje genetskog spola i omogućuje izravnu identifikaciju životinja koje su promijenile spol (11.).
10. Razvoj mladih mužjaka nastavlja se s povećanjem razina testosterona u krvi koje odgovara razvoju sekundarnih spolnih obilježja te razvoju testisa. Kod ženki jajnici proizvode estradiol, što dovodi do pojave vitelogenina (VTG) u plazmi, vitelogenih jajnih stanica u jajniku i razvoja jajovoda (12.). Jajovodi su sekundarno spolno obilježje ženki koji djeluju u sazrijevanju jajnih stanica tijekom reprodukcije. Želatinozni omotači prijanjaju uz vanjsku površinu jajnih stanica dok one prolaze kroz jajovod i sakupljaju se u vrećici s

jajašcima te su spremne za oplodnju. Čini se da razvojem jajovoda upravljaju estrogini jer je razvoj u korelaciji s razinama estradiola u krvi kod vrsta *X. laevis* (13.) i *X. tropicalis* (12.). Navedeno je da dolazi do razvoja jajovoda u mužjaka nakon izlaganja spojevima polikloriranih bifenila (14.) i 4-*tert*-oktilfenolu (15.).

NAČELO ISPITIVANJA

11. Plan ispitivanja obuhvaća izlaganje embrija vrste *X. laevis* u 8.–10. stadiju NF-a putem vode različitim koncentracijama ispitivane kemikalije te kontrolama do deset tjedana nakon srednjeg vremena do 62. stadija NF-a u kontroli s jednim međuvremenim poduzorkom u 62. stadiju NF-a. Iako je jako hidrofobne kemikalije moguće dozirati u hrani, zasada je iskustvo u upotrebi tog načina izlaganja u ovom testu ograničeno. Svaka se ispitivana koncentracija sastoji od četiri ponavljanja s osam ponavljanja za svaku upotrijebljenu kontrolu. Krajnje točke koje se ocjenjuju tijekom izlaganja uključuju one koje ukazuju na opću toksičnost (tj. smrtnost, abnormalno ponašanje i utvrđivanja rasta (duljina i masa)) te krajnje točke koje su osmišljene za opis specifičnih načina djelovanja endokrine toksičnosti koji su usmjereni na fiziološke procese kojima posreduje estrogen, androgen ili hormon štitnjače (tj. histopatologija štitnjače, histopatologija gonada i gonadnih kanala, abnormalan razvoj, vitelogenin u plazmi (neobavezno) i omjeri genotipskog/fenotipskog spola).

KRITERIJI VALJANOSTI ISPITIVANJA

12. Primjenjuju se sljedeći kriteriji za valjanost ispitivanja:

- tijekom cijelog ispitivanja koncentracija otopljenog kisika trebala bi iznositi ≥ 40 % vrijednosti zasićenosti kisikom,
- temperatura vode treba biti u rasponu od 21 ± 1 °C i razlike između ponavljanja i između tretiranja ne bi trebale biti veće od 1,0 °C,
- pH-vrijednost ispitivane otopine treba održavati u rasponu od 6,5 do 8,5 i razlike između ponavljanja i između tretiranja ne bi trebale biti veće od 0,5,
- trebali bi postojati dokazi da su se koncentracije ispitivane kemikalije u otopini uspješno održavale u rasponu od ± 20 % srednjih izmjerenih vrijednosti,
- smrtnost tijekom razdoblja izlaganja treba biti ≤ 20 % u svakom ponavljanju u kontrolama,
- vijabilnost ≥ 70 % u mrijestu koji je odabran za započinjanje studije,
- srednje vrijeme do 62. stadija NF-a kontrola treba biti ≤ 45 dana,

- srednja masa ispitnih organizama u 62. stadiju NF-a i na kraju testa treba dosegnuti $1,0 \pm 0,2$ g u kontrolama i $11,5 \pm 3$ g u kontrolama s otapalom (ako se upotrebljavaju).
13. Iako to nije kriterij valjanosti, preporučuje se da za analizu budu dostupne najmanje tri razine tretiranja s tri nekompromitirana ponavljanja. Visoka smrtnost, koja kompromitira tretiranje, definira se kao > 4 smrtna slučaja ($> 20 \%$) u dva ili više ponavljanja koji se ne mogu objasniti tehničkom pogreškom. Za analizu bi trebale biti dostupne najmanje tri razine tretiranja bez jasnih znakova očite toksičnosti. Znakovi očite toksičnosti mogu uključivati, ali nisu ograničeni na, plutanje na površini, ležanje na dnu spremnika, obrnuto ili nepravilno plivanje, neizlaženje na površinu i nereagiranje na poticaje, morfološke abnormalnosti (npr. deformacije udova), hemoragijske lezije i abdominalne edeme.
14. Ako se uoči odstupanje od kriterija valjanosti ispitivanja, potrebno je razmotriti posljedice u odnosu na pouzdanost rezultata ispitivanja te ta odstupanja i razmatranja uključiti u izvješće o ispitivanju.

OPIS METODA

Oprema

15. Uobičajena laboratorijska oprema, posebno:
- (a) uređaji za kontroliranje temperature (npr. grijači ili hladnjaci podesivi na 21 ± 1 °C);
 - (b) termometar;
 - (c) binokularni disekcijski mikroskop i pribor za seciranje;
 - (d) digitalni fotoaparati s najmanje četiri megapiksela razlučivosti i mikrofunkcijom (ako je potrebno);
 - (e) analitička vaga s mogućnošću mjerenja do 0,001 mg ili 1 µg;
 - (f) mjerač otopljenog kisika i pH-vrijednosti;
 - (g) mjerač intenziteta svjetlosti s mogućnošću mjerenja u luksima.

Voda

Izvor i kvaliteta

16. Može se upotrebljavati bilo koja voda za razrjeđivanje koja je lokalno dostupna (npr. izvorska voda ili voda iz slavine filtrirana ugljenom) i omogućuje normalan rast i razvoj vrste *X. laevis* te trebaju biti dostupni dokazi o normalnom rastu u toj vodi. Budući da se kakvoća lokalne vode može znatno razlikovati od jednog do drugog područja, potrebno je provesti analizu kakvoće vode, pogotovo ako nisu dostupni prijašnji podaci o korisnosti vode za uzgoj ličinki vodozemaca. Mjerenje teških metala (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), glavnih aniona i kationa (npr. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), pesticida, ukupnog

organskog ugljika i suspendirane krute tvari treba provoditi prije početka ispitivanja i/ili npr. svakih šest mjeseci ako se zna da je voda za razrjeđivanje relativno stalne kakvoće. Neka kemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeđivanje navedena su u Dodatku 2.

Koncentracija jodida u ispitnoj vodi

17. Kako bi štitnjača sintetizirala hormone štitnjače i podržala normalnu metamorfozu, ličinkama treba biti dostupno dovoljno jodida koji se dobiva iz vode i hrane. Trenutačno ne postoje empirijski izvedene smjernice za najmanje koncentracije jodida u hrani ili vodi kojima se osigurava pravilan razvoj. Međutim, dostupnost jodida može utjecati na reakciju tiroidnog sustava na aktivna sredstva i poznato je da modulira bazalnu aktivnost štitnjače, što zasluđuje pozornost pri tumačenju rezultata histopatologije štitnjače. Na temelju prethodnog rada, uspješna provedba testa dokazana je kada je raspon koncentracija jodida (I^-) u vodi za razrjeđivanje od 0,5 do 10 $\mu\text{g/l}$. Idealno bi najmanja koncentracija jodida u vodi za razrjeđivanje tijekom cijelog ispitivanja trebala iznositi 0,5 $\mu\text{g/l}$ (dodan u obliku natrijeve ili kalijeve soli). Ako se ispitna voda pomiješa s deioniziranom vodom, potrebno je dodati jod u minimalnoj koncentraciji od 0,5 $\mu\text{g/l}$. Treba izvijestiti o izmjerenim koncentracijama jodida u ispitnoj vodi (tj. vodi za razrjeđivanje) i dodavanju joda ili drugih soli (ako se upotrebljavaju) ispitnoj vodi. Osim u ispitnoj vodi, udio joda može se mjeriti i u hrani.

Sustav izlaganja

18. Ispitivanje je razvijeno upotrebom protočnog sustava za razrjeđivanje. Sastavnice sustava koje dolaze u dodir s vodom trebale bi biti od stakla, nehrđajućeg čelika i/ili drugih kemijski inertnih materijala. Spremnici za izlaganje trebaju biti akvariji od stakla ili nehrđajućeg čelika, a iskoristivi volumen spremnika trebao bi biti od 4,0 do 10,0 l (najmanja dubina vode od 10 do 15 cm). Sustav bi trebao moći podržati sve koncentracije u izlaganjima, kontrolu i kontrolu s otapalom, ako je potrebna, s četiri ponavljanja po tretiranju i osam ponavljanja u kontrolama. Brzina protoka za svaki spremnik trebala bi biti konstantna s obzirom na održavanje bioloških uvjeta i izlaganje kemikaliji. Preporučuju se primjerene brzine protoka (npr. najmanje pet izmjena vode u spremniku dnevno) kako bi se izbjegla smanjenja koncentracije kemikalija zbog metabolizma ispitnih organizama i vodenih mikroorganizama prisutnih u akvariju ili abiotičkih načina razgradnje (hidroliza, fotoliza) ili gubitka (hlapljenje, sorpcija). Spremnicima za tretiranje treba nasumično dodijeliti položaj u sustavu izlaganja kako bi se izbjegli mogući učinci položaja, uključujući male razlike u temperaturi, intenzitetu svjetlosti itd. Daljnje informacije o uspostavi protočnih sustava izlaganja mogu se pronaći u Standardnom vodiču za provođenje ispitivanja akutne toksičnosti na ispitivanim materijalima s ribama, makrobekralježnjacima i vodozemcima Američkog društva za testiranje i materijale (ASTM) (16.).

Uvođenje kemikalije: priprema ispitnih otopina

19. Kako bi se pripremile ispitne otopine u sustavu izlaganja glavnu otopinu ispitivane kemikalije treba uvesti u sustav izlaganja odgovarajućom crpkom ili drugim uređajima. Brzinu protoka glavne otopine treba kalibrirati u skladu s analitičkom potvrdom ispitnih otopina prije početka izlaganja i tijekom ispitivanja periodično volumetrijski provjeravati. Ispitnu otopinu u svakoj komori treba obnavljati primjenom najmanje pet obnavljanja volumena dnevno.
20. Metoda koja se upotrebljava za uvođenje ispitivane kemikalije u sustav može varirati ovisno o njezinim fizikalno-kemijskim svojstvima. Stoga prije ispitivanja treba dobiti početne informacije o kemikaliji koje su relevantne za utvrđivanje mogućnosti njezina ispitivanja. Korisne informacije o svojstvima koja su specifična za ispitivanu kemikaliju uključuju strukturnu formulu, molekularnu masu, čistoću, stabilnost u vodi i na svjetlu, pK_a i K_{ow} , topljivost u vodi (po mogućnosti u ispitnom mediju) i tlak pare te rezultate ispitivanja lake biorazgradivosti (ispitna metoda C.4. (17.) ili C.29. (18.)). Topljivost i tlak pare mogu se upotrijebiti za izračunavanje konstante Henryjeva zakona, na temelju koje se može zaključiti mogu li se očekivati gubitci zbog isparavanja ispitivane kemikalije. Provedbu ovog ispitivanja bez prethodno navedenih informacija treba pažljivo razmotriti jer će plan studije ovisiti o fizikalno-kemijskim svojstvima ispitivane kemikalije i bez tih podataka rezultate ispitivanja možda će biti teško tumačiti ili neće imati smisla. Potrebna je pouzdana analitička metoda za kvantifikaciju ispitivane kemikalije u ispitnim otopinama s utvrđenom i dokumentiranom točnošću i granicom otkrivanja. Ispitivane kemikalije topljive u vodi mogu se otopiti u alikvotima vode za razrjeđivanje pri koncentraciji pri kojoj je moguća isporuka ciljane ispitivane koncentracije u protočnom sustavu. Za kemikalije koje su na sobnoj temperaturi u tekućem ili krutom stanju te su umjereno topljive u vodi možda će biti potrebno miješanje dviju tekućina do zasićenosti ili miješanje tekućine i krute tvari do zasićenosti (npr. kolona od staklene vune) (19.). Iako će možda biti moguće dozirati vrlo hidrofobne ispitivane kemikalije u hrani, zasada je iskustvo u upotrebi tog načina izlaganja u ovom testu ograničeno.
21. Ispitne otopine odabranih koncentracija pripremaju se razrjeđivanjem glavne otopine. Glavnu otopinu trebalo bi po mogućnosti pripremiti jednostavnim miješanjem ili mućkanjem ispitivane kemikalije u vodi za razrjeđivanje mehaničkim sredstvima (npr. miješanjem i/ili tretiranjem ultrazvukom). Za postizanje odgovarajuće koncentracije glavne otopine mogu se upotrebljavati kolone/sustavi za zasićivanje ili pasivne metode doziranja (20.). Prednost se daje upotrebi ispitnog sustava bez suotapala; međutim, različite ispitivane kemikalije sadržavat će različita fizikalno-kemijska svojstva koja će vjerojatno zahtijevati različite pristupe za pripremu vode za izlaganje kemikaliji. Treba nastojati izbjeći otapala ili nosače jer: 1. određena otapala sama po sebi mogu dovesti do toksičnosti i/ili nepoželjnih ili neočekivanih odgovora; 2. ispitivanje kemikalija iznad njihove

topljivosti u vodi (što se često javlja upotrebom otapala) može dovesti do pogrešnih utvrđivanja učinkovitih koncentracija; 3. upotreba otapala u dugoročnim ispitivanjima može dovesti do znatnog stupnja nastanka „biofilma” povezanog s djelovanjem mikroba, što može utjecati na okolišne uvjete te sposobnost održavanja koncentracija izlaganja i 4. ako ne postoje prijašnji podaci koji pokazuju da otapalo ne utječe na ishod studije, upotreba otapala zahtijeva tretiranje kontrola s otapalom, što ima znatne posljedice u pogledu dobrobiti životinja jer su potrebne dodatne životinje za provedbu ispitivanja. Za kemikalije koje se teško ispituju, otapalo se može upotrebljavati kao krajnje sredstvo i potrebno je proučiti Smjernicu OECD-a za ispitivanje toksičnosti teških tvari i smjesa u vodi (21.) kako bi se utvrdila najbolja metoda. Odabir otapala ovisit će o kemijskim svojstvima ispitivane kemikalije i dostupnosti prijašnjih kontrolnih podataka o otapalu. Ako ne postoje prijašnji podaci, prije provedbe konačne studije treba utvrditi primjerenost otapala. Ako se ne može izbjeći upotreba otapala i dođe do djelovanja mikroba (nastanak biofilma), preporučuje se evidentiranje/izvješćivanje o nastanku biofilma po spremniku (najmanje jednom tjedno) tijekom cijelog ispitivanja. U idealnim uvjetima koncentraciju otapala u kontroli s otapalom i svim ispitnim obradama trebalo bi održavati stalnom. Ako se koncentracija otapala ne održava stalnom, najvišu koncentraciju otapala u ispitnoj obradi treba upotrijebiti u kontroli s otapalom. U slučajevima u kojima se upotrebljava otapalo nosač najviše koncentracije otapala ne bi smjele biti veće od 100 µl/l ili 100 mg/l (21.) i preporučuje se da se koncentracija otapala održava što nižom (npr. ≤ 20 µl/l) kako bi se izbjegli mogući učinci otapala na krajnje točke koje se mjere (22.).

Ispitne životinje

Ispitne vrste

22. Kao ispitna vrsta upotrebljava se *X. laevis* iz sljedećih razloga: 1. rutinski se uzgaja u laboratorijima diljem svijeta; 2. može se lako nabaviti kod komercijalnih dobavljača i 3. moguće je utvrditi genetski spol.

Njega i uzgoj odraslih životinja

23. Primjerena njega i uzgoj vrste *X. laevis* opisani su u standardiziranoj smjernici (23.). Držanje i njegu vrste *X. laevis* opisao je i Read (24.). Kako bi se induciralo razmnožavanje, odraslim ženkama i mužjacima koji čine od tri do pet parova intraperitonealno se ubrizgava humani korionski gonadotropin (hCG). Uzorcima ženki i mužjaka ubrizgava se npr. približno 800–1 000 IU odnosno 500–800 IU hCG-a otopljenog u fiziološkoj otopini od 0,6 do 0,9 % (ili Ringerovoj otopini za žabe, izotoničnoj otopini za upotrebu na vodozemcima; www.hermes.mbl.edu/biologicalbulletin/compendium/comp-RGR.html). Volumen koji se ubrizgavaju trebaju iznositi približno 10 µl/g tjelesne mase (~ 1 000 µl). Nakon toga inducirani uzgojni parovi drže se u velikim spremnicima, neometano i pod statičkim uvjetima radi poticanja amplexusa (vanjske oplodnje). Dno svakog spremnika

za parenje trebalo bi imati lažno dno s mrežom od nehrđajućeg čelika (npr. otvori od 1,25 cm), koja omogućava da jajašca padnu na dno spremnika. Žabe kojima je hCG ubrizgan u kasnim poslijepodnevnim satima obično će položiti većinu svojih jajašaca do sredine jutra sljedećeg dana. Nakon izbacivanja i oplodnje dovoljne količine jajašaca potrebno je ukloniti odrasle životinje iz spremnika za uzgoj. Jajašca se zatim prikupljaju i želatinozni omotači uklanjaju se tretiranjem L-cisteinom (23.). Treba pripremiti 2-postotnu otopinu L-cisteina, a pH-vrijednost prilagoditi na 8,1 s 1 M NaOH. Ta otopina temperature od 21 °C dodaje se u Erlenmeyerovu tikvicu od 500 ml koja sadržava jajašca iz jednog mrijesta te se lagano miješa jednu minutu ili dvije minute, a zatim temeljito ispiru 6–8 puta vodom za uzgoj kulture temperature od 21 °C. Jajašca se zatim prenose u posude za kristalizaciju i utvrđuje se je li vijabilnost > 70 %, s minimalnim abnormalnostima kod embrija koji pokazuju diobu stanica.

PLAN ISPITIVANJA

Ispitne koncentracije

24. Preporučuje se upotreba najmanje četiriju koncentracija kemikalija i odgovarajućih kontrola (uključujući kontrole s otapalom, ako su potrebne). Općenito se preporučuje razmak između koncentracija (interval) koji nije veći od 3,2.
25. Za potrebe ovog ispitivanja treba upotrebljavati rezultate iz postojećih studija na vodozemcima u mjeri u kojoj je to moguće kako bi se utvrdila najviša ispitna koncentracija i izbjegle koncentracije koje su očito toksične. Utvrđivanju te koncentracije mogu pridonijeti informacije iz, na primjer, kvantitativnih odnosa između strukture i aktivnosti, analogija i podaci iz postojećih studija s vodozemcima kao što su analiza metamorfoze vodozemaca, ispitna metoda C.38. (25.) i analiza teratogeneze embrija žabe – *Xenopus* (23.) i/ili ispitivanja na ribama kao što su ispitne metode C.48., C.41. i C.49. (26., 27. i 28.). Prije provedbe testa LAGDA može se provesti pokus za utvrđivanje raspona. Preporučuje se da se izlaganje za utvrđivanje raspona započne u roku od 24 sata od oplodnje i nastavi od sedam do 14 dana (po potrebi i dulje) te da se ispitne koncentracije utvrde tako da intervali između ispitnih koncentracija nisu veći od faktora 10. Rezultati pokusa za utvrđivanje raspona trebali bi služiti za utvrđivanje najviše ispitne koncentracije u testu LAGDA. Napominje se da se u slučajevima u kojima se mora upotrijebiti otapalo primjerenost otapala (tj. može li ono utjecati na ishod studije) može utvrditi kao dio studije za utvrđivanje raspona.

Ponavljjanja unutar ispitnih skupina i kontrola

26. Treba upotrijebiti najmanje četiri spremnika s ponavljanjem po ispitnoj koncentraciji i najmanje osam ponavljanja za kontrole (i kontrole s otapalom ako su potrebne) (tj. broj ponavljanja u kontroli i kontroli s otapalom treba biti dvostruko veći od broja ponavljanja

svake ispitne skupine kako bi se osigurala odgovarajuća statistička snaga). Svako ponavljanje treba sadržavati najviše 20 životinja. Minimalni broj životinja koje se tretiraju bio bi 15 (pet za uzorak u 62. stadiju NF-a i deset mladih životinja). Međutim, svakom se ponavljanju dodaju dodatne životinje kako bi se uzela u obzir mogućnost smrtnosti i održao kritični broj od 15 životinja.

POSTUPAK

Pregled testa

27. Test započinje tek omriješćenim embrijima (8.–10. stadij NF-a) i nastavlja se razvojem mladih životinja. Životinje se svakodnevno pregledavaju kako bi se uočila smrtnost i bilo kakav znak abnormalnog ponašanja. U 62. stadiju NF-a prikuplja se poduzorak ličinki (do pet životinja po ponavljanju) i ispituju se različite krajnje točke (tablica 1.). Nakon što sve životinje dosegnu 66. stadij NF-a, tj. kraj metamorfoze (ili nakon 70 dana od započinjanja testa, ovisno o tome što je kraće), provodi se nasumično izdvajanje (ali bez uzimanja poduzoraka) kako bi se smanjio broj životinja (deset po spremniku) (vidjeti stavak 43.), a preostale životinje nastavljaju se izlagati do deset tjedana nakon srednjeg vremena do 62. stadija NF-a u kontroli. Na kraju ispitivanja (uzorkovanje mladih životinja) obavljaju se dodatna mjerenja (tablica 1.).

Uvjeti izloženosti

28. Potpuni sažetak ispitnih parametara dostupan je u Dodatku 3. Tijekom razdoblja izlaganja svakodnevno treba mjeriti otopljeni kisik, temperaturu i pH-vrijednost ispitnih otopina. Vodljivost, lužnatost i tvrdoća mjere se jednom mjesečno. Za temperaturu vode ispitnih otopina razlike između ponavljanja i između tretiranja (u jednom danu) ne bi trebale biti veće od 1,0 °C. Isto tako, za pH-vrijednost ispitnih otopina razlike između ponavljanja i između tretiranja ne bi trebale biti veće od 0,5.
29. Nepojedena hrana i otpad mogu se svakodnevno uklanjati iz spremnika za izlaganje s pomoću sifona, pri čemu treba paziti da se izbjegne unakrsna kontaminacija među spremnicima. Treba se paziti da se smanje stres i traume za životinje, osobito tijekom kretanja, čišćenja akvarija i rukovanja. Potrebno je izbjegavati stresne uvjete/aktivnosti kao što su glasna i/ili neprekidna buka, tapkanje po akvariju, vibracije u akvariju.

Trajanje izlaganja ispitivanoj kemikaliji

30. Izlaganje započinje s tek omriješćenim embrijima (8.–10. stadij NF-a) i nastavlja se do deset tjedana nakon srednjeg vremena do 62. stadija NF-a (≤ 45 dana od početka testa) u kontrolnoj skupini. Test LAGDA obično traje 16 tjedana (najviše 17 tjedana).

Početak testa

31. Za roditeljske životinje koje su upotrebljavaju za početak testa prethodno se trebalo dokazati da daju potomke čiji se spol može genetski utvrditi (Dodatak 5.). Nakon mriješćenja odraslih životinja embriji se prikupljaju, tretiraju cisteinom kako bi se uklonio želatinozni omotač te se probiru u pogledu vijabilnosti (23.). Tretiranje cisteinom omogućuje da se embriji ne zalijepe za površinu dok se njima rukuje tijekom probira. Probir se obavlja disekcijskim mikroskopom tako da se neodrživi embriji uklone pipetom odgovarajuće veličine. Poželjno je da se za ispitivanje upotrijebi jedan mrijest čija je vijabilnost veća od 70 %. Embriji u 8.–10. stadiju NF-a nasumično se raspoređuju u spremnike za tretiranje izlaganjem koji sadržavaju odgovarajući volumen vode za razrjeđivanje sve dok svaki spremnik ne sadržava 20 embrija. Embrijima treba pažljivo rukovati tijekom ovog prijenosa kako bi se smanjio stres zbog rukovanja i kako bi se izbjegle ozljede. Punoglavci bi se trebali pomaknuti prema gore u vodenom stupcu i početi prijanjati uz stijenke spremnika 96 sati nakon oplodnje.

Režim hranjenja

32. Promjena hrane i količine hrane tijekom različitih životnih faza vrste *X. laevis* vrlo su važan aspekt protokola za test LAGDA. Pretjerano hranjenje tijekom faze ličinki obično dovodi do učestalije pojave i težeg oblika skolioze (Dodatak 8.) te ga treba izbjegavati. Za razliku od toga, nedovoljno hranjenje tijekom faze ličinki dovodi do vrlo različitih stopa razvoja među kontrolama, što može ugroziti statističku snagu ili dovesti do zbunjujućih rezultata ispitivanja. U Dodatku 4. navodi se preporučena prehrana za ličinke i mlade životinje te režimi hranjenja za vrstu *X. laevis* u protočnim uvjetima, ali dopuštene su i alternative pod uvjetom da je osiguran pravilan rast i razvoj ispitnih organizama. Važno je napomenuti da ako se mjere krajnje točke koje su specifične za endokrini sustav, u hrani ne smije biti endokrinološki aktivnih tvari kao što je sojino brašno.

Hranjenje ličinki

33. Preporučena prehrana ličinki sastoji se od početne hrane za pastrve, tableta od algi *Spirulina* i pahuljica za zlatne ribice (npr. hrana u listićima TetraFin®, Tetra, Njemačka) pomiješanih u vodi za uzgoj kulture (ili za razrjeđivanje). Ta se smjesa primjenjuje tri puta dnevno radnim danom i jednom dnevno vikendom. Punoglavci se hrane i živim ličinkama račića *Artemia* spp. starima 24 sata dvaput dnevno radnim danom i jednom dnevno vikendom, počevši osmog dana nakon oplodnje. Hranjenje ličinki, koje treba biti dosljedno u svim ispitnim posudama, treba omogućiti primjereni rast i razvoj ispitnih životinja kako bi se osigurala obnovljivost i prenosivost rezultata testa: 1. srednje vrijeme do 62. stadija NF-a u kontrolama treba biti ≤ 45 dana i 2. preporučuje se srednja masa u rasponu od $1,0 \pm 0,2$ g u 62. stadiju NF-a u kontrolama.

Hranjenje mladih životinja

34. Kada metamorfoza završi režim hranjenja sastoji se od vrhunske hrane za žabe koja tone, npr. *Sinking Frog Food* -3/32 (Xenopus Express, FL, SAD) (Dodatak 4.). U ranoj fazi mladih žaba peleti se nakratko melju u mlincu za kavu, miješalici ili se gnječe tarionikom i tučkom kako bi se usitnili. Kada mlade žabe narastu dovoljno da bi konzumirale cijele pelete mljevenje ili gnječenje više nije potrebno. Životinje treba hraniti jednom dnevno. Hranjenje mladih žaba treba omogućiti primjereni rast i razvoj organizama: preporučuje se srednja masa u rasponu od $11,5 \pm 3$ g kod kontrolnih mladih žaba na kraju testa.

Analitička kemija

35. Prije početka testa treba utvrditi stabilnost ispitivane kemikalije (npr. topljivost, razgradivost i hlapljivost) i sve potrebne analitičke metode, npr. upotrebom postojećih informacija ili znanja. Kod doziranja u vodi za razrjeđivanje preporučuje se da se ispitne otopine svake koncentracije iz spremnika s ponavljanjem analiziraju prije početka ispitivanja kako bi se provjerilo funkcioniranje sustava. Koncentracije ispitivane kemikalije utvrđuju se u primjerenim razmacima tijekom razdoblja izlaganja, po mogućnosti svakog tjedna za najmanje jedno ponavljanje u svakoj ispitnoj skupini, uz rotaciju ponavljanja iz iste ispitne skupine svakog tjedna. Preporučuje se da se rezultati temelje na izmjerenim koncentracijama. Međutim, ako je tijekom ispitivanja koncentracija ispitivane kemikalije u otopini uspješno održavana unutar 20 % nominalne koncentracije, rezultati se mogu temeljiti na nominalnim ili izmjerenim vrijednostima. Isto tako, koeficijent varijacije (CV) izmjerenih ispitnih koncentracija tijekom cijelog ispitnog razdoblja u tretiranju treba održavati na 20 % ili manje u svakoj koncentraciji. Ako izmjerene koncentracije ne ostanu u rasponu od 80 do 120 % nominalne koncentracije (na primjer, kod ispitivanja vrlo biorazgradivih ili adsorptivnih kemikalija), koncentracije s učinkom treba utvrditi i izraziti u odnosu na aritmetičku sredinu koncentracije za protočna ispitivanja.
36. Brzine protoka vode za razrjeđivanje i glavne otopine treba provjeravati u odgovarajućim intervalima (npr. tri puta tjedno) tijekom cijelog izlaganja. U slučaju kemikalija koje se ne mogu otkriti pri nekim ili svim nominalnim koncentracijama (npr. zbog brze razgradnje ili adsorpcije u ispitnim posudama ili vidne akumulacije kemikalije u tijelima izloženih životinja) preporučuje se da se stopa obnove ispitne otopine u svakoj komori prilagodi tako da se ispitne koncentracije održe što stabilnijima.

Opažanja i mjerenja krajnjih točaka

37. Tijekom izlaganja ocjenjuju se krajnje točke koje ukazuju na toksičnost, uključujući smrtnost, abnormalno ponašanje kao što su klinički znakovi bolesti i/ili opće toksičnosti te utvrđivanja rasta (duljine i mase) te patološke krajnje točke koje mogu reagirati i na opću toksičnost i na endokrine načine djelovanja koji su usmjereni na putove kojima posreduje estrogen, androgen ili hormon štitnjače. Osim toga, po želji se na kraju testa može izmjeriti

i koncentracija VTG-a u plazmi. Mjerenje VTG-a može biti korisno u razumijevanju rezultata studije u kontekstu endokrinih mehanizama kemikalija za koje se sumnja da su endokrino disruptivne. Krajnje točke i vrijeme mjerenja sažeti su u tablici 1.

Tablica 1.: Pregled krajnjih točaka u ispitivanju LAGDA

Krajnje točke*	Svakodnevno	Uzorkovanje u međuvremenu (uzorkovanje ličinki)	Kraj ispitivanja (uzorkovanje mladih životinja)
Smrtnost i abnormalnosti	X		
Vrijeme do 62. stadija NF-a		X	
Histo(pato)logija (štitnjača)		X	
Morfometrija (rast u pogledu mase i duljine)		X	X
Somatski indeks jetre (LSI)			X
Omjeri genetskog/fenotipskog spola			X
Histopatologija (gonade, reproduktivni kanali, bubreg i jetra)			X
Vitelogenin (VTG) (neobavezno)			X

* Sve krajnje točke statistički se analiziraju.

Smrtnost i svakodnevna opažanja

38. Sve ispitne spremnike potrebno je provjeriti svakodnevno radi mrtvih životinja i zabilježiti smrtne slučajeve za svaki spremnik. Mrtve životinje potrebno je ukloniti iz ispitnog spremnika čim se uoče. Razvojni stadij uginulih životinja treba razvrstati kao životinje prije 58. stadija NF-a (prije pojave udova), od 58. stadija NF-a do 62. stadija NF-a, od 63. stadija NF-a do 66. stadija NF-a (od 62. stadija NF-a do potpune resorpcije repa) ili nakon 66. stadija NF-a (nakon faze ličinke). Stope smrtnosti veće od 20 % mogu ukazivati na neprimjerene ispitne uvjete ili očito toksične učinke ispitivane kemikalije. Životinje su obično najosjetljivije na događaje sa smrtnim ishodom koji nisu inducirani kemikalijama tijekom prvih par dana razvoja nakon mriješćenja i tijekom metamorfoznog klimaksa. Takva smrtnost mogla bi biti očita iz kontrolnih podataka.
39. Osim toga, treba evidentirati sva neobična ponašanja, jako izražene malformacije (npr. skoliozu) ili lezije. Treba prebrojati slučajeve opažene skolioze (učestalost) i razvrstati s obzirom na ozbiljnost (npr. nije značajna – NR, minimalna – 1, umjerena – 2, teška – 3; Dodatak 8.). Treba nastojati osigurati da se ograniči učestalost pojave umjerene i teške skolioze (npr. manja od 10 % u kontrolama) tijekom cijele studije, iako veća učestalost pojave abnormalnosti u kontrolama ne bi nužno bila razlog za prekid ispitivanja. Normalno

ponašanje za ličinke karakterizira lebdenje u vodenom stupcu s repom povišenim iznad glave, redovito i ritmičko udaranje repne peraje, redovito izranjanje na površinu, operkulacija i reagiranje na podražaje. Neuobičajena ponašanja uključivala bi npr. plutanje na površini, ležanje na dnu spremnika, obrnuto ili nepravilno plivanje, neizlaženje na površinu i nereagiranje na poticaje. Uz prethodno navedena abnormalna ponašanja, za životinje nakon metamorfoze treba evidentirati i velike razlike u unosu hrane među tretiranjima. Grube malformacije i lezije mogu na primjer uključivati morfološke anomalije (npr. deformacije udova), hemoragijske lezije, abdominalne edeme te bakterijske ili gljivične infekcije. Pojave lezija na glavi mladih životinja, odmah iza nosnica, mogu biti znak nedovoljne vlažnosti. Ta su određivanja kvalitativna i potrebno ih je smatrati srodnim kliničkim znakovima bolesti/stresa i usporediti s kontrolnim životinjama. Ako je stopa učestalosti pojave veća u izloženim spremnicima nego u kontrolnim, tada ih je potrebno smatrati dokazom očite toksičnosti.

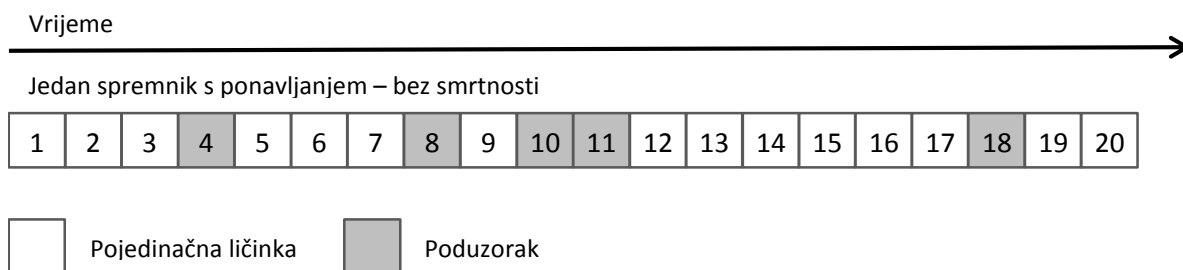
Poduzorkovanje ličinki

Okvir za poduzorkovanje ličinki

40. Punoglavce koji su dosegli 62. stadij NF-a treba ukloniti iz spremnika te uzorkovati ili prenijeti u sljedeći dio izlaganja u novom spremniku ili fizički odvojiti od preostalih punoglavaca u istom spremniku s pomoću pregrade. Punoglavci se svakodnevno pregledavaju i evidentira se dan studije na koji pojedinačni punoglavac dosegne 62. stadij NF-a. U ovoj se procjeni kao odlučujuća karakteristika upotrebljava oblik glave. Kada se glava smanji tako da je vizualno približno jednaka širini trupa i prednjih udova na razini sredine srca smatra se da je jedinka dosegla 62. stadij NF-a.
41. Cilj je uzorkovati ukupno pet punoglavaca u 62. stadiju NF-a po spremniku s ponavljanjem. To bi trebalo provesti potpuno nasumično, ali odluku treba donijeti *a priori*. Hipotetski primjer spremnika s ponavljanjem prikazan je na **slici 1**. Ako u određenom spremniku ima 20 živih punoglavaca kada prva jedinka dosegne 62. stadij NF-a, treba odabrati pet nasumičnih brojeva u rasponu 1–20. Punoglavac br. 1 prva je jedinka koja dosegne 62. stadij NF-a, a punoglavac br. 20 posljednja je jedinka u spremniku koja dosegne 62. stadij NF-a. Isto tako, ako u spremniku ima 18 živih ličinki, treba odabrati pet nasumičnih brojeva u rasponu 1–18. To treba obaviti za svaki spremnik s ponavljanjem kada prva jedinka u ispitivanju dosegne 62. stadij NF-a. Ako tijekom uzorkovanja u 62. stadiju NF-a postoje smrtni slučajevi, preostale uzorke treba ponovno nasumično odabrati na temelju broja preostalih ličinki koje nisu dosegnule 62. stadij NF-a i koliko je uzoraka još potrebno kako bi se dobilo ukupno pet uzoraka iz tog ponavljanja. Na dan na koji punoglavac dosegne 62. stadij NF-a, upućuje se na pripremljenu shemu uzorkovanja kako bi se utvrdilo hoće li se ta jedinka uzorkovati ili fizički odvojiti od ostalih punoglavaca radi daljnjeg izlaganja. U navedenom primjeru (slika 1.) prva jedinka koja je dosegla 62.

stadij NF-a (tj. okvir br. 1) fizički je odvojena od ostalih ličinki i nastavlja se izlagati te se evidentira dan studije na koji je jedinka dosegla 62. stadij NF-a. Nakon toga jedinke br. 2 i 3 tretiraju se na isti način kao i jedinka br. 1 i zatim se jedinka br. 4 uzorkuje za rast i histologiju štitnjače (prema ovom primjeru). Taj se postupak nastavlja dok se 20. jedinka ne pridruži ostalim jedinkama nakon 62. stadija NF-a ili se uzorkuje. Upotrijebljeni postupak nasumičnog odabira mora pružiti svakom organizmu u ispitivanju jednaku vjerojatnost da bude izabran. To se može postići primjenom bilo koje metode nasumičnog odabira, ali potrebno je da svaki punoglavac bude umrežen u nekom trenutku tijekom razdoblja poduzorkovanja u 62. stadiju NF-a.

Slika 1.: Hipotetički primjer režima uzorkovanja u 62. stadiju NF-a za jedan spremnik s ponavljanjem.



42. Za poduzorkovanje ličinki dobivaju se sljedeće krajnje točke: 1. vrijeme do 62. stadija NF-a (tj. broj dana od oplodnje do 62. stadija NF-a); 2. vanjske abnormalnosti; 3. morfometrijski podaci (npr. masa i duljina) te 4. histologija štitnjače.

Humano usmrćivanje punoglavaca

43. Poduzorak punoglavaca u 62. stadiju NF-a (pet jedinki po ponavljanju) treba eutanazirati uranjanjem u odgovarajuću količinu (npr. 500 ml) otopine anestetika (npr. 0,3-postotnu otopinu MS-222, trikain-metansulfonata, CAS.886-86-2) u trajanju od 30 minuta. Otopinu MS-222 treba puferirati natrijevim bikarbonatom kako bi se postigla pH-vrijednost od približno 7,0 jer je nepuferirana otopina MS-222 kisela i nadražuje kožu žabe, što dovodi do slabe apsorpcije i nepotrebnog dodatnog stresa za organizam.
44. Punoglavac se s pomoću mrežice uklanja iz ispitne komore i prenosi (stavlja) u otopinu za eutanaziju. Životinja se pravilno eutanazira i spremna je za nekropsiju kada ne reagira na vanjske podražaje kao što je štipanje stražnjeg uda pincetom.

Morfometrija (masa i duljina)

45. Mjerenje mokre mase (najbliži miligram) i duljine od vrha njuške do kloake (SVL, engl. *snout-to-vent length*) (najbližih 0,1 mm) svakog punoglavca treba obaviti odmah nakon što prestane reagirati zbog djelovanja anestezije (slika 2.a). Za mjerenje SVL-a s fotografije

može se upotrijebiti softver za analizu slike. Punoglavce prije vaganja treba osušiti upijajućim materijalom kako bi se uklonio višak vode. Nakon mjerenja veličine tijela (masa i SVL) treba evidentirati ili zabilježiti sve makromorfološke abnormalnosti i/ili kliničke znakove toksičnosti kao što su skolioza (vidjeti Dodatak 8.), petehije i krvarenje te se preporučuje digitalno dokumentiranje. Napominje se da su petehije mala crvena ili ljubičasta krvarenja kapilara kože.

Prikupljanje i fiksiranje tkiva

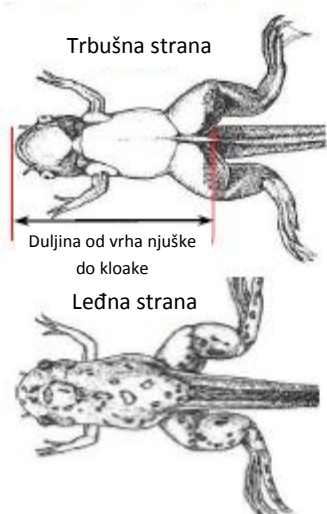
46. Za poduzorak ličinki štitnjače se histološki procjenjuju. Donji dio trupa iza prednjih udova uklanja se i odbacuje. Odrezano truplo fiksira se u Davidsonovu fiksativu. Volumen fiksativa u spremniku treba biti barem deset puta veći od odgovarajućeg volumena tkiva. Treba postići primjereno protresanje ili cirkulaciju fiksativa kako bi se primjereno fiksirala tkiva od interesa. Sva tkiva ostaju u Davidsonovu fiksativu najmanje 48 sati, ali ne dulje od 96 sati, kada se ispiru deioniziranom vodom i pohranjuju u 10-postotnom neutralno puferiranom formalinu (1. i 29.).

Histologija štitnjače

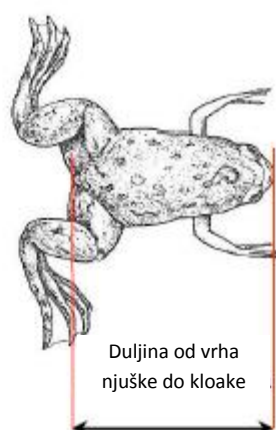
47. Svaki poduzorak ličinki (fiksirana tkiva) histološki se procjenjuje u pogledu štitnjače, tj. utvrđuju se dijagnoza i ocjena ozbiljnosti (29. i 30.).

Slika 2.: Oznake za mjerenje duljine od vrha njuške do kloake u testu LAGDA u 62. stadiju NF-a (a) i u mladih žaba (b). Odlučujuće karakteristike 62. stadija NF-a (a): glava je jednako široka kao i trup, duljina olfaktornog živca manja je od promjera olfaktornog bulbosa (pogled s leđne strane), a prednji udovi u razini su srca (pogled s trbušne strane). Slike prilagođene iz Nieuwkoop i Faber (1994.).

a. Poduzorkovanje ličinki (62. stadij NF-a)



b. Uzorkovanje mladih životinja



Kraj izlaganja ličinki

48. S obzirom na početni broj punoglavaca, očekuje se da će vjerojatno doći do malog postotka jedinki koje se nisu normalno razvile i koje neće dovršiti metamorfozu (66. stadij NF-a) u razumnom roku. Dio izlaganja s ličinkama ne bi trebao biti dulji od 70 dana. Sve punoglavce koji preostanu na kraju tog razdoblja treba eutanazirati (vidjeti stavak 43.), izmjeriti njihovu mokru masu i SVL, odrediti njihov stadij prema Nieuwkoopu i Faberu, 1994., i zabilježiti sve razvojne abnormalnosti.

Izdvajanje nakon 66. stadija NF-a

49. Nakon 66. stadija NF-a (potpuna resorpcija repa) treba zadržati deset jedinki po spremniku do kraja izlaganja. Stoga treba obaviti izdvajanje nakon što sve životinje dosegnu 66. stadij NF-a ili nakon 70 dana (ovisno o tome što nastupi ranije). Životinje koje su prošle 66. stadij NF-a koje se neće nastaviti izlagati treba nasumično odabrati.
50. Životinje koje se ne odaberu za nastavak izlaganja eutanaziraju se (vidjeti stavak 43.). Za svaku se životinju provode mjerenja razvojnog stadija, mokre mase i SVL-a (slika 2.b) te makroskopska nekropsija. Fenotipski spol (na temelju morfologije gonada) bilježi se kao ženski, muški ili neodređen.

Uzorkovanje mladih životinja

Okvir za uzorkovanje mladih životinja

51. Preostale životinje nastavljaju se izlagati do deset tjedana nakon srednjeg vremena do 62. stadija NF-a u kontroli s vodom za razrjeđivanje (i/ili kontroli s otapalom ako je relevantno). Na kraju razdoblja izlaganja preostale se životinje (najviše deset žaba po ponavljanju) eutanaziraju i mjere se različite krajnje točke ili se ocjenjuju i evidentiraju: 1. morfometrijski podaci (masa i duljina); 2. omjeri fenotipskog/genotipskog spola; 3. masa jetre (somatski indeks jetre); 4. histopatologija (gonade, reproduktivni kanali, jetra i bubreg) te po želji 5. VTG u plazmi.

Humano usmrćivanje žaba

52. Uzorci mladih životinja, žabe nakon metamorfoze, eutanaziraju se intraperitonealnom injekcijom anestetika, npr. 10-postotnim MS-222 u odgovarajućoj otopini puferiranoj fosfatnim puferom. Žabe se mogu uzorkovati nakon što prestanu reagirati (obično dvije minute nakon injekcije ako se upotrebljava 10-postotni MS-222 u dozi od 0,01 ml po gramu žabe). Iako bi se mlade žabe mogle uroniti u anestetik više koncentracije (MS-222), iz iskustva je poznato da je potrebno više vremena da se anesteziraju tom metodom i to trajanje možda nije primjereno za omogućivanje uzorkovanja. Injekcija pruža učinkovitu i brzu eutanaziju prije uzorkovanja. Uzorkovanje ne treba započinjati dok se ne potvrdi da žabe ne reagiraju kako bi se osiguralo da su životinje mrtve. Ako žabe pokazuju znakove znatne patnje (vrlo teška patnja i smrt mogu se pouzdano predvidjeti) te se smatra da su na

umoru, životinje treba anestezirati i eutanazirati, a u analizi podataka ih tretirati kao smrtnost. Ako se žaba eutanazira zbog morbiditeta, to treba evidentirati i treba izvijestiti o tome. Žaba se može zadržati radi provedbe histopatološke analize ovisno o tome u kojoj se fazi studije eutanazira (fiksiranje žabe za moguću histopatološku analizu).

Morfometrija (masa i duljina)

53. Mjerenja mokre mase i SVL-a (slika 2.b) ista su kao i ona opisana za poduzorkovanje ličinki.

VTG u plazmi (neobavezno)

54. VTG je naširoko prihvaćeni biomarker koji je posljedica izlaganja estrogenim kemikalijama. U testu LAGDA VTG u plazmi može se po želji mjeriti u uzorcima mladih životinja (to može biti osobito relevantno ako se sumnja da je ispitivana kemikalija estrogen).
55. Režu se stražnji udovi eutanaziranih mladih životinja i uzima se krv s pomoću heparinizirane kapilare (iako mogu biti primjerene i druge metode uzimanja krvi, kao što je punkcija srca). Krv se stavlja u epruvetu za mikrocentrifugu (npr. volumena od 1,5 ml) i centrifugira kako bi se dobila plazma. Uzorke plazme treba pohraniti na temperaturi od – 70 °C ili nižoj do utvrđivanja VTG-a. Koncentracija VTG-a u plazmi može se izmjeriti metodom imunoenzimskog testa (ELISA) (Dodatak 6.) ili drugom metodom kao što je masena spektrometrija (31.). Prednost se daje protutijelima specifičnima za vrstu zbog veće osjetljivosti.

Određivanje genetskog spola

56. Genetski spol svake mlade žabe ocjenjuje se na temelju markera koje su razvili Yoshimoto i dr.(11.). Kako bi se utvrdio genetski spol, dio jednog stražnjeg uda ili cijeli ud (ili bilo koje drugo tkivo) koji je uklonjen tijekom seciranja prikuplja se i pohranjuje u epruveti za mikrocentrifugu (uzorci tkiva žaba mogu se dobiti iz bilo kojeg tkiva). Tkivo se može pohraniti na temperaturi od – 20 °C ili nižoj do izoliranja deoksiribonukleinske kiseline (DNK). Izoliranje DNK-a iz tkiva može se obaviti komercijalno dostupnim priborom za ispitivanje, a analiza u kojoj se utvrđuje prisustvo ili odsustvo markera obavlja se primjenom metode lančane reakcije polimerazom (PCR) (Dodatak 5.). Usklađenost histološkog spola i genotipa kod kontrolnih životinja u trenutku uzorkovanja mladih životinja u kontrolnim skupinama općenito je veća od 95 %.

Prikupljanje i fiksiranje tkiva za histopatologiju

57. Tijekom konačnog uzorkovanja prikupljaju se gonade, reproduktivni kanali, jetra i bubrezi radi histološke analize. Otvara se trbušna šupljina te se disecira i važe jetra. Zatim se probavni organi (npr. želudac, crijeva) pažljivo uklanjaju iz donjeg abdomena kako bi se

otkrile gonade, bubrezi i reproduktivni kanali. Treba zabilježiti sve morfološke abnormalnosti gonada. Naposljetku, treba ukloniti stražnje udove ako već nisu prethodno uklonjeni radi uzimanja krvi. Prikupljene jetre i truplo u kojem su gonade ostavljene *in situ* treba odmah staviti u Davidsonov fiksativ. Volumen fiksativa u spremniku treba biti barem deset puta veći od odgovarajućeg volumena tkiva. Sva tkiva ostaju u Davidsonovu fiksativu najmanje 48 sati, ali ne dulje od 96 sati, kada se ispiru deioniziranom vodom i pohranjuju u 10-postotnom neutralnom puferiranom formalinu (1. i 29.).

Histopatologija

58. Svaki uzorak mladih životinja histološki se ocjenjuje u pogledu patologije u tkivu gonada, reproduktivnih kanala, bubrega i jetre, tj. daje se dijagnoza i ocjena ozbiljnosti (32.). Iz te se ocjene izvodi i fenotip gonada (npr. jajnici, testisi, interseksualne) i, zajedno s pojedinačnim mjerenjima genetskog spola, ta se opažanja mogu upotrijebiti za izračun omjera fenotipskog/genotipskog spola.

DOSTAVLJANJE PODATAKA

Statistička analiza

59. U testu LAGDA nastaju tri oblika podataka koji se statistički analiziraju: 1. kvantitativni kontinuirani podaci (masa, SVL, LSI, VTG); 2. podaci o vremenu do određenog događaja za stope razvoja (tj. dani od početka testa do 62. stadija NF-a) i 3. ordinalni podaci u obliku ocjena ozbiljnosti ili razvojnih stadija iz histopatoloških ocjena.
60. Preporučuje se da plan ispitivanja i odabir statističkog testa omoguće odgovarajuću snagu za otkrivanje promjena od biološke važnosti na krajnjim točkama na kojima se izvješćuje o vrijednosti NOEC ili ECx. Statističke analize podataka (općenito na temelju srednje vrijednosti ponavljanja) trebale bi po mogućnosti poštovati postupke opisane u dokumentu Sadašnji pristupi u statističkoj analizi podataka o ekotoksičnosti: Smjernice za primjenu (33.). U Dodatku 7. ovoj ispitnoj metodi navedeni su shema odlučivanja preporučene statističke analize i smjernice za obradu podataka i odabir najprimjerenijeg statističkog testa ili modela za upotrebu u testu LAGDA.
61. Podatke iz uzorkovanja mladih životinja (npr. rast, LSI) treba analizirati zasebno za svaki genotipski spol jer se genotipski spol utvrđuje za sve žabe.

Razmatranja o analizi podataka

Upotreba kompromitiranih ponavljanja i tretiranja

62. Ponavljanja mogu postati kompromitirana zbog prevelike smrtnosti uzrokovane očitom toksičnošću, bolešću ili tehničkom pogreškom. Ako je tretiranje kompromitirano zbog bolesti ili tehničke pogreške, za analizu trebaju biti dostupna tri nekompromitirana

tretiranja s tri nekompromitirana ponavljanja. Ako u tretiranjima s visokim koncentracijama dođe do očite toksičnosti, poželjno je da za analizu budu dostupne najmanje tri razine tretiranja s tri nekompromitirana ponavljanja (u skladu s pristupom najviše prihvatljive koncentracije za smjernice OECD-a za ispitivanje (34.)). Uz smrtnost, znakovi očite toksičnosti mogu uključivati učinke na ponašanje (npr. plutanje na površini, ležanje na dnu spremnika, obrnuto ili nepravilno plivanje, neizlaženje na površinu), morfološke lezije (npr. hemoragijske lezije, abdominalne edeme) ili inhibiciju normalnih odgovora na hranjenje u kvalitativnoj usporedbi s kontrolnim životinjama.

Kontrola s otapalom

63. Na kraju ispitivanja treba procijeniti moguće utjecaje otapala (ako se upotrebljava). To se radi statističkom usporedbom kontrolne skupine s otapalom i kontrolne skupine s vodom za razrjeđivanje. Najrelevantnije krajnje točke koje treba razmotriti u toj analizi determinante su rasta (masa i duljina) jer na njih mogu utjecati opće toksičnosti. Ako se na tim krajnjim točkama otkriju znatne razlike između kontrolnih skupina s vodom za razrjeđivanje i s otapalom, treba primijeniti stručnu prosudbu kako bi se utvrdilo je li narušena valjanost ispitivanja. Ako se dvije kontrole razlikuju, tretiranja izložena kemikaliji treba usporediti s kontrolom s otapalom osim ako je poznato da se prednost daje kontroli s vodom za razrjeđivanje. Ako nema statistički značajne razlike između dviju kontrolnih skupina, preporučuje se da se tretiranja izložena ispitivanoj kemikaliji usporede s objedinjenim kontrolama (kontrolne skupine s otapalom i s vodom za razrjeđivanje), osim ako je poznato da se prednost daje samo kontroli s vodom za razrjeđivanje ili kontroli s otapalom.

Izvješće o ispitivanju

64. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija:

- fizikalno stanje i po potrebi fizikalno-kemijska svojstva,
- Tvar s jednim sastojkom:
 - fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
 - kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd. (uključujući udio organskog ugljika, prema potrebi).
- Tvar s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka.

Ispitne vrste:

- znanstveni naziv, soj ako je dostupno, podrijetlo, metoda sakupljanja oplodjenih jajašaca i kasnije postupanje,
- učestalost pojave skolioze u prijašnjim kontrolama za matičnu kulturu koja se upotrebljava.

Ispitni uvjeti:

- fotoperiodi,
- plan ispitivanja (npr. veličina komore, materijal i volumen vode, broj ispitnih komora i ponavljanja, broj ispitnih organizama po ponavljanju),
- način pripreme glavnih otopina i učestalost obnavljanja (ako se koristi sredstvo za otapanje, trebalo bi ga navesti zajedno s koncentracijom),
- metoda doziranja ispitivane kemikalije (npr. crpkama, sustavima za razrjeđivanje),
- iskoristivost metode i nazivnih ispitnih koncentracija, granica kvantifikacije, srednje izmjerene vrijednosti i njihove standardne devijacije u ispitnim posudama te metoda kojom su one dobivene i dokazi da se izmjerene vrijednosti odnose na koncentracije ispitivane kemikalije u stvarnoj otopini,
- svojstva vode za razrjeđivanje: pH, tvrdoća, temperatura, koncentracija otopljenog kisika, rezidualni klor (ako se mjeri), ukupni jod, ukupni organski ugljik (ako se mjeri), suspendirana kruta tvar (ako se mjeri), salinitet ispitnog medija (ako se mjeri) i ostala provedena mjerenja,
- nazivne ispitne koncentracije, srednje izmjerene vrijednosti i njihove standardne devijacije,
- kakvoća vode u ispitnim posudama, pH, temperatura (dnevno) i koncentracija otopljenog kisika,
- detaljne informacije o hranjenju (npr. vrsta hrane, izvor, količina hrane i učestalost hranjenja).

Rezultati:

- dokazi o usklađenosti kontrola s kriterijima valjanosti,
- sljedeći podaci za kontrolu (i kontrolu s otapalom ako se koristi) i ispitne skupine: uočena smrtnost i abnormalnosti, vrijeme do 62. stadija NF-a, histološka procjena štitnjače (samo

kod uzorka ličinki), rast (masa i duljina), LSI (samo kod uzorka mladih životinja), omjeri genetskog/fenotipskog spola (samo kod uzorka mladih životinja), rezultati histopatološke procjene za gonade, reproduktivne kanale, bubreg i jetru (samo kod uzorka mladih životinja) te VTG u plazmi (samo kod uzorka mladih životinja ako se provodi),

- pristup za statističku analizu i obradu podataka (primijenjeni statistički test ili model),
- najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC) za svaki ocijenjeni odgovor,
- najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC) za svaki ocijenjeni odgovor (pri $\alpha = 0,05$); ECx za svaki ocijenjeni odgovor, ako je primjenjivo, te intervali pouzdanosti (npr. 95 %) i graf prilagođenog modela primijenjenog za izračun vrijednosti ECx, nagib krivulje koncentracija – odgovor, formula regresijskog modela, procijenjeni parametri modela i njihove standardne pogreške,
- sva odstupanja od ispitne metode i odstupanja od kriterija prihvatljivosti te razmatranja potencijalnih posljedica na ishod ispitivanja.

65. Za rezultate mjerenja krajnjih točaka treba prikazati srednje vrijednosti i njihove standardne devijacije (ako je moguće, i na temelju ponavljanja i koncentracija).

66. Srednje vrijeme do 62. stadija NF-a u kontrolama treba izračunati i prikazati kao srednju vrijednost medijana ponavljanja i njihovu standardnu devijaciju. Isto tako, za tretiranja treba izračunati medijan tretiranja i prikazati ga kao srednju vrijednost medijana ponavljanja i njihovu standardnu devijaciju.

LITERATURA

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

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

23. ASTM (2004.). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 – 98, Philadelphia, PA, SAD.
24. Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84. str.
25. Poglavlje C.38. ovog Priloga, Analiza metamorfoze vodozemaca.
26. Poglavlje C.48. ovog Priloga, Kratkoročni reproduksijski test na ribama.
27. Poglavlje C.41. ovog Priloga, Ispitivanje spolnog razvoja riba.
28. Poglavlje C.49. ovog Priloga, Ispitivanje akutne toksičnosti na ribljim embrijima.
29. OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
30. Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415.–424.
31. Luna LG and Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.
32. OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
33. OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
34. Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197.–202.

Dodatak 1.**DEFINICIJE**

Apikalna krajnja točka: uzrokuje učinke na razini populacije.

Kemikalija: tvar ili smjesa.

ELISA: imunoenzimski test (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

EC_x: (koncentracija s x-postotnim učinkom) koncentracija je koja u određenom razdoblju izlaganja izaziva x-postotni učinak na ispitne organizme u usporedbi s kontrolom. Na primjer, EC₅₀ je koncentracija za koju se procjenjuje da stvara učinak na krajnju točku ispitivanja u 50 % izložene populacije tijekom određenog razdoblja izlaganja.

dpf: dana nakon oplodnje.

Protočno ispitivanje: ispitivanje sa stalnim protokom ispitne otopine kroz ispitni sustav za vrijeme izlaganja.

Os HPG: os hipotalamus-hipofiza-gonade.

IUPAC: Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju.

Najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC) najniža je ispitana koncentracija ispitivane kemikalije kod koje je uočen statistički značajan učinak kemikalije (pri $p < 0,05$) u usporedbi s kontrolom. Međutim, sve ispitne koncentracije iznad LOEC-a trebale bi imati jednak ili veći štetan učinak od onoga koji je uočen pri LOEC-u. Ako se ne mogu ispuniti ta dva uvjeta, trebalo bi navesti detaljno objašnjenje za odabir LOEC-a (a time i NOEC-a). Smjernice se nalaze u dodatku 7.

Medijan smrtonosne koncentracije (LC₅₀): koncentracija ispitivane kemikalije koja je procijenjena kao smrtonosna za 50 % ispitnih organizama za vrijeme ispitivanja.

Najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC) ispitna je koncentracija neposredno ispod LOEC-a koja unutar navedenog razdoblja izlaganja nema statistički značajan učinak ($p < 0,05$) u usporedbi s kontrolom.

SMILES: *Simplified Molecular Input Line Entry Specification*.

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

UVCB: tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi ili biološki materijali.

VTG: vitelogenin je fosfolipoglikoproteinski prekursor proteina žumanjka koji je u pravilu

prisutan u spolno aktivnih ženki svih vrsta koje liježu jaja.

Dodatak 2.**NEKA KEMIJSKA SVOJSTVA PRIHVATLJIVE VODE ZA RAZRJEDIVANJE**

Tvar	Granična koncentracija
Lebdeće čestice	5 mg/l
Ukupni organski ugljik	2 mg/l
Neionizirani amonijak	1 µg/l
Rezidualni klor	10 µg/l
Ukupni organofosforni pesticidi	50 ng/l
Ukupni organoklorni pesticidi plus poliklorirani bifenili	50 ng/l
Ukupni organski klor	25 ng/l
Aluminij	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Krom	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Bakar	1 µg/l
Željezo	1 µg/l
Olovo	1 µg/l
Nikal	1 µg/l
Cink	1 µg/l
Kadmij	100 ng/l
Živa	100 ng/l
Srebro	100 ng/l

Dodatak 3.**ISPITNI UVJETI ZA TEST LAGDA**

1. Ispitna vrsta	<i>Xenopus laevis</i>
2. Vrsta ispitivanja	Kontinuirano protočno
3. Temperatura vode	Nominalna temperatura iznosi 21 °C. Srednja temperatura tijekom ispitivanja iznosi 21 ± 1 °C (razlike između ponavljanja i između tretiranja ne bi trebale biti veće od 1,0 °C).
4. Kvaliteta osvjetljenja	Fluorescentne žarulje (široki spektar i) od 600 do 2 000 lux (lumeni/m ²) na površini vode
5. Fotoperiod	12 sati svjetla, 12 sati tame
6. Volumen ispitne otopine i ispitna posuda (spremnik)	4–10 l (najmanja dubina vode od 10 do 15 cm) Spremnik od stakla ili nehrđajućeg čelika
7. Izmjene volumena ispitnih otopina	Konstantne, uzimajući u obzir i održavanje bioloških uvjeta i izlaganje kemikalijama (npr. pet obnavljanja volumena spremnika dnevno)
8. Starost ispitnih organizama na početku	8.–10. stadij prema Nieuwkoopu i Faberu (NF)
9. Broj organizama po ponavljanju	20 životinja (embrija) po spremniku (ponavljanju) na početku izlaganja i deset životinja (mladih životinja) po spremniku (ponavljanju) nakon 66. stadija NF-a do kraja izlaganja
10. Broj tretiranja	Najmanje četiri tretiranja ispitivanom kemikalijom i odgovarajuće kontrole
11. Broj ponavljanja po tretiranju	Četiri ponavljanja po tretiranju za ispitivanu kemikaliju i osam ponavljanja za kontrole
12. Broj organizama po ispitnoj koncentraciji	Najmanje 80 životinja po tretiranju za ispitivanu kemikaliju i najmanje 160 ponavljanja za kontrole
13. Voda za razrjeđivanje	Bilo koja voda koja omogućuje normalan rast i razvoj vrste <i>X. laevis</i> (npr. izvorska voda ili voda iz slavine filtrirana ugljenom)
14. Dozračivanje	Nije potrebno, ali dozračivanje spremnika može biti potrebno ako razina otopljenog kisika padne ispod preporučenih granica i maksimalno se poveća protok ispitne otopine.
15. Otopljeni kisik ispitne otopine	Otopljeni kisik: ≥ 40 % vrijednosti zasićenosti kisikom ili $\geq 3,5$ mg/l

16. pH ispitne otopine	6,5–8,5 (razlike između ponavljanja/između tretiranja ne smiju biti veće od 0,5)
17. Tvrdća i lužnatost ispitne otopine	10–250 mg CaCO ₃ /l
18. Režim hranjenja	(Vidjeti Dodatak 4.)
19. Razdoblje izlaganja	Od 8.–10. stadija NF-a do deset tjedana nakon srednjeg vremena do 62. stadija NF-a u kontrolnoj skupini s vodom i/ili otapalom (najviše 17 tjedana)
20. Biološke krajnje točke	Smrtnost (i abnormalne pojave), vrijeme do 62. stadija NF-a (uzorak ličinki), histološka procjena štitnjače (uzorak ličinki), rast (masa i duljina), somatski indeks jetre (uzorak mladih životinja), omjeri genetskog/fenotipskog spola (uzorak mladih životinja), histopatologija za gonade, reproduktivne kanale, bubreg i jetru (uzorak mladih životinja) te vitelogenin u plazmi (uzorak mladih životinja, neobavezno)
21. Kriteriji valjanosti ispitivanja	Otopljeni kisik trebao bi biti > 40 % vrijednosti zasićenosti kisikom; srednja temperatura vode treba biti u rasponu od 21 ± 1 °C i razlike između ponavljanja i između tretiranja trebale bi biti < 1,0 °C; pH ispitne otopine treba biti u rasponu od 6,5 do 8,5; smrtnost u kontrolama treba biti ≤ 20 % u svakom ponavljanju i srednje vrijeme do 62. stadija NF-a u kontroli treba biti ≤ 45 dana; srednja masa ispitnih organizama u 62. stadiju NF-a i na kraju testa treba dosegnuti $1,0 \pm 0,2$ g u kontrolama i $11,5 \pm 3$ g u kontrolama s otapalom (ako se upotrebljavaju); trebali bi postojati dokazi da su se koncentracije ispitivane kemikalije u otopini uspješno održavale u rasponu od ± 20 % srednjih izmjerenih vrijednosti.

Dodatak 4.**REŽIM HRANJENJA**

Treba napomenuti da, iako se preporučuje upotreba ovog režima hranjenja, dopuštene su i alternative pod uvjetom da ispitni organizmi rastu i razvijaju se primjerenom brzinom.

Hranjenje ličinki*Priprema za prehranu ličinki*

- A. 1 : 1 (v/v) početna hrana za pastrve: alge/TetraFin® (ili ekvivalentno)
- Početna hrana za pastrve: miješati 50 g početne hrane za pastrve (fine granule ili prah) i 300 ml primjerene filtrirane vode 20 sekundi na visokoj postavci miješalice
 - Smjesa alge/TetraFin® (ili ekvivalentno): miješati 12 g tableta od algi spirulina i 500 ml filtrirane vode na visokoj postavci miješalice 40 sekundi, miješati 12 g hrane Tetrafin® (ili ekvivalentno) s 500 ml filtrirane vode i zatim pomiješati te dvije smjese kako bi se dobila jedna litra smjese koja sadržava 12 g/l algi spirulina i 12 g/l hrane Tetrafin® (ili ekvivalentno)
 - Kombinirati jednake volumene izmiješane početne hrane za pastrve i algi/hrane TetraFin® (ili ekvivalentno)
- B. Račići Artemia

15 ml jajašaca račića Artemia valj se u 1 l slane vode (pripremljene dodavanjem 20 ml NaCl jednoj litri deionizirane vode). Račići se prikupljaju nakon dozračivanja u trajanju od 24 sata na sobnoj temperaturi i uz stalnu izloženost svjetlosti. Račići se ostavljaju da se slegnu tijekom 30 minuta zaustavljanjem dozračivanja. Ciste koje isplivaju na površinu kanistra izlijevaju se i odbacuju te se račići lijevaju kroz odgovarajuće filtre tako da se dobije 30 ml s filtriranom vodom.

Protokol hranjenja

U tablici 1. nalazi se upućivanje na vrstu i količinu hrane koja se upotrebljava tijekom izlaganja u stadijima ličinke. Životinje treba hraniti tri puta dnevno od ponedjeljka do petka i jednom dnevno vikendom.

Tablica 1.: Režim hranjenja ličinki *X. laevis* u protočnim uvjetima

Vrijeme* (nakon oplodnje)	Početna hrana za pastrve: alge/TetraFin® (ili ekvivalentno)		Račići Artemia	
	Radni dan (3 puta dnevno)	Vikend (jednom dnevno)	Radni dan (dvaput dnevno)	Vikend (jednom dnevno)
Dani 4.–14. (u tjednima 0.–1.)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (od 8. do 15. dana)	0,5 ml (od 8. do 15. dana)

Drugi tjedan	0,67 ml	2,4 ml	1 ml (od 16. dana)	1 ml (od 16. dana)
Treći tjedan	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Četvrti tjedan	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Peti tjedan	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
Šesti tjedan	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Sedmi tjedan	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Tjedni 8.–10.	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

* Nulti dan definira se kao dan ubrizgavanja hCG-a.

Prelazak s prehrane za ličinke na prehranu za mlade životinje

Kako se završava metamorfoza ličinki, prelazi se na formulaciju prehrane za mlade životinje koja je objašnjena u nastavku. Tijekom tog prelaska treba se smanjivati hrana za ličinke i povećavati hrana za mlade životinje. To se može postići proporcionalnim smanjivanjem hrane za ličinke i proporcionalnim povećavanjem hrane za mlade životinje kako svaka skupina od pet punoglavaca prelazi 62. stadij NF-a i približava se dovršetku metamorfoze u 66. stadiju NF-a.

Hranjenje mladih životinja

Prehrana mladih životinja

Kada metamorfoza završi (66. stadij) režim hranjenja mijenja se tako da se upotrebljava samo vrhunska hrana za žabe koja tone od 3/32 inča, (Xenopus Express™, FL, SAD) ili ekvivalentna hrana.

Priprema drobljenih peleta za prelazak iz stadija ličinke u stadij mlade životinje

Peleti hrane za žabe koja tone nakratko se melju u mlincu za kavu, miješalici ili tarionikom i tučkom kako bi se smanjili za približno 1/3. Preduga obrada dovodi do nastanka praha i ne preporučuje se.

Protokol hranjenja

U **tablici 2.** nalazi se upućivanje na vrstu i količinu hrane koja se upotrebljava tijekom životnih stadija mladih i odraslih životinja. Životinje treba hraniti jednom dnevno. Treba napomenuti da, kako životinje prolaze kroz metamorfozu, nastavlja im se davati porcija račića Artemia dok više od 95 % životinja ne prođe kroz metamorfozu.

Životinje ne treba hraniti na dan završetka ispitivanja tako da hrana ne poremeti mjerenja mase.

Tablica 2.: Režim hranjenja mladih životinja *X. laevis* u protočnim uvjetima. Treba napomenuti da životinje koje ne prođu kroz metamorfozu, uključujući one čija je metamorfoza odgođena tretiranjem kemikalijom, ne mogu jesti pelete koji nisu razdrobljeni.

Vrijeme (Tjedni nakon srednjeg datuma metamorfoze)	Volumen drobljenih peleta (mg po mladoj žabi)	Volumen cijelih peleta (mg po mladoj žabi)
Po završetku metamorfoze životinja	25	0
Tjedni 0.–1.	25	28
Tjedni 2.–3.	0	110
Tjedni 4.–5.	0	165
Tjedni 6.–9.	0	220

* Prvi dan nultog tjedna srednji je datum metamorfoze kod kontrolnih životinja.

Dodatak 5.**ODREĐIVANJE GENETSKOG SPOLA**

Metoda genetskog određivanja spola za vrstu *Xenopus laevis* temelji se na publikaciji Yoshimoto i dr., 2008. Podroban opis postupaka genotipizacije po potrebi se može pronaći u toj publikaciji. Mogu se upotrijebiti alternativne metode (npr. qPCR velike propusnosti) ako se to smatra primjerenim.

Početnice za vrstu *X. laevis**Marker za DM-W*

Uzvodna: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Nizvodna: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Pozitivna kontrola

Uzvodna: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Nizvodna: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Pročišćavanje DNK-a

Treba pročistiti DNK iz mišićnog tkiva ili tkiva kože upotrebom, na primjer, kompleta za krv i tkiva Qiagen DNeasy (kat. br. 69506) ili sličnog proizvoda u skladu s uputama za komplet. DNK se može eluirati iz kolona za pročišćavanje upotrebom manje količine pufera kako bi se dobili uzorci veće koncentracije ako se to smatra potrebnim za PCR. Napominje se da je DNK prilično stabilan pa treba paziti da se izbjegne unakrsna kontaminacija koja bi mogla dovesti do pogrešne karakterizacije mužjaka kao ženki ili obrnuto.

PCR

Uzorak protokola u kojem se upotrebljava JumpStart™ Taq proizvođača Sigma opisan je u **tablici 1.**

Tablica 1.: Uzorak protokola u kojem se upotrebljava JumpStart™ Taq proizvođača Sigma

Glavna mješavina	1x (μl)	[Konačno]
NFW	11	–
10X pufer	2,0	–

MgCl ₂ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP-i (10 mM za svaki)	0,4	200 µM
Marker (8 µM) uzvodne početnice	0,8	0,3 µM
Marker (8 µM) nizvodne početnice	0,8	0,3 µM
Kontrola (8 µM) uzvodne početnice	0,8	0,3 µM
Kontrola (8 µM) nizvodne početnice	0,8	0,3 µM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 jedinica/µl
Kalup DNK-a	1,0	~ 200 pg/µl

Napomena: kod pripreme glavnih mješavina treba pripremiti više nego što je potrebno kako bi se uzeo u obzir gubitak do kojeg može doći tijekom pipetiranja (na primjer: 25x treba upotrebljavati za samo 24 reakcije).

Reakcija:

Glavna mješavina 19,0 µl

Kalup 1,0 µl

Ukupno 20,0 µl

Profil uređaja za PCR:

Korak 1. 94 °C 1 min

Korak 2. 94 °C 30 s

Korak 3. 60 °C 30 s

Korak 4. 72 °C 1 min

Korak 5. Idi na korak 2. 35 ciklusa

Korak 6. 72 °C 1 min

Korak 7. 4 °C zadržati

Produkti PCR-a mogu se odmah razdvojiti u gelu ili pohraniti na temperaturi od 4 °C.

Elektroforeza u agaroznom gelu (3 %) (uzorak protokola)

50X TAE

Tris 24,2 g
Ledena octena kiselina 5,71 ml
Na₂ (EDTA)·2H₂O 3,72 g
Dodati vodu do 100 ml

1X TAE

H₂O 392 ml
50X TAE 8 ml

Agaroza u omjeru 3 : 1

3 dijela agaroze NuSieve™ GTG™
1 dio agaroze niske elektroendoosmoze proizvođača Fisher (EEO)

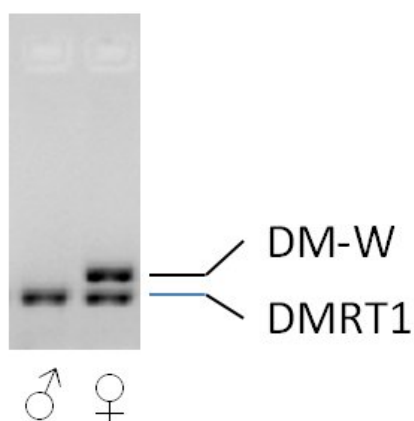
Metoda

1. Pripremiti 3-postotni gel dodavanjem 1,2 g mješavine agaroze u 43 ml 1X TAE. Promiješati kako bi se odvojile velike grude.
2. Tretirati smjesu agaroze mikrovalovima dok se potpuno ne otopi (izbjegavati vrenje). Pustiti da se malo ohladi.
3. Dodati 1,0 µl etidijeva bromida (10 mg/ml). Promiješati tikvicu. Napominje se da je etidijev bromid mutagen pa bi, u mjeri u kojoj je to tehnički izvedivo, za ovaj korak trebalo upotrijebiti alternativne kemikalije kako bi se smanjili zdravstveni rizici za radnike¹.
4. Ulići gel u kalup s češljem. Potpuno ohladiti.
5. Dodati gel u uređaj. Prekriti gel s 1X TAE.
6. Dodati 1 µl 6x boje za nanošenje u svakih 10 µl produkta PCR-a.
7. Pipetirati uzorke u jažice.
8. Razdvajati ~ 20 minuta na stalnih 160 volta.

¹ U skladu s člankom 4. stavkom 1. Direktive 2004/37/EZ Europskog parlamenta i Vijeća od 29. travnja 2004. o zaštiti radnika od rizika zbog izloženosti karcinogenim ili mutagenim tvarima na radu (šesta pojedinačna direktiva u smislu članka 16. stavka 1. Direktive Vijeća 89/391/EEZ) (SL L 158, 30.4.2004., str. 50.).

Slika agaroznog gela koja prikazuje uzorke vrpce koji ukazuju na muške i ženske jedinke nalazi se na **slici 1**.

Slika 1.: Slika agaroznog gela koja prikazuje uzorak vrpce koji ukazuje na mušku (♂) jedinku (jednostruka vrpca ~ 203 bp: DMRT1) i žensku (♀) jedinku (dvostruke vrpce pri ~ 259 bp: DM-W i 203 bp: DMRT1).



LITERATURA

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

Dodatak 6.**MJERENJE VITELOGENINA**

Vitelogenin (VTG) mjeri se upotrebom metode imunoenzimskog testa (ELISA) koji je izvorno razvijen za VTG debeloglave gavčice (Parks i dr., 1999.). Trenutačno ne postoje komercijalno dostupna protutijela za vrstu *X. laevis*. Međutim, s obzirom na veliku količinu informacija za taj protein i dostupnost isplativih komercijalnih usluga za proizvodnju protutijela, razumno je za očekivati da laboratoriji mogu jednostavno razviti test ELISA za to mjerenje (Olmstead i dr., 2009.). Olmstead i dr. (2009.) navode i opis testa izmijenjenog za VTG kod vrste *X. tropicalis*, kako je prikazano u nastavku. U metodi se upotrebljava protutijelo za VTG vrste *X. tropicalis*, ali poznato je da funkcionira i za VTG vrste *X. laevis*. Treba napomenuti da se mogu upotrebljavati i nekonkurentni testovi ELISA i da oni mogu imati niže granice otkrivanja od metode opisane u nastavku.

Materijali i reagensi

- Unaprijed adsorbirani serum 1. protutijela (Ab)

Pomiješati jedan dio seruma 1. protutijela anti-*X. tropicalis* VTG s dva dijela kontrolne plazme mužjaka i ostaviti na sobnoj temperaturi na ~ 75 minuta, staviti na led 30 min, centrifugirati > 20K x G jedan sat na 4 °C, ukloniti supernatant, alikvotirati, pohraniti na – 20 °C.

- 2. protutijelo

Kozji anti-zečji IgG-HRP konjugat (npr. Bio-Rad 172-1019)

- Standard VTG-a

pročišćeni VTG vrste *X. laevis* od 3,3 mg/ml.

- TMB (3,3',5,5'-tetrametil-benzidin) (npr. KPL 50-76-00 ili Sigma T0440)
- Obični kozji serum (NGS) (npr. Chemicon® S26 – 100 ml)
- EIA polistirenske mikrotitracijske ploče s 96 jažica (npr. ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher: 07-200-35)
- Hibridizacijska peć temperature 37 °C (ili zračni inkubatori za brzo uravnoteživanje) za ploče, vodena kupelj za epruvete
- Ostala uobičajena laboratorijska oprema, kemikalije i zalihe

Recepti

Premazni pufer (50 mM karbonatni pufer, pH 9,6):

NaHCO₃ 1,26 g

Na ₂ CO ₃	0,68 g
voda	428 ml

10X PBS (0,1 M fosfata, 1,5 M NaCl):

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

Pufer za ispiranje (PBST):

10X PBS	100 ml
voda	900 ml

Prilagoditi pH-vrijednost na 7,3 s 1 M HCl, zatim dodati 0,5 ml kemikalije Tween-20

Testni pufer:

Obični kozji serum (NGS)	3,75 ml
Pufer za ispiranje	146,25 ml

Prikupljanje uzoraka

Krv se uzima s pomoću heparinizirane mikrohematokritske kapilarne cjevčice i stavlja na led. Nakon tri minute centrifugiranja cjevčica se ocjenjuje, otvara i plazma se stavlja u epruvete za mikrocentrifugu od 0,6 ml koje sadržavaju 0,13 jedinica liofiliziranog aprotinina (te se epruvete unaprijed pripremaju dodavanjem odgovarajuće količine aprotinina, zamrzavanjem i liofiliziranjem u vakuumskoj centrifugi na niskoj toplini dok se ne osuše). Plazma se sprema na temperaturi od – 80 °C dok se ne analizira.

Postupak za jednu ploču

Premazivanje ploče

Pomiješati 20 µl pročišćenog VTG-a s 22 ml karbonatnog pufera (konačna koncentracija od 3 µg/ml). Dodati 200 µl u svaku jažicu ploče s 96 jažica. Prekriti ploču ljepljivim filmom za zatvaranje i pustiti da se inkubira preko noći na 37 °C u trajanju od dva sata (ili 4 °C preko noći).

Blokiranje ploče

Otopina za blokiranje priprema se dodavanjem 2 ml običnog kozjeg seruma (NGS) u 38 ml pufera karbonata. Ukloniti otopinu premaza i osušiti protresanjem. Dodati 350 μ l otopine za blokiranje u svaku jažicu. Prekriti ljepljivim filmom za zatvaranje i inkubirati na 37 °C u trajanju od dva sata (ili 4 °C preko noći).

Priprema standarda

Miješa se 5,8 μ l pročišćenog standarda VTG-a s 1,5 ml testnog pufera u jednokratnoj epruveti od borosilikatnog stakla dimenzija 12 x 75 mm. Tako se dobiva 12 760 ng/ml. Zatim se provodi serijsko razrjeđivanje dodavanjem 750 μ l prethodnog razrjeđenja u 750 μ l testnog pufera kako bi se dobile konačne koncentracije od 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 i 50 ng/ml.

Priprema uzoraka

Početi s razrjeđivanjem plazme u testnom puferu u omjeru 1 : 300 (npr. kombinirati 1 μ l plazme s 299 μ l testnog pufera) ili 1 : 30. Ako se očekuje velika količina VTG-a mogu biti potrebna dodatna ili veća razrjeđenja. B/B₀ treba nastojati održati u rasponu standarda. Za uzorke bez znatnog VTG-a, npr. kontrolni mužjaci i ženke (svi su nezreli), upotrijebiti razrjeđivanje 1 : 30. Slabije razrijeđeni uzorci mogu pokazati neželjene učinke matrice.

Osim toga, preporučuje se provođenje pozitivnog kontrolnog uzorka na svakoj ploči. On se uzima iz zalihe plazme koja sadržava vrlo inducirane razine VTG-a. Zaliha se prvo razrjeđuje u NGS-u, dijeli u alikvote i pohranjuje na temperaturi od – 80 °C. Alikvot se odmrzava za svaku ploču, dodatno razrjeđuje u testnom puferu i obrađuje na sličan način kao i ispitni uzorak.

Inkubacija s 1. protutijelom

Prvo protutijelo priprema se izradom razrjeđenja unaprijed adsorbiranog seruma 1. protutijela u testnom puferu u omjeru 1 : 2 000 (npr. 8 μ l u 16 ml testnog pufera). Kombinirati 300 μ l otopine 1. protutijela i 300 μ l uzorka/standarda u staklenoj epruveti. Epruveta B₀ priprema se na sličan način s 300 μ l testnog pufera i 300 μ l protutijela. Isto tako, treba pripremiti epruvetu NSB upotrebom samo 600 μ l testnog pufera, tj. bez protutijela. Prekriti epruvete parafilmom i lagano protresti kako bi se promiješalo. Inkubirati jedan sat u vodenj kupelji na temperaturi od 37 °C.

Ispiranje ploče

Isprati ploču neposredno prije dovršetka inkubacije 1. protutijela. To se obavlja izlivanjem sadržaja i tapšanjem upijajućim papirom dok se ne osuši. Zatim napuniti jažice s 350 μ l otopine za ispiranje, proliti i osušiti tapšanjem. Za to je korisna višekanalna repetitivna pipeta ili ispirać ploča. Korak ispiranja ponavlja se još dva puta tako da se ukupno ispiri tri puta.

Punjenje ploče

Nakon što se ploča ispere ukloniti epruvete iz vodene kupke i lagano promiješati. Dodati 200 μ l iz svake epruvete uzorka, standarda, B_0 i NSB-a u dvije jažice ploče. Prekriti ploču ljepljivim filmom za zatvaranje i pustiti da se inkubira jedan sat na 37 °C.

Inkubacija s 2. protutijelom

Na kraju inkubacije iz prethodnog koraka ploču opet treba isprati tri puta, kako je prethodno opisano. Razrijeđeno 2. protutijelo priprema se miješanjem 2,5 μ l 2. protutijela s 50 ml testnog pufera. Dodati 200 μ l razrijeđenog 2. protutijela u svaku jažicu, zatvoriti kako je prethodno opisano i inkubirati jedan sat na 37 °C.

Dodavanje supstrata

Nakon dovršetka inkubacije s 2. protutijelom isprati ploču tri puta kako je prethodno opisano. Zatim u svaku jažicu dodati 100 μ l supstrata TMB. Pustiti da se reakcija odvija deset minuta, po mogućnosti ne na jarkoj svjetlosti. Zaustaviti reakciju dodavanjem 100 μ l fosforne kiseline od 1 M. Time će se boja promijeniti iz plave u intenzivnu žutu. Izmjeriti apsorbanciju pri 450 nm upotrebom čitača ploča.

Izračun vrijednosti B/ B_0

Oduzeti vrijednost NSB od svih mjerenja. B/B_0 za svaki uzorak i standard računa se tako da se vrijednost apsorbancije (B) podijeli prosječnom apsorbancijom uzorka B_0 .

Dobivanje standardne krivulje i utvrđivanje nepoznatih količina

Izraditi standardnu krivulju s pomoću nekog računalnog softvera za izradu grafova (npr. SlidewriteTM ili Sigma Plot[®]) kojim će se ekstrapolirati količina iz vrijednosti B/B_0 uzorka na temelju vrijednosti B/B_0 standarda. Količina se obično grafički prikazuje na logaritamskoj skali i krivulja ima sigmoidni oblik. Međutim, može se činiti linearnom ako se upotrebljava uzak raspon standarda. Ispraviti količine uzorka za faktor razrjeđivanja i navesti u obliku miligrama VTG-a po mililitru plazme.

Utvrđivanje najnižih granica detekcije (MDL, engl. minimum detection limits)

Često neće biti jasno, osobito kod normalnih mužjaka, kako izvijestiti o rezultatima iz niskih vrijednosti. U tim slučajevima treba upotrijebiti granicu pouzdanosti od 95 % kako bi se utvrdilo treba li vrijednost prikazati kao nulu ili neki drugi broj. Ako je rezultat uzorka unutar intervala pouzdanosti nultog standarda (B_0), rezultat treba prikazati kao nulu. Najniža razina detekcije bit će najniži standard koji je dosljedno različit od nultog standarda; drugim riječima, ta dva intervala pouzdanosti ne preklapaju se. Za bilo koji rezultat uzorka koji je unutar granice pouzdanosti najmanje razine detekcije ili veći, izvijestiti će se o izračunanoj vrijednosti. Ako se uzorak nalazi između nultog standarda i intervala najmanje granice detekcije, kao vrijednost tog uzorka treba navesti polovinu najmanje razine detekcije.

LITERATURA

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

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

Dodatak 7.

STATISTIČKA ANALIZA

U testu LAGDA nastaju tri oblika podataka koji se statistički analiziraju: 1. kvantitativni kontinuirani podaci; 2. podaci o vremenu do određenog događaja za stope razvoja (vrijeme do 62. stadija NF-a) i 3. ordinalni podaci u obliku ocjena ozbiljnosti ili razvojnih stadija iz histopatoloških ocjena. Shema odlučivanja preporučene statističke analize za test LAGDA prikazana je na slici 1. Isto tako, u nastavku su navedene i određene bilješke koje će možda biti potrebne za provedbu statističke analize za mjerenja iz testa LAGDA. Za shemu odlučivanja analize, rezultate mjerenja za smrtnost, rast (masa i duljina) te somatski indeks jetre (LSI) treba analizirati u skladu s granom „Ostale krajnje točke”.

Kontinuirani podaci

Podatke za kontinuirane krajnje točke prvo treba provjeriti u pogledu monotoničnosti tako da se podaci transformiraju rangiranjem, prilagode modelu ANOVA i da se usporede linearni i kvadratni kontrasti. Ako su podaci monotonični, treba provesti postupni Jonckheere-Terpstraov test trenda na medijanama ponavljanja i ne treba primijeniti nikakvu naknadnu analizu. Alternativa za podatke koji su normalno distribuirani s homogenim varijancama jest Williamsov test postupnog snižavanja. Ako podaci nisu monotonični (kvadratni je kontrast znatan, a linearni nije), treba ih analizirati upotrebom modela ANOVA s miješanim učincima. Podatke zatim treba procijeniti u pogledu normalnosti (po mogućnosti upotrebom Shapiro-Wilksova ili Anderson-Darlingova testa) i homogenosti varijanci (po mogućnosti upotrebom Leveneova testa). Oba se testa provode na rezidualima iz modela ANOVA s miješanim učincima. Umjesto tih formalnih ispitivanja normalnosti i homogenosti varijanci, može se upotrebljavati stručna procjena iako su formalni testovi poželjni. Ako su podaci normalno distribuirani s homogenim varijancama, pretpostavke ANOVA-e s miješanim učincima ispunjene su i značajan učinak tretiranja utvrđuje se Dunnettovim testom. Ako se utvrdi nenormalnost ili heterogenost varijanci, prekršene su pretpostavke Dunnettova testa i traži se normalizirajuća pretvorba za stabiliziranje varijanci. Ako se ne pronade takva pretvorba, značajan učinak tretiranja utvrđuje se Dunnovim testom. Kad god je to moguće treba provesti jednosmjerno testiranje za razliku od dvosmjernog testiranja, ali potrebna je stručna prosudba kako bi se utvrdilo koji je test primjeren za određenu krajnju točku.

Smrtnost

Podatke o smrtnosti treba analizirati za razdoblje koje obuhvaća cijeli test i treba ih izraziti kao udio životinja koje su uginule u svim pojedinačnim spremnicima. Punoglavce koji ne dovrše metamorfozu u utvrđenom roku, punoglavce iz poduzorka ličinki, mlade žabe koje se izdvajaju i sve životinje koje uginu zbog pogreške osobe koja provodi pokus treba tretirati kao cenzurirane podatke i ne treba ih uključiti u nazivnik izračuna postotka. Prije bilo kakve statističke analize udjele smrtnosti treba provesti transformacijom arkus sinusa drugog korijena. Kao druga mogućnost može se upotrijebiti Cochran-Armitageov test

postupnog snižavanja, možda s Rao-Scottovom prilagodbom ako je prisutna pretjerana disperzija.

Masa i duljina (podaci o rastu)

Mužjaci i ženke nisu spolno dimorfni tijekom metamorfoze pa podatke o rastu iz poduzorka ličinki treba analizirati neovisno o spolu. Međutim, podatke o rastu mladih životinja treba analizirati zasebno na temelju genetskog spola. Za te će krajnje točke možda biti potrebne logaritamske pretvorbe jer nije neuobičajena logaritamska normalnost podataka o veličini.

Somatski indeks jetre (LSI)

Mase jetre treba normalizirati kao udjele masa cijelog tijela (tj. LSI) i analizirati zasebno na temelju genetskog spola.

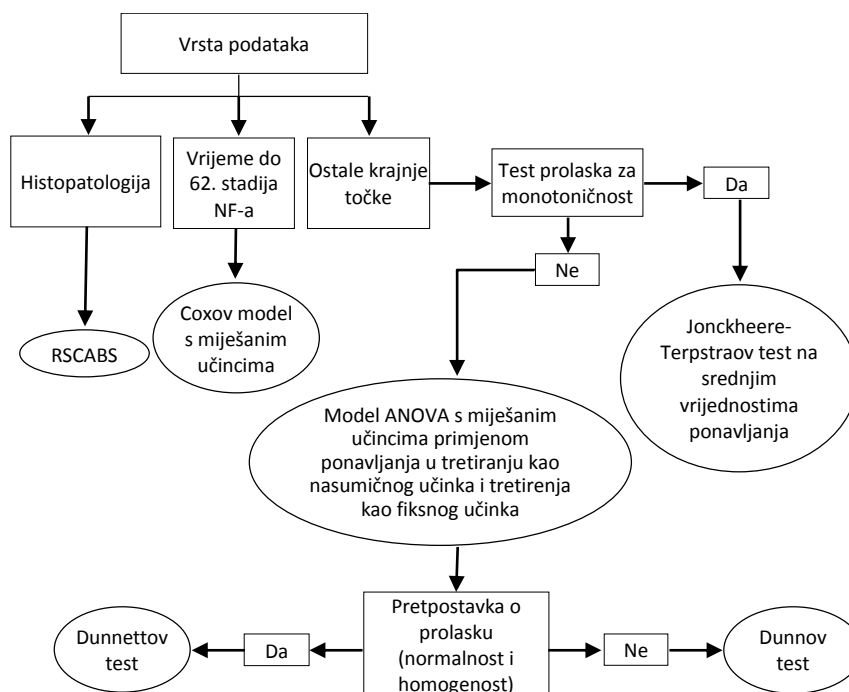
Vrijeme do 62. stadija NF-a

Podatke o vremenu do metamorfoze treba tretirati kao podatke o vremenu do određenog događaja, a smrtno slučajeve ili jedinice koje ne dosegnu 62. stadij NF-a za 70 dana treba tretirati kao podatke koji se cenzuriraju desno (tj. prava vrijednost veća je od 70 dana, ali studija završava prije nego što životinje dosegnu 62. stadij NF-a u 70 dana). Za utvrđivanje datuma kraja ispitivanja treba upotrijebiti srednje vrijeme do dovršetka metamorfoze u 62. stadiju NF-a u kontrolama s vodom za razrjeđivanje. Srednje vrijeme do dovršetka metamorfoze moglo bi se utvrditi Kaplan-Meierovim procjeniteljima ograničenja produkta. Tu krajnju točku treba analizirati upotrebom Coxova modela proporcionalne opasnosti s miješanim učincima kojim se uzima u obzir struktura ponavljanja studije.

Histopatološki podaci (ocjene ozbiljnosti i razvojni stadiji)

Histopatološki podaci u obliku su ocjena ozbiljnosti ili razvojnih stadija. U testu nazvanom RSCABS (engl. *Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices*) upotrebljava se Cochran-Armitageov test trenda postupnog snižavanja s Rao-Scottovom prilagodbom na svakoj razini ozbiljnosti u histopatološkom odgovoru (Green i dr., 2014.). Rao-Scottovom prilagodbom u test se uključuje plan izvođenja pokusa u posudama s ponavljanjima. Postupak u dijelovima (engl. *by Slices*) uključuje biološko očekivanje da se ozbiljnost učinka obično povećava s povećanjem doza ili koncentracija, uz zadržavanje ocjena za pojedinačne ispitne životinje i otkrivanje ozbiljnosti bilo kakvog utvrđenog učinka. Postupkom RSCABS ne utvrđuje se samo koja su tretiranja statistički različita od kontrola (tj. imaju ozbiljniju patologiju od kontrola), već se utvrđuje i pri kojoj ocjeni ozbiljnosti dolazi do razlike, čime se osigurava i neophodan kontekst za analizu. U slučaju određivanja stadija razvoja gonada i reproduktivnih kanala, na podatke treba primijeniti dodatnu manipulaciju jer se u RSCABS-u pretpostavlja da se ozbiljnost učinka povećava s povećanjem doze. Uočeni učinak mogla bi biti odgoda ili ubrzanje razvoja. Stoga podatke o određivanju stadija razvoja treba analizirati kako je navedeno da bi se otkrio ubrzani razvoj i zatim ručno obrnuti prije druge analize za otkrivanje kašnjenja u razvoju.

Slika 1.: Shema odlučivanja statističke analize za test LAGDA



LITERATURA

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

Dodatak 8.

RAZMATRANJA ZA PRAĆENJE I SMANJENJE UČESTALOSTI POJAVE SKOLIOZE

Idiopatska skolioza, koja se kod punoglavaca *Xenopus laevis* obično očituje kao savijeni rep, može otežati morfološka opažanja i opažanja ponašanja kod ispitnih populacija. Treba nastojati smanjiti ili ukloniti pojavu skolioze, i u matičnoj kulturi i u ispitnim uvjetima. Preporučuje se da u konačnom ispitivanju učestalost pojave umjerene i teške skolioze bude manja od 10 % kako bi se poboljšala pouzdanost da se ispitivanjem mogu otkriti razvojni učinci povezani s tretiranjem kod ličinki vodozemaca koje su inače zdrave.

U svakodnevnim opažanjima tijekom konačnog ispitivanja treba evidentirati učestalost (pojedinačni broj) i ozbiljnost skolioze, ako je prisutna. Prirodu abnormalnosti treba opisati s obzirom na lokaciju (npr. ispred ili iza kloake) i smjer zakrivljenosti (npr. bočno ili od leđne do trbušne strane). Ozbiljnost se može ocijeniti na sljedeći način:

(NR) Nije značajna: nema zakrivljenosti

(1) Minimalna: lagana bočna zakrivljenost iza kloake; vidljiva samo pri mirovanju

(2) Umjerena: bočna zakrivljenost iza kloake; vidljiva stalno, ali ne sprječava kretanje

(3) Teška: bočna zakrivljenost ispred kloake ILI bilo kakva zakrivljenost koja sprječava kretanje ILI zakrivljenost od leđne do trbušne strane

Znanstvena savjetodavna komisija američke agencije EPA FIFRA (FIFRA SAP 2013.) pregledala je sažete podatke za skoliozu u 15 analiza metamorfoze vodozemaca s vrstom *X. laevis* (od 51. do 60. i kasnijih stadija NF-a) i dala je opće preporuke za smanjenje učestalosti pojave te abnormalnosti u ispitnim populacijama. Preporuke su relevantne za test LAGDA iako ovo ispitivanje ne uključuje dulji vremenski okvir razvoja.

Uspješnost mriješćenja u prijašnjim ispitivanjima

Obično bi se kao uzgojni parovi trebale upotrebljavati visokokvalitetne, zdrave, odrasle životinje; uklanjanjem uzgojnih parova koji daju potomke sa skoliozom može se s vremenom smanjiti učestalost njezine pojave. Točnije, može biti korisno smanjiti upotrebu divlje ulovljenih životinja za rasplod. Razdoblje izlaganja u testu LAGDA započinje s embrijima od 8. do 10. stadija NF-a i na početku ispitivanja nije moguće utvrditi hoće li se kod određenih jedinki javiti skolioza. Stoga uz praćenje učestalosti pojave skolioze kod životinja koje se ispituju treba evidentirati i prijašnju uspješnost legla (uključujući učestalost pojave skolioze kod svih ličinki kojima je omogućen razvoj). Može biti korisno nastaviti pratiti dio svakog legla koji se ne upotrebljava u određenoj studiji i izvijestiti o tim opažanjima (FIFRA SAP 2013.).

Kakvoća vode

Važno je osigurati primjerenu kakvoću vode, i u laboratorijskoj zalihi i tijekom ispitivanja. Uz kriterije kakvoće vode koji se rutinski ocjenjuju za ispitivanja toksičnosti u vodi, može biti korisno pratiti i ispraviti bilo kakve nedostatke hranjivih tvari (npr. nedostatak vitamina C, kalcija, fosfora) ili previsoke razine selen i bakra, za koje je navedeno da u različitim stupnjevima uzrokuju skoliozu kod vrsta *Rana* sp. i *Xenopus* sp. uzgojenih u laboratoriju (Marshall i dr., 1980.; Leibovitz i dr., 1992.; Martinez i dr., 1992; kako je navedeno u FIFRA SAP 2013.). Upotrebom primjerenog režima prehrane (vidjeti Dodatak 4.) i redovitim čišćenjem spremnika općenito će se poboljšati kakvoća vode i zdravlje ispitnih uzoraka.

Prehrana

Posebne preporuke za režim prehrane, za koji se pokazalo da je uspješan u testu LAGDA, podrobno su opisane u Dodatku 4. Preporučuje se da se izvori hrane pregledaju u pogledu bioloških toksina, herbicida i ostalih vrsta pesticida za koje je poznato da uzrokuju skoliozu kod vrste *X. laevis* ili drugih vodenih životinja (Schlenk i Jenkins 2013.). Na primjer, izlaganje određenim inhibitorima kolinesteraze povezano je sa skoliozom u riba (Schultz i dr., 1985.) i žaba (Bacchetta i dr., 2008.).

LITERATURA

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, and G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. *Science of the Total Environment*, 392.: 110.–118.

Schultz, T.W., J.N. Dumont, and R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. *Toxicology* 36: 185.-198.

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

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

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

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