



Az Európai Unió
Tanácsa

Brüsszel, 2019. február 25.
(OR. en)

6800/19
ADD 2

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

FEDŐLAP

Küldi:	az Európai Bizottság
Az átvétel dátuma:	2019. február 22.
Címzett:	a Tanács Főtitkársága
Biz. dok. sz.:	Annex to D060575/02
Tárgy:	Melléklet a következőhöz: A BIZOTTSÁG (EU) .../... RENDELETE (XXX) a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH) szóló 1907/2006/EK európai parlamenti és a tanácsi rendelet értelmében alkalmazandó vizsgálati módszerek megállapításáról szóló 440/2008/EK rendelet mellékletének a műszaki fejlődéshez való hozzáigazítás céljából történő módosításáról

Mellékelten továbbítjuk a delegációknak a D060575/02 számú dokumentum mellékletét.

Melléklet: Annex to D060575/02

B.71. A BŐRSZENZIBILIZÁCIÓS KÁROS KIMENETI ÚT (AOP) EGYIK KULCSFONTOSSÁGÚ ESEMÉNYÉVEL, A DENDRITIKUS SEJTEK AKTIVÁCIÓJÁVAL FOGLALKOZÓ IN VITRO BŐRSZENZIBILIZÁCIÓS VIZSGÁLATOK

ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

A dendritikus sejtek aktivációján mint fő eseményen alapuló vizsgálati módszer

1. A bőrszenzibilizáló anyagok a vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) által globálisan harmonizált rendszere (ENSZ-GHS) (1), valamint az Európai Unió (EU) anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendelete (CLP-rendelet)¹ szerint olyan anyagok, amelyek a bőrrel való érintkezést követően allergiás válaszreakciót váltanak ki. A bőrszenzibilizációt előidéző főbb biológiai eseményeket illetően általános egyetértés van. A bőrszenzibilizációhoz kapcsolódó kémiai és biológiai mechanizmusokról már rendelkezésre álló ismereteket az OECD AOP-programjának keretében kidolgozott káros kimeneti út (Adverse Outcome Pathway, AOP) (2) foglalja össze a molekuláris kiváltó eseménytől a köztes eseményeken át a káros hatásig, amely az allergiás kontakt bőrgyulladás. A bőrszenzibilizációs káros kimeneti út esetében a molekuláris kiváltó esemény (vagyis az első kulcsfontosságú esemény) az elektrofil anyagok és a bőrben lévő fehérjék nukleofil centrumai között létrejövő kovalens kötés. E káros kimeneti úton a második kulcsfontosságú esemény a keratinsejtekben következik be, többek között gyulladást okozó válaszreakciók, valamint konkrét sejtjelző útvonalakhoz, például az antioxidáns/elektrofil válaszelemről (ARE) függő útvonalakhoz kapcsolódó génexpresszió-változások formájában. A harmadik kulcsfontosságú esemény a dendritikus sejtek (DC) aktivációja, melynek értékelése jellemzően konkrét sejtfelületi markerek, kemokinek és citokinek expressziója alapján történik. A negyedik kulcsfontosságú esemény a T-sejtek

¹ Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról, HL L 353/1., 2008.12.31.

aktivációja és proliferációja, melynek közvetett értékelése az egereken alkalmazott lokális nyirokcsomó-vizsgálati módszer (LLNA) (3) keretében történik.

2. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 442E. vizsgálati iránymutatásában (2017) leírt módszerrel. A vizsgálati módszer a bőrszenzibilizációs káros kimeneti út egyik kulcsfontosságú eseményének, a dendritikus sejtek aktivációjának mechanizmusaival foglalkozó in vitro vizsgálatokat ismerteti (2). Olyan vizsgálatokat foglal magában, amelyekkel elősegíthető a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok ENSZ-GHS és CLP-rendelet szerinti megkülönböztetése.

A vizsgálati módszer az alábbi vizsgálatokat ismerteti:

- emberi sejtvonal aktiválási vizsgálat (h-CLAT);
 - U937 sejtvonal aktiválási vizsgálat (U-SENSTM);
 - Interleukin-8 riporter gén vizsgálat (IL-8 Luc vizsgálat).
3. Az e vizsgálati módszer és az annak megfelelő OECD vizsgálati iránymutatás részét képező vizsgálatok adatgenerálási eljárásaik és a mért értékek tekintetében különbözhetnek egymástól, mindazonáltal megkülönböztetés nélkül használhatók arra, hogy eleget tegyenek a bőrszenzibilizációs káros kimeneti út egyik kulcsfontosságú eseményének, a dendritikus sejtek aktivációjának vizsgálati eredményeire vonatkozó nemzeti követelményeknek, ugyanakkor előnyükre válik az adatok kölcsönös elfogadása az OECD-megállapodás szerint.

A kulcsfontosságú eseményen alapuló vizsgálati módszer alá tartozó vizsgálatok háttere és elvei

4. A bőrszenzibilizáció vizsgálata jellemzően vizsgált állatokon történő vizsgálatot foglal magában. A tengerimalacokon alkalmazott klasszikus módszerek, vagyis a Magnusson–Kligman-féle tengerimalac-maximizációs vizsgálat (GPMT) és a Bühler-féle vizsgálat (B.6. vizsgálati módszer) (4) a bőrszenzibilizáció indukciós és kiváltási fáziséval egyaránt foglalkozik. Az egereken alkalmazott vizsgálatok – a lokális nyirokcsomó-vizsgálati módszer (LLNA, B.42. vizsgálati módszer) (3) és két nem radioaktív változata, az LLNA: DA (B.50. vizsgálati módszer) (5) és az LLNA: BrdU-ELISA (B.51. vizsgálati módszer) (6) – mindegyike csak az indukciós válaszreakciót vizsgálja, és szintén elfogadottá váltak, mivel állatjólét szempontjából előnyösebbek, mint a tengerimalacon végzett vizsgálatok, és objektív mérést tesznek lehetővé a bőrszenzibilizáció indukciós fáziséban.
5. Nemrégiben olyan mechanisztikus alapú in chemico és in vitro vizsgálati módszereket fogadtak el, amelyek a bőrszenzibilizációs káros kimeneti út első kulcsfontosságú

eseményével (B.59. vizsgálati módszer; közvetlen peptidreaktivitási vizsgálat (7)) és második kulcsfontosságú eseményével (B.60. vizsgálati módszer; ARE-Nrf2 luciferáz alapú vizsgálati módszer (8)) foglalkoznak, és hozzájárulnak a vegyi anyagok bőrszenzibilizációs veszélyességi potenciáljának értékeléséhez.

6. A vizsgálati módszerben ismertetett vizsgálatok mennyiségileg meghatározzák a monociták és a dendritikus sejtek szenzibilizáló anyagokkal való kezelést követően beinduló aktivációs folyamata által a sejtfelületi marker(ek) (pl. CD54, CD86) expressziójában előidézett változásokat, vagy a dendritikus sejtek aktivációja által egy citokin, az IL-8 expressziójában előidézett változásokat. A bőrszenzibilizáló anyagokról kimutatták, hogy a dendritikus sejtek aktivációjában részt vevő (2) sejtmembrán markerek (pl. CD40, CD54, CD80, CD83 és CD86), gyulladást okozó citokinek (pl. az interleukin-1 béta és a tumor nekrozis faktor alfa) és számos kemokin (pl. az IL-8 (CXCL8) és a CCL3) expresszióját (9) (10) (11) (12) idézik elő.
7. Mindazonáltal, mivel a dendritikus sejtek aktivációja csupán egyike a bőrszenzibilizációs káros kimeneti út kulcsfontosságú eseményeinek (2) (13), a dendritikus sejtek aktivációjának markereit mérő vizsgálatokkal előállított információk önmagukban nem feltétlenül elegendők ahhoz, hogy megállapítható legyen a vegyi anyagok bőrszenzibilizáló potenciálja van annak hiánya. Ezért az e vizsgálati módszerben leírt vizsgálatokkal kapott adatokat ajánlatos integrált vizsgálati és értékelési megközelítések keretében alkalmazni a bőrszenzibilizáló (ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategória) és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetésének támogatására olyan egyéb, releváns kiegészítő információkkal együtt, mint a bőrszenzibilizációs káros kimeneti út más kulcsfontosságú eseményeivel foglalkozó in vitro vizsgálatok eredményei, valamint a nem vizsgálatalapú módszerekkel, köztük a kémiai analógokból kereszthivatkozással kapott adatok (13). Közzétettek példákat az e vizsgálatokkal kapott adatok kidolgozott megközelítésekkel – vagyis az alkalmazott információforrások és az előrejelzéseket lehetővé tévő adatfeldolgozás tekintetében szabványosított megközelítésekkel – történő használatára (13), amelyek az integrált vizsgálati és értékelési megközelítések hasznos elemeként alkalmazhatók.
8. Az e vizsgálati módszerben leírt vizsgálatok nem alkalmazhatók önmagukban sem a bőrszenzibilizáló anyagoknak az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1A. és 1B. alkategóriába sorolására azon hatóságok által, amelyek alkalmazzák e két opcionális alkategóriát, sem a hatáserősség előrejelzésére a biztonsági értékeléssel kapcsolatos döntésekhez. A szabályozási kerettől függően azonban az e módszerekkel kapott pozitív eredmény önmagában is felhasználható a vegyi anyagok ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába sorolására.

9. E vizsgálati módszer esetében a „vizsgálati vegyi anyag” kifejezés a vizsgálat tárgyát képező vegyi anyagra vonatkozik¹, és nem a vizsgálatok egy összetevőből álló anyagok, több összetevőből álló anyagok és/vagy keverékek vizsgálatára való alkalmazhatóságához kapcsolódik. Jelenleg kevés információ áll rendelkezésre a vizsgálatok több összetevőből álló anyagokra és keverékekre való alkalmazhatóságával kapcsolatban (14) (15). Mindazonáltal a vizsgálatok technikailag alkalmazhatók több összetevőből álló anyagok és keverékek vizsgálatára. E vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt azonban meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért². Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény. Ezenfelül a több összetevőből álló anyagok vagy keverékek vizsgálata során figyelembe kell venni a citotoxikus összetevőknek a megfigyelt válaszreakciókkal való lehetséges kölcsönhatását.

¹ 2013 júniusában az OECD együttes ülése megállapodott abban, hogy ahol csak lehetséges, az OECD új és átdolgozott vizsgálati iránymutatásaiban következetesebben alkalmazzák a „vizsgálati vegyi anyag” kifejezést a vizsgálat tárgyát képező vegyi anyagra.

² Ezt a mondatot a WNT 2014. áprilisi ülése javasolta és hagyta jóvá.

SZAKIRODALOM

- (1) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Elérhető a következő címen: 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. Elérhető a következő címen: [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) E melléklet B.42., Helyi nyirokcsomó-vizsgálat című fejezete. E melléklet B.6., Börszenzibilizáció című fejezete.
- (4) E melléklet B.50., Börszenzibilizáció: helyi nyirokcsomó-vizsgálat: DA című fejezete.
- (5) E melléklet B.51., Börszenzibilizáció: helyi nyirokcsomó-vizsgálat: BrdU-ELISA című fejezete.
- (6) E melléklet B.59., In chemico börszenzibilizáció: közvetlen peptid reaktivitás vizsgálat (DPRA) című fejezete.
- (7) E melléklet B.60., *In Vitro* börszenzibilizáció: ARE-Nrf2 luciferáz alapú vizsgálati módszer című fejezete.
- (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](#). Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen: <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.

1. függelék

***IN VITRO* BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ: EMBERI SEJTVONAL AKTIVÁLÁSI VIZSGÁLAT (H-CLAT)**

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

1. A h-CLAT mennyiségileg meghatározza a THP-1 humán monocita leukémia sejtvonal monocitáinak és dendritikus sejtjeinek a szenzibilizáló anyagokkal való kezelést követően beinduló aktivációs folyamata által a sejtfelületi marker(ek) (CD86 és CD54) expressziójában előidézett változásokat (1) (2). Ezt követően a CD86 és a CD54 sejtfelületi marker mért expressziós szintjét a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetésének alátámasztására használják fel.
2. A h-CLAT-ot az Állatkísérletek Alternatíváinak Uniós Referencialaboratóriuma (EURL ECVAM) által koordinált validálási vizsgálatban értékelték, az EURL ECVAM tudományos tanácsadó bizottsága (ESAC) pedig független szakértői értékelésnek vetette alá. A rendelkezésre álló bizonyítékok, valamint a szabályozó hatóságok és az érdekeltek álláspontja alapján az EURL ECVAM a h-CLAT-ot integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében történő alkalmazásra ajánlotta (3) a veszélyességi osztályozás és címkézés céljából a bőrszenzibilizáló és nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetésének alátámasztására. A h-CLAT-ból származó adatok és más információk együttes használatára fellelhetők példák a szakirodalomban (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).
3. A h-CLAT-ról bebizonyosodott, hogy áthelyezhető a sejtenyészési technikák és az áramlási citometriás elemzés terén tapasztalattal rendelkező laboratóriumokba. A vizsgálatról várható előrejelzések reprodukálhatóságának mértéke a laboratóriumokon belül és között mintegy 80 % (3) (12). A validálási vizsgálatban (13) és más közzétett tanulmányokban (14) kapott eredmények összességében azt jelzik, hogy a hCLAT a bőrszenzibilizáló (azaz az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozó) anyagokat az LLNA vizsgálati módszer eredményeihez képest 85 %-os (N=142) pontossággal különbözteti meg a nem szenzibilizáló anyagoktól, 93 % az érzékenysége (94/101), a specifikussága pedig 66 % (27/41) (az EURL ECVAM által végzett ismételt elemzés alapján (12), amely figyelembe vette az összes rendelkezésre álló adatot, ugyanakkor a 4. pontban leírtak szerint figyelmen kívül hagyta a 3,5-nél nagyobb Log Kow értékkel rendelkező vegyi anyagok negatív eredményét). A h-CLAT nagyobb valószínűséggel vezet hamis negatív előrejelzésekhez olyan vegyi anyagoknál, amelyeknek alacsonytól mérsékeltig terjedő a szenzibilizáló hatása (azaz az ENSZ-GHS/CLP-rendelet

szerinti 1B. alkategóriába tartozó anyagoknál), mint a rendkívül bőrszenzibilizáló hatást mutató vegyi anyagoknál (azaz az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1A. alkategóriába tartozó anyagoknál) (4) (13) (15). Ezek az információk összességében azt jelzik, hogy a h-CLAT módszer érdemben hozzájárul a bőrszenzibilizáció veszélyeinek azonosításához. A h-CLAT mint önálló vizsgálat esetében itt megadott pontossági értékek azonban csak irányadók, ugyanis a vizsgálatot az integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében más információforrásokkal együtt és az Általános bevezetés 7. és 8. pontjának rendelkezéseivel összhangban kell figyelembe venni. Ezen túlmenően a bőrszenzibilizáció nem állatokon alkalmazott módszereinek értékelésekor nem szabad megfeledezni arról, hogy az LLNA vizsgálat, valamint más állatkísérletek nem feltétlenül tükrözik teljes egészében az embernél fennálló helyzetet.

4. Az aktuálisan rendelkezésre álló adatok alapján a h-CLAT módszerről bebizonyosodott, hogy különféle szerves funkciós csoportokat, reakciómechanizmusokat, (in vivo vizsgálatok során meghatározott) bőrszenzibilizáló hatásokat és fizikai-kémiai tulajdonságokat képviselő vizsgálati vegyi anyagokra alkalmazható (3) (14) (15). A h-CLAT módszer olyan vizsgálati vegyi anyagokra alkalmazandó, amelyek megfelelő oldószerben/vivőanyagban (lásd a 14. pontot) oldhatók, vagy azokkal stabil diszperziót alkotnak (azaz olyan kolloidot vagy szuszpenziót, amelyben a vizsgálati vegyi anyag nem ülepedik le, illetve nem válik szét az oldószertől/vivőanyagtól különböző fázisokra). A 3,5-nél magasabb log Kow értékkel rendelkező vizsgálati vegyi anyagok általában hamis negatív eredményre vezetnek (14). Ezért a 3,5-nél magasabb log Kow értékkel rendelkező vizsgálati vegyi anyagok negatív eredményét figyelmen kívül kell hagyni. Ugyanakkor a 3,5-nél magasabb log Kow értékkel rendelkező vizsgálati vegyi anyagok pozitív eredménye még felhasználható a vizsgálati vegyi anyag bőrszenzibilizáló anyagként való azonosításának alátámasztására. Ezen túlmenően az alkalmazott sejtvonallal korlátozott metabolikus képessége (16) és a kísérleti körülmények miatt különösen a pro-hapténok (azaz például a P450 enzim közreműködésével enzimatis aktivációt igénylő anyagok) és a lassú oxidációs rátájú pre-hapténok (azaz az oxidációval aktiválódó anyagok) is negatív eredményre vezethetnek a h-CLAT vizsgálatban (15). A h-CLAT vizsgálat alkalmas fluoreszcens vizsgálati vegyi anyagok értékelésére (17); mindazonáltal azok az erősen fluoreszcens vizsgálati vegyi anyagok, amelyek a fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC), illetve a propídium-jodiddal (PI) azonos hullámhosszon bocsátják ki a fényt, zavarják az áramlási citometriás észlelést, ezért FITC-vel összekapcsolt ellenanyagok, illetve propídium-jodid használatával nem értékelhetők megfelelően. Ilyen esetben használhatók más fluorokrómmal jelzett ellenanyagok vagy más citotoxikus markerek, ha például az 1.2. függelékben szereplő jártassági tesztanyagok vizsgálata révén bizonyítást nyer, hogy a FITC-vel jelzett ellenanyagokhoz (lásd a 24. pontot) vagy a propídium-jodidhoz (lásd a 18.

pontot) hasonló eredményt biztosítanak. A fentiek fényében: a negatív eredményeket a közölt korlátokra tekintettel és az integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretébe tartozó egyéb információforrásokkal együtt kell értelmezni. Olyan esetekben, amikor bizonyítékkal igazolható, hogy a h-CLAT módszer nem alkalmazható más, konkrét vegyi anyag-kategóriákra, a módszert nem szabad e vegyi anyag-kategóriákra alkalmazni.

5. A fentieknek megfelelően a h-CLAT módszer elősegíti a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetését. Hozzájárulhat azonban a szenzibilizáló hatás erősségének értékeléséhez is (4) (5) (9), ha az integrált vizsgálati és értékelési megközelítéshez hasonló integrált megközelítések keretében alkalmazzák. Lehetőleg humán adatokon alapuló további munkára van azonban szükség annak meghatározásához, hogy a h-CLAT eredményei hogyan járulhatnak hozzá a hatásereőség vizsgálatához.
6. A fogalom meghatározások az 1.1. függelékben találhatók.

A VIZSGÁLAT ELVE

7. A h-CLAT módszer egy in vitro vizsgálat, amely mennyiségileg meghatározza a THP-1 humán monocita leukémia sejtvonal sejtjein kifejeződő sejtfelületi markerek (CD86 és CD54) expressziójában a vizsgálati vegyi anyaggal való 24 órás kezelés révén bekövetkező változásokat. Ezek a sejtfelszíni molekulák a monocita THP-1 aktiváció jellegzetes markerei, és képesek imitálni a dendritikus sejtek aktivációját, ami kulcsszerepet játszik a T-sejtek aktiválásában. A sejtfelületi markerek expressziójának változásait áramlási citometriával mérik, miután a sejteket megfestették fluorokrómmal jelzett ellenanyagokkal. Ezzel egyidejűleg citotoxicitási méréseket is végeznek annak felméréséhez, hogy a citotoxikus koncentrációknál alacsonyabb koncentráció mellett fokozódik-e a felületi markerek expressziója. Meghatározzák a felületi markerek oldószeres/vivőanyagos kontrollhoz viszonyított relatív fluoreszcencia-intenzitását, amelyet az előrejelzési modellben (lásd a 26. pontot) felhasználnak a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetésének alátámasztására.

A JÁRTASSÁG BIZONYÍTÁSA

8. A B.71. vizsgálati módszer e függelékben ismertetett vizsgálatának rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak az 1.2. függelékben felsorolt tíz jártassági tesztanyag felhasználásával igazolniuk kell szakmai jártasságukat. Ezenfelül a vizsgálat felhasználóinak történeti adatbázist kell fenntartaniuk, amely tartalmazza a reaktivitási tesztek közül (lásd a 11. pontot), valamint a pozitív és az oldószeres/vivőanyagos

kontrollokból (lásd a 20–22.pontot) származó adatokat, ezekkel az adatokkal igazolva a vizsgálat laboratóriumon belüli hosszú távú reprodukálhatóságát.

ELJÁRÁS

9. Ez a vizsgálat az állatkísérletek alternatív módszereire vonatkozó adatbázis-szolgáltatás (DB-ALM) h-CLAT-ot érintő 158. protokollján (18) alapul, amely az EURL ECVAM által koordinált validálási vizsgálatához használt protokoll. A h-CLAT módszer laboratóriumi végrehajtása és alkalmazása során e protokoll alkalmazása ajánlott. Az alábbiakban a h-CLAT módszer főbb összetevőinek és eljárásainak leírása található; a módszer a következő két lépésből áll: *dózisbehatároló vizsgálat* és *CD86/CD54 expresszió mérése*.

Sejtek előkészítése

10. A h-CLAT módszer végrehajtásához a THP-1 humán monocita leukémia sejtvonalat kell használni. Ajánlatos a (TIB-202™) sejteket egy megfelelő minősítéssel rendelkező sejtbankból, például az Amerikai Fajtakultúra Gyűjteményből beszerezni.
11. A THP-1 sejteket 10 % magzati borjú szérummal (FBS), 0,05 mM 2-merkaptoetanollal, 100 egység/ml penicillinnel és 100 µg/ml sztreptomocinnal kiegészített RPMI-1640 tápoldatban, valamint 37 °C-os, 5 %-os CO₂-tartalmú és vízgőzzel telített környezetben kell tenyészteni. A tápfolyadékból a penicillin és a sztreptomycin elhagyható. Ez esetben azonban a felhasználóknak például az 1.2. függelékben felsorolt jártassági tesztanyagok tesztelésével meg kell bizonyosodniuk arról, hogy az antibiotikumok hiánya a tápfolyadékban nem befolyásolja az eredményt. A fertőzés kockázatának minimalizálása érdekében minden esetben a megfelelő sejtenyésztési gyakorlatok szerint kell eljárni, függetlenül attól, hogy van-e antibiotikum a sejtenyésztő tápfolyadékban. A THP-1 sejteket 2–3 naponta $0,1\text{--}0,2 \times 10^6$ sejt/ml sűrűségben rutinszerűen leoltják. A sejtek fenntartása során meg kell őrizni a $0,1\text{--}1,0 \times 10^6$ sejt/ml sejtsűrűséget. A vizsgálatban való felhasználásuk előtt a sejteket egy reaktivitási teszt során minősíteni kell. A sejtek reaktivitási tesztjét a felolvasztásuk után két héttel kell elvégezni, a pozitív kontrollanyagokkal, vagyis a 2,4-dinitro-klór-benzollal (DNCB) (CAS-száma: 97-00-7, legalább 99 %-os tisztaságban) és a nikkel-szulfáttal (NiSO₄) (CAS-száma: 10101-97-0, legalább 99 %-os tisztaságban), valamint a negatív kontrollanyaggal, a tejsavval (LA) (CAS-száma: 50-21-5, legalább 85 % tisztaságban). Mind a DNCB-nak, mind a NiSO₄-nak pozitív választ, a tejsavnak pedig negatív választ kell kiváltania a CD86 és a CD54 sejtfelületi markernél egyaránt. A vizsgálatához kizárólag a reaktivitási tesztben megfelelt sejtek használhatók. A sejtek a felolvasztásukat követően két hónapig szaporíthatók. A

sejteket legfeljebb 30 alkalommal szabad passzálni. A reaktivitási tesztet a 20–24. pontban leírt eljárások szerint kell végrehajtani.

12. A vizsgálathoz a THP-1 sejteket vagy $0,1 \times 10^6$ sejt/ml vagy $0,2 \times 10^6$ sejt/ml sűrűségben átoljtják, majd sejtenyészítő lombikban az előbbi esetben 72 óráig, az utóbbiban pedig 48 óráig előtenyésztik. Fontos, hogy közvetlenül az előtenyésztési időszak végét követően a sejtenyészítő lombikban minden (a fenti két előtenyésztési körülmény egyikét alkalmazó) kísérletben a sejtek sűrűsége nagyjából azonos legyen, mert közvetlenül az előtenyésztési időszak végét követően a sejtenyészítő lombikban fennálló sejtsűrűség befolyásolhatja az allergének által kiváltott CD86/CD54 expressziót (19). A vizsgálat napján a sejtenyészítő lombikból begyűjtött sejteket frissen készített tápfolyadékban 2×10^6 sejt/ml sűrűségben újrassuszpendálják. Ezt követően a sejteket elhelyezik egy 24 lyukú, lapos fenekű lemezben 500 μ l (lyukanként 1×10^6 sejt) mennyiségben vagy egy 96 lyukú, lapos fenekű lemezben 80 μ l (lyukanként $1,6 \times 10^5$ sejt) mennyiségben.

Dózisbehatároló vizsgálat

13. A dózisbehatároló vizsgálat során meghatározzák a CV75 értéket, azaz a vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációját, amely az oldószeres/vivőanyagok kontrollhoz képest 75 %-os sejtleletképeséget (CV) idéz elő. A CV75 értéket arra használják, hogy meghatározzák a vizsgálati vegyi anyagok koncentrációját a CD86/CD54 expresszió méréséhez (lásd a 20–24. pontot).

A vizsgálati vegyi anyagok és a kontrollanyagok előkészítése

14. A vizsgálati vegyi anyagokat és a kontrollanyagokat a vizsgálat napján kell előkészíteni. A h-CLAT módszerben a vizsgálati vegyi anyagokat feloldják vagy stabilan diszpergálják (lásd még a 4. pontot) sóoldatban vagy tápoldatban, mint az első számú oldószer/vivőanyag választás, vagy dimetil-szulfoxidban (DMSO, legalább 99 %-os tisztaságban), mint második oldószer/vivőanyag választás, ha a vizsgálati vegyi anyag az előző két oldószerben/vivőanyagban nem oldható vagy nem diszpergálható stabilan, a végső koncentráció 100 mg/ml (sóoldat vagy tápoldat használata esetén) vagy 500 mg/ml (DMSO használata esetén). A fentiektől eltérő oldószerek/vivőanyagok megfelelő tudományos indokolással szintén használhatók. Figyelembe kell venni azt is, hogy a vizsgálati vegyi anyag mennyire stabil a végső oldószerben/vivőanyagban.
15. A vizsgálati vegyi anyagok 100 mg/ml (sóoldat vagy tápoldat használata esetén) vagy 500 mg/ml (DMSO használata esetén) törzsoldatából kiindulva az alábbi hígítási lépéseket kell elvégezni:

- Ha az oldószer/vivőanyag sóoldat vagy tápoldat: A megfelelő oldószer/vivőanyag használatával nyolc törzsoldatot (nyolc koncentrációt) készítenek, kétszeres oldatsorozatban. E törzsoldatokat ezután a tápfolyadékban 50-szeresükre tovább kell hígítani (munkaoldatok). Amennyiben a lemezre helyezett legnagyobb, 1 000 µg/ml-es végső koncentráció nem toxikus, a legmagasabb koncentrációértéket egy új citotoxicitási vizsgálatban újból meg kell határozni. A sóoldatban vagy tápoldatban feloldott vagy stabilan diszpergált vizsgálati vegyi anyagok lemezre helyezett végső koncentrációja nem haladhatja meg az 5 000 µg/ml értéket.
- Ha az oldószer/vivőanyag DMSO: A megfelelő oldószer/vivőanyag használatával nyolc törzsoldatot (nyolc koncentrációt) készítenek, kétszeres oldatsorozatban. E törzsoldatokat ezután a tápfolyadékban 250-szeresükre tovább kell hígítani (munkaoldatok). A lemezre helyezett végső koncentráció még akkor sem haladhatja meg az 1 000 µg/ml értéket, ha ez a koncentráció nem toxikus.

Végül pedig felhasználják a munkaoldatokat a kezeléshez, ehhez a kétszeres továbbhígítás érdekében azonos mennyiségű munkaoldatot adnak hozzá a lemezen lévő THP-1 sejtsuszpenzióhoz (lásd a 17. pontot), a lemez végleges koncentrációértékei általában 7,81–1 000 µg/ml tartományban helyezkednek el.

16. A h-CLAT módszerben alkalmazott oldószeres/vivőanyagos kontroll a tápfolyadék (a tápfolyadékban vagy sóoldatban feloldott vagy stabilan diszpergált vizsgálati vegyi anyagok esetében (lásd a 4. pontot)) vagy a DMSO (a DMSO-ban feloldott vagy stabilan diszpergált vizsgálati vegyi anyagok esetében), amelyet egyetlen végső, 0,2 %-os koncentrációban vizsgálnak a lemezen. Az oldószeres/vivőanyagos kontrollt a munkaoldatokhoz alkalmazott eljárás szerint kell hígítani (lásd a 15. pontot).

A vizsgálati vegyi anyagok és a kontrollanyagok alkalmazása

17. A 15. és a 16. pontban leírt módon elkészített tápfolyadékot vagy munkaoldatokat 1 : 1 térfogatszázalék arányban össze kell keverni a 24 lyukú vagy 96 lyukú lapos fenekű lemezen elkészített sejtsuszpenziókkal (lásd a 12. pontot). A kezelt lemezeket ezt követően 24 óráig ($\pm 0,5$ óra) 37 °C-on 5 % CO₂ jelenlétében inkubálják. Ügyelni kell az illékony vizsgálati vegyi anyagok elpárolgásának elkerülésére, valamint a lyukak vizsgálati vegyi anyagokkal való keresztszennyeződésének elkerülésére, például a lemezek befedhetők fóliával a vizsgálati vegyi anyagokkal való inkubálás előtt (20).

Festés propidium-jodiddal

18. A 24 órás ($\pm$ fél óra) kezelést követően a sejteket mintacsövekbe helyezik át és centrifugálással kinyerik őket. A felülszót eltávolítják, a maradék sejtet pedig 0,1 % borjú szérum albuminnal kiegészített 200 µl (96 lyukú lemez esetén) vagy 600 µl (24 lyukú

lemez esetén) foszfátpuffert tartalmazó sóoldattal (festő puffer) újraszuszpendálják. 200 µl sejtszuszenziót áthelyeznek egy 96 lyukú, gömbölyű fenekű lemezre (96 lyukú lemez használata esetén) vagy mikrocsőbe (24 lyukú lemez használata esetén), majd két alkalommal átmoszák 200 µl (96 lyukú lemez használata esetén) vagy 600 µl (24 lyukú lemez használata esetén) festő pufferrel. Végül a sejteket (pl. 400 µl) festő pufferben újraszuszpendálják, és hozzáadnak (pl. 20 µl) propídium-jodidot (a propídium-jodid végső koncentrációja lehet például 0,625 µg/ml). Más citotoxicitási markerek, például 7-amino-aktinomicin D (7-AAD), tripankék vagy egyéb markerek is alkalmazhatók, amennyiben az alternatívaként használt festékről például az 1.2. függelékben felsorolt jártassági tesztanyagok tesztelésével kimutatták, hogy a propídium-jodidhoz hasonló eredményekre vezet.

Citotoxicitás mérése áramlási citometriával és a CV75 érték megbecslésével

19. A propídium-jodid (PI) felvételét áramlási citometriával elemzik az FL-3 adatgyűjtő csatornán. Összesen 10 000 élő (PI negatív) sejt adatait gyűjtik össze. A sejtleletképeséget az alábbi egyenlet alapján kalkulálja ki a citométer elemzőprogramja. Alacsony sejtleletképeségnél az elhalt sejtekkel együtt legfeljebb 30 000 sejt adatait gyűjtik össze. Ennek alternatívája lehet az, amikor az adatokat az elemzés elindításától számítva egy percen át gyűjtik.

$$\text{Sejtleletképeség} = \frac{\text{élő sejtek száma}}{\text{összegyűjtött sejtek száma összesen}} \times 100$$

A CV75 értéket (lásd a 13. pontot), vagyis azt a koncentrációt, amelynél a THP-1 sejtek túlélési aránya 75 % (a toxicitás 25 %), logaritmikus-lineáris interpolációval számítják ki, az alábbi egyenlet alapján:

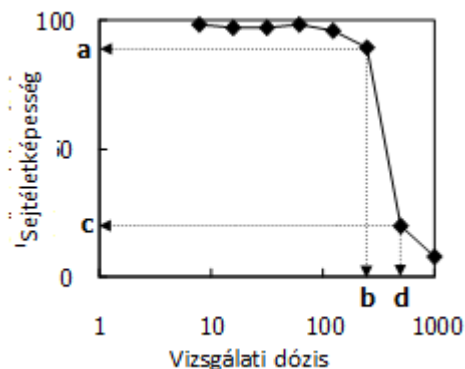
$$\text{Log CV75} = \frac{(75-c) \times \text{Log}(b) - (75-a) \times \text{Log}(d)}{a-c}$$

ahol:

a = a 75 % feletti sejtleletképeség minimumértéke

c = a 75 % alatti sejtleletképeség maximumértéke

b és d = az a és c sejtleletképeséget előidéző koncentrációk



A CV75 érték más módon is meghatározható, amennyiben (pl. a jártassági tesztanyagok tesztelésével) igazolható, hogy az nem befolyásolja az eredményt.

CD86/CD54 expresszió mérése

A vizsgálati vegyi anyagok és a kontrollanyagok előkészítése

20. A vizsgálati vegyi anyagokat feloldják vagy stabilan diszpergálják a megfelelő oldószerben/vivőanyagban (sóoldat, tápoldat vagy DMSO; lásd a 14. pontot). A vizsgálati vegyi anyagokat elsőként a *dózisbehatároló vizsgálatban* (lásd a 19. pontot) meghatározott CV75 érték 1,2-szerese 100-szorosának (sóoldat vagy tápoldat esetén) vagy 500-szorosának (DMSO esetén) megfelelő koncentrációra hígítják. Amennyiben a CV75 érték nem határozható meg (ha a *dózisbehatároló vizsgálatban* nem figyeltek meg kellő mértékű citotoxicitást), az induló koncentrációérték a vizsgálati vegyi anyag egyes oldószerekkel/vivőanyagokkal készített legmagasabb oldható vagy stabilan diszpergált koncentrációja legyen. A lemezre helyezett végső koncentráció azonban nem haladhatja meg az 5 000 µg/ml értéket (sóoldat vagy tápoldat esetén), illetve az 1 000 µg/ml értéket (DMSO esetén). Ezt követően a megfelelő oldószer/vivőanyag használatával 1,2-szeres oldatsorozatot készítenek (nyolc koncentrációval $100 \times 1,2 \times \text{CV75}$ és $100 \times 0,335 \times \text{CV75}$ között (sóoldat vagy tápoldat esetén), illetve $500 \times 1,2 \times \text{CV75}$ és $500 \times 0,335 \times \text{CV75}$ között (DMSO esetén)), létrehozva ezzel a h-CLAT módszerrel vizsgálandó törzsoldatokat (egy adagolási minta megtalálható a DB-ALM 158. protokolljában). A törzsoldatokat ezután a tápfolyadékban 50-szeresükre (sóoldat vagy tápfolyadék esetén), illetve 250-szeresükre (DMSO esetén) továbbhígítják (elkészítve a munkaoldatokat). Ezeket a munkaoldatokat végül felhasználják a kezeléshez, ehhez kétszeres hígítási tényező alkalmazásával elkészítik a lemezre helyezett végső oldatokat. Amennyiben az eredmények nem teljesítik a 29. és a 30. pontban szereplő sejtéletképességi kritériumokat, a CV75 értékének pontosabb meghatározása érdekében a *dózisbehatároló vizsgálat* megismételhető. A CD86/CD54 expresszió méréseire csak 24 lyukú lemezek használhatók.

21. Az oldószeres/vivőanyagok kontrollt a 16. pontban leírtak szerint kell elkészíteni. A h-CLAT módszerben alkalmazott pozitív kontrollanyag a DNCB (lásd a 11. pontot), amelynek törzsoldatait DMSO-ban készítik el, a törzsoldatokat pedig a 20. pontban foglaltak szerint hígítják. A *CD86/CD54 expresszió mérése* során pozitív kontrollanyagként használt DNCB-t egyetlen végső (általában 4,0 µg/ml) koncentrációban vizsgálják a lemezen. Ahhoz, hogy 4,0 µg/ml koncentrációjú DNCB kerüljön a lemezre, DMSO-ban elkészítik a DNCB 2 mg/ml koncentrációjú törzsoldatát, majd a törzsoldatot tápfolyadékban a 250-szeresére hígítva elkészítik a 8 µg/ml koncentrációjú munkaoldatot. A pozitív kontrollanyag koncentrációjaként használható a DNCB CV75 értéke, amelyet minden vizsgálólaboratóriumban meghatároznak. Alkalmazhatók más, megfelelő pozitív kontrollok is, ha rendelkezésre állnak dokumentált adatok hasonló vizsgálatmenet-elfogadhatósági kritériumok származtatásához. A pozitív kontrollanyag egyetlen végső koncentrációban kerül a lemezre, amely nem haladhatja meg az 5 000 µg/ml értéket (sóoldat vagy tápoldat esetén), illetve az 1 000 µg/ml értéket (DMSO esetén). A vizsgálatmenet elfogadhatósági kritériumai megegyeznek a vizsgálati vegyi anyag elfogadhatósági kritériumaival (lásd a 29. pontot), az utolsó kritériumot leszámítva, mivel a pozitív kontrollanyagot egyetlen koncentrációban vizsgálják.

A vizsgálati vegyi anyagok és a kontrollanyagok alkalmazása

22. Minden vizsgálati vegyi anyag és kontrollanyag esetében egy kísérletre van szükség az előrejelzéshez. Valamennyi kísérlet legalább két független *CD86/CD54 expresszió mérési* vizsgálatmenetből áll (lásd a 26–28. pontot). Mindegyik független vizsgálatmenetet más-más napon kell elvégezni, illetve a vizsgálatmenetek ugyanazon a napon is elvégezhetők, ha minden vizsgálatmenethez: a) a vizsgálati vegyi anyag és az ellenanyag oldatok egymástól független, frissen készített törzsoldatait és munkaadatait használják és b) egymástól függetlenül begyűjtött sejteket (vagyis különböző sejtenyésző lombikból gyűjtött sejteket) használnak; a sejtek azonban származhatnak ugyanabból a passzálásból. A vizsgálati vegyi anyagok és kontrollanyagok elkészített munkaadatait (500 µl) 1 : 1 arányban összekeverik 500 µl szuszpendált (1×10^6) sejttel, majd a sejteket a 20. és 21. pontban leírtak szerint 24 óráig ($\pm$ fél óra) inkubálják. Minden vizsgálatmenetben elegendő a vizsgálati vegyi anyag és a kontrollanyag egyes koncentrációit egy replikátumban mérni, mivel az előrejelzést legalább két független vizsgálatmenet alapján határozzák meg.

Sejtek festése és adatok elemzés

23. A 24 órás ($\pm$ fél óra) kezelést követően a sejteket a 24 lyukú lemezről mintacsövekbe helyezik, centrifugálással begyűjtik, majd 1 ml festő pufferben kétszer átmosás (szükség esetén be lehet iktatni további mosási lépéseket). A mosást követően a sejtek növekedését meggátolják 600 µl blokkoló oldattal (festő puffer 0,01 tömegszázalékos globulinnal (II-es,

III-as Cohn-frakció, humán eredetű; SIGMA, #G2388-10G vagy azzal egyenértékű)), majd a sejteket 4 °C-on 15 percre inkubálják. A blokkolást követően a sejteket három egyenlő 180 µl mennyiségű részre osztva 96 lyukú gömbölyű fenekű lemezbe vagy mikroszöbe helyezik.

24. A centrifugálást követően a sejteket 4 °C-on 30 percen át festik 50 µl FITC-vel jelzett anti-CD86, anti-CD54 vagy egér IgG1 (izotípus) ellenanyagokkal. A h-CLAT-ra vonatkozó 158. sz. DB-ALM protokollban (18) leírt ellenanyagokat kell alkalmazni festő pufferrel való 3 : 25 térfogatszázalékos hígításban a CD86 esetében (BD-PharMingen, #555657; Fun-1 klón), illetve 3 : 50 térfogatszázalékos hígításban a CD54 esetében (DAKO, #F7143; 6.5B5 klón) és az IgG1 esetében (DAKO, #X0927). Az ellenanyagok hígítási tényezőjét a vizsgálat kidolgozói határozták meg az alapján, hogy ezek biztosították a legjobb jel-zaj arányt. A vizsgálat kidolgozói által szerzett tapasztalatok arra utalnak, hogy az ellenanyagok fluoreszcencia-intenzitása a különböző tételeknél általában konzisztens. A legmegfelelőbb vizsgálati koncentrációértékek meghatározásához azonban a felhasználók fontolóra vehetik az ellenanyagok saját laboratóriumi körülményeik mellett történő titrálását. Más fluorokrómmal jelzett anti-CD86 és/vagy anti-CD54 ellenanyagok is alkalmazhatók, amennyiben például az 1.2. függelékben felsorolt jártassági tesztanyagok tesztelésével kimutatták, hogy a FITC-vel összekapcsolt ellenanyagokhoz hasonló eredményekre vezetnek. Megjegyzendő, hogy a h-CLAT-ra vonatkozó 158. sz. DB-ALM protokollban (18) leírt ellenanyag klón vagy forgalmazó lecserélése befolyással lehet az eredményekre. Miután legalább kétszer átmosták 150 µl festék pufferrel, a sejteket (pl. 400 µl) festék pufferben újrassuszpendálják, és hozzáadják a PI oldatot (pl. 20 µl mennyiségben, amellyel elérhető a végső 0,625 µg/ml koncentráció) vagy egy másik citotoxicitási marker oldatát (lásd a 18. pontot). A CD86 és a CD54 expressziójának mértékét és a sejtéletképességet áramlási citometriával elemzik.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Az adatok kiértékelése

25. A CD86 és a CD54 kifejeződését áramlási citometriával elemzik az FL-1 adatgyűjtő csatornán. A pozitív kontrollként szolgáló sejtek és a vegyi anyaggal kezelt sejtek CD86 és CD54 relatív fluoreszcencia-intenzitását (RFI) a fluoreszcencia-intenzitás mértani középértéke (MFI) alapján és az alábbi egyenlet szerint számítják ki:

$$RFI = \frac{\text{vegyi anyaggal kezelt sejtek MFI-je} - \text{vegyi anyaggal kezelt izotípusos kontrollsejtek MFI-je}}{\text{oldósz./vívőanyaggal kez. kontr.sejtek MFI-je} - \text{oldósz./vívőanyaggal kez. izotíp.kontr.sejtek MFI-je}} \times 100$$

Az izotípusos kontrollként szolgáló sejtek életképességét (amelyeket egér IgG1 (izotípus)

ellenanyagokkal festettek meg) szintén a 19. pontban feltüntetett egyenlettel határozzák meg.

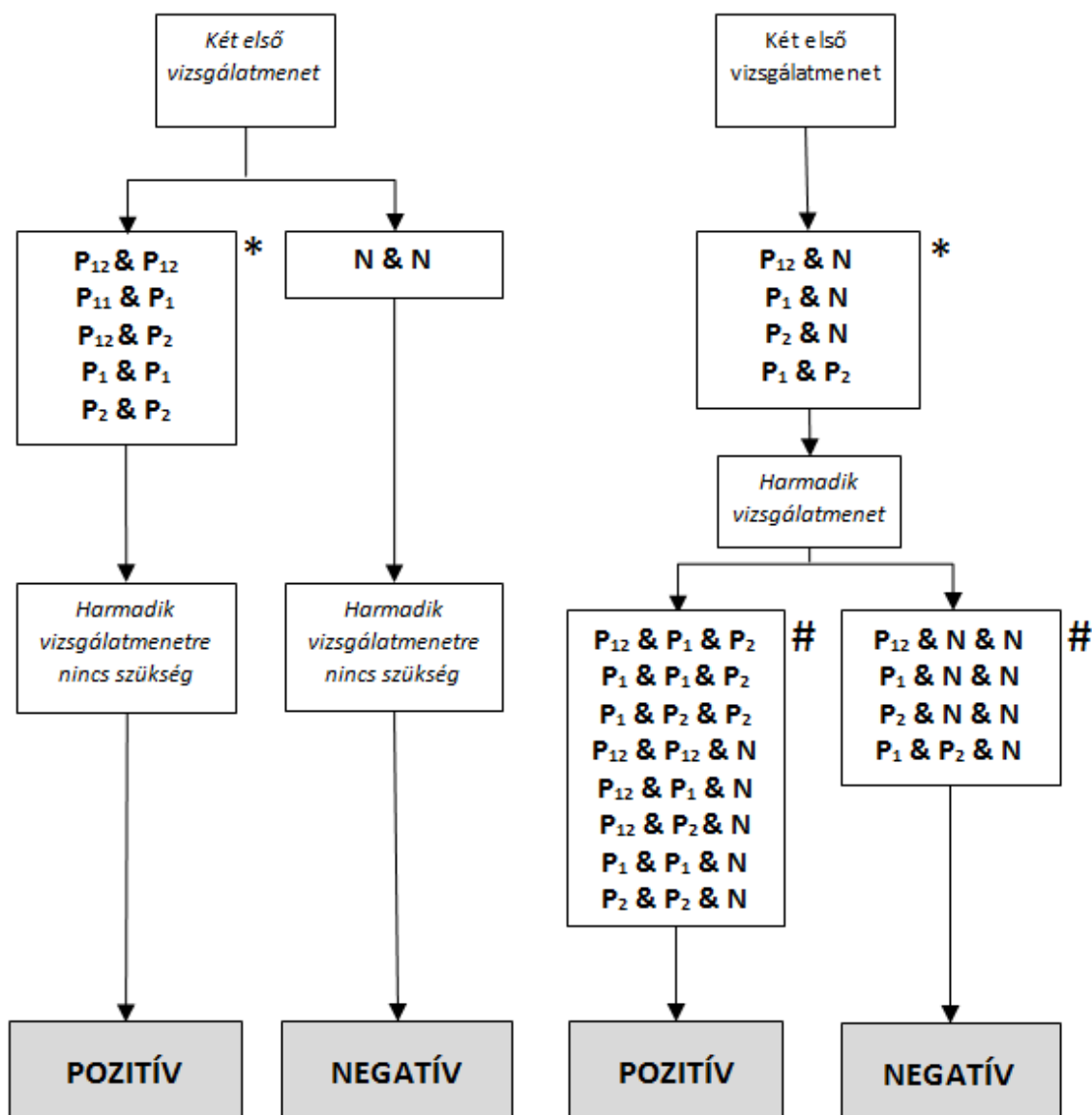
Előrejelzési modell

26. A *CD86/CD54* expressziós mérésnél minden vizsgálati vegyi anyagot legalább két független vizsgálatmenetben tesztelnek, amelyek alapján meghatározzák a (POZITÍV vagy NEGATÍV) előrejelzést. A h-CLAT előrejelzés akkor minősül POZITÍVNAK, ha két független vizsgálatmenetből kettőben vagy három független vizsgálatmenetből legalább kettőben az alábbi feltételek legalább egyike teljesül, minden egyéb esetben a h-CLAT előrejelzés negatívnak minősül (1. ábra):

- a CD86 relatív fluoreszcencia-intenzitása bármely vizsgált koncentrációban legalább 150 % (legalább 50 %-os sejtleletképeség mellett);
- a CD54 relatív fluoreszcencia-intenzitása bármely vizsgált koncentrációban legalább 200 % (legalább 50 %-os sejtleletképeség mellett).

27. A fentiek alapján, ha az első két vizsgálatmenet pozitív eredménnyel zárult a CD86 és/vagy a CD54 esetében, akkor a h-CLAT vizsgálat előrejelzése POZITÍVNAK tekintendő, és harmadik vizsgálatmenetre nincs szükség. Hasonlóképpen, ha az első két vizsgálatmenet mindkét marker tekintetében negatív, akkor a h-CLAT előrejelzése NEGATÍVNAK minősül (figyelembe véve a 30. pontban foglaltakat), és harmadik vizsgálatmenetre nincs szükség. Ha azonban az első két vizsgálatmenet eredményei legalább az egyik marker (CD54 vagy CD86) esetében nem egyeznek, el kell végezni egy harmadik vizsgálatmenetet, és a végső előrejelzés a három független vizsgálatmenet többségi eredményén (a háromból kettőjén) fog alapulni. Ezzel kapcsolatban megjegyzendő, hogy ha két független vizsgálatmenetben az egyik csak a CD86 tekintetében pozitív (a továbbiakban P_1) és a másik csak a CD54 esetében pozitív (a továbbiakban P_2), harmadik vizsgálatmenetre van szükség. Amennyiben a harmadik vizsgálatmenet mindkét marker esetében negatív eredménnyel jár (a továbbiakban N), akkor a h-CLAT vizsgálat előrejelzése NEGATÍVNAK tekintendő. Másfelől viszont, ha a harmadik vizsgálatmenet bármelyik marker (P_1 vagy P_2) esetében vagy mindkét marker (a továbbiakban P_{12}) esetében pozitív eredménnyel zárul, a h-CLAT vizsgálat előrejelzése POZITÍVNAK tekintendő.

1. ábra: A h-CLAT módszerben alkalmazott előrejelzési modell. A h-CLAT-tal végzett előrejelzést integrált értékelési és vizsgálati megközelítés keretében, valamint az Általános bevezetés 7. és 8. pontjának rendelkezéseivel összhangban kell figyelembe venni.



P₁: csak a CD86 tekintetében pozitív vizsgálatmenet; P₂: csak a CD54 tekintetében pozitív vizsgálatmenet; P₁₂: a CD54 és a CD86 tekintetében egyaránt pozitív vizsgálatmenet; N: sem a CD54, sem a CD86 tekintetében nem pozitív vizsgálatmenet.

*A keretekben az első két vizsgálatmenet eredményeinek releváns kombinációi szerepelnek, az eredmények sorrendjétől függetlenül.

#A keretek a három vizsgálatmenetből származó eredmények releváns kombinációit jelenítik meg az első két vizsgálatmenet fenti keretben látható eredményei alapján, nem tükrözik viszont az eredmények sorrendjét.

28. A h-CLAT vizsgálat által pozitívként előrejelzett vizsgálati vegyi anyagok esetében opcionálisan két hatáserősséget jelző koncentrációérték (EC) állapítható meg, a CD86 esetében az EC₁₅₀ és a CD54 esetében az EC₂₀₀, vagyis az a koncentráció, amelynél a vizsgálati vegyi anyagok relatív fluoreszcencia-intenzitása 150, illetve 200 százalék. Ezek az EC-értékek hozzájárulhatnak a szenzibilizáló hatás erősségének értékeléséhez (9), ha az integrált vizsgálati és értékelési megközelítéshez hasonló integrált megközelítések keretében alkalmazzák őket (4) (5) (6) (7) (8). Az alábbi egyenletekkel lehet kiszámítani értéküket:

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

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

ahol

az A_{conc} az a $\mu\text{g/ml}$ -ben megadott legalacsonyabb koncentráció, amelynél a relatív fluoreszcencia-intenzitás nagyobb mint 150 (CD86) vagy 200 (CD54)

a B_{conc} az a $\mu\text{g/ml}$ -ben megadott legmagasabb koncentráció, amelynél a relatív fluoreszcencia-intenzitás kisebb mint 150 (CD86) vagy 200 (CD54)

az A_{RFI} az a legalacsonyabb koncentrációjú relatív fluoreszcencia-intenzitás, ahol a relatív fluoreszcencia-intenzitás nagyobb mint 150 (CD86) vagy 200 (CD54)

a B_{RFI} az a legmagasabb koncentrációjú relatív fluoreszcencia-intenzitás, ahol a relatív fluoreszcencia-intenzitás kisebb mint 150 (CD86) vagy 200 (CD54)

Az EC₁₅₀ és az EC₂₀₀ érték pontosabb meghatározása érdekében szükség lehet arra, hogy a *CD86/CD54 expresszió mérését* három független vizsgálatmenetben végezzék el. Ez esetben a végső EC₁₅₀ és EC₂₀₀ értéket a három független vizsgálatmenetben kiszámolt EC-értékek középértékeként határozzák meg. Amikor három független vizsgálatmenetből csupán kettőben teljesülnek a pozitív előrejelzés kritériumai (lásd a 26–27. pontot), a két kiszámított EC₁₅₀ vagy EC₂₀₀ érték közül a magasabbat fogadják el.

Elfogadhatósági kritériumok

29. A h-CLAT módszer alkalmazásakor az alábbi elfogadhatósági kritériumoknak kell teljesülniük (22) (27).

- A tápoldatos és az oldószeres/vivőanyagok kontroll sejtéletképességének meg kell haladnia a 90 %-ot.
- Az oldószeres/vivőanyagok kontrollban sem a CD86, sem a CD54 relatív fluoreszcencia-intenzitása nem haladhatja meg a pozitív besoroláshoz szükséges kritériumot (CD86 esetén $RFI \geq 150 \%$ és CD54 esetén $RFI \geq 200 \%$). Az oldószeres/vivőanyagok kontroll

relatív fluoreszcencia-intenzitását a 25. pontban szereplő képlet alapján kell kiszámolni (a „vegyi anyag MFI értéke” helyett az „oldószer/vivőanyag MFI értékét”, az „oldószer/vivőanyag MFI értéke” helyett pedig a „tápoldatos kontroll MFI értékét” kell használni).

- Mind a tápoldatos kontroll, mind az oldószeres/vivőanyag kontroll során a CD86 és a CD54 esetében megállapított fluoreszcencia-intenzitás mértani középértékének izotípusos kontrollhoz viszonyított aránya meg kell, hogy haladja a 105 %-ot.
- A pozitív kontroll (DNCB) során a CD86 és a CD54 relatív fluoreszcencia-intenzitásának teljesítenie kell a pozitív besoroláshoz szükséges kritériumot (CD86 esetén $RFI \geq 150$ és CD54 esetén $RFI \geq 200$), 50 %-nál nagyobb sejtelétképesség mellett.
- A vizsgálati vegyi anyaggal elért sejtelétképességnek minden vizsgálatmenetben legalább négy vizsgált koncentrációban meg kell haladnia az 50 %-ot.

30. A negatív eredmény csak akkor elfogadható, ha a vizsgálati vegyi anyag legmagasabb vizsgált koncentrációja (vagyis a 20. pontban ismertetett oldatsorozat szerint az $1,2 \times CV75$) 90 %-nál alacsonyabb sejtelétképességet eredményez. Amennyiben az $1,2 \times CV75$ koncentráció által kiváltott sejtelétképesség eléri vagy meghaladja a 90 %-ot, a negatív eredményt figyelmen kívül kell hagyni. Ilyen esetben ajánlatos a CV75 újbóli meghatározásával pontosítani a dózisválasztást. Amennyiben azonban a vizsgálati vegyi anyag maximális vizsgált koncentrációja 5 000 $\mu\text{g/ml}$ sóoldatban (illetve tápoldatban vagy más oldószerben/vivőanyagban), 1 000 $\mu\text{g/ml}$ DMSO-ban vagy a legmagasabb még oldható koncentráció, a negatív eredmény 90 % fölötti sejtelétképesség esetén is elfogadható.

Vizsgálati jegyzőkönyv

31. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag

Egy összetevőből álló anyag

- kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;
- fizikai megjelenés, Log Kow, vízzoldékonyság, DMSO-ban való oldhatóság, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;

- tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;
- vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);
- vizsgált koncentráció(k);
- tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;
- az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében.

Több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek

- amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítójával (lásd fent), tisztaságával, mennyiségi előfordulásával és releváns fizikai-kémiai tulajdonságaival (lásd fent) jellemezve; amennyiben rendelkezésre állnak;
- fizikai megjelenés, vízdékonyság, DMSO-ban való oldhatóság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;
- molekulatömeg vagy látszólagos molekulatömeg ismert összetételű keverékek/polimerek esetén, vagy a vizsgálat lebonyolítása szempontjából releváns egyéb információ;
- vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);
- vizsgált koncentráció(k);
- tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;
- az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében.

Kontrollok

Pozitív kontroll

- kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;
- fizikai megjelenés, log K_{ow} , vízdékonyság, DMSO-ban való oldhatóság, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak és szükség szerint;
- tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;

- vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);
- vizsgált koncentráció(k);
- tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;
- adott esetben hivatkozás a pozitív történeti kontrollok eredményeire, amelyek a vizsgálatmenet elfogadhatósági kritériumainak való megfelelést bizonyítják.

Negatív és oldószeres/vivőanyagok kontroll

- kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;
- tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;
- fizikai megjelenés, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben a vizsgálati iránymutatásban említett kontroll oldószerektől/vivőanyagoktól eltérő oldószerek/vivőanyagok használatosak, és amennyiben rendelkezésre állnak;
- tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;
- az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében.

Vizsgálati körülmények

- a megbízó, a vizsgálatot végző laboratórium és a vizsgálatvezető neve és címe;
- az alkalmazott vizsgálat leírása;
- használt sejtvonala, annak tárolási feltételei és eredete (például az a létesítmény, ahonnan beszerezték);
- az alkalmazott áramlási citometria rendszer (pl. modell) és annak műszerbeállításai, valamint az alkalmazott globulin, ellenanyagok és citotoxicitási markerek;
- a vizsgálat végrehajtásában való, a jártassági tesztanyagok vizsgálatával megszerzett laboratóriumi jártasság bizonyítására alkalmazott eljárás és a vizsgálat idővel reprodukálható teljesítményének bizonyítására alkalmazott eljárás, pl. a dokumentált kontrolladatok és/vagy a dokumentált reaktivitási vizsgálatok adatai.

A vizsgálat elfogadhatósági kritériumai

- az oldószeres/vivőanyagok kontroll során kapott sejtelétkéesség, MFI és RFI az elfogadhatósági tartományokkal való összevetésben;
- a pozitív kontroll során kapott sejtelétkéesség és RFI az elfogadhatósági tartományokkal való összevetésben;
- a vizsgálati vegyi anyag minden vizsgált koncentrációjában mért sejtelétkéesség.

A vizsgálat menete

- az alkalmazott vizsgálatmenetek száma;
- a vizsgálati vegyi anyag koncentrációi, alkalmazása és a használt expozíciós idő (ha eltér az ajánlottól);
- az expozíció időtartama (ha eltér az ajánlottól);
- az alkalmazott értékelési és döntési kritériumok leírása;
- a vizsgálati eljárás bármilyen változtatásának leírása.

Eredmények

- az egyes vizsgálatmenetekben a vizsgálati vegyi anyaggal és a pozitív kontrollal kapott adatok táblázatba foglalása, feltüntetve a CV75 értéket (ha alkalmazandó), a fluoreszcencia-intenzitás mértani középértékét, a relatív fluoreszcencia-intenzitást, a sejtelétkéességi értékeket, az EC₁₅₀/EC₂₀₀ értéket (ha alkalmazandó), valamint a vizsgálati vegyi anyag előrejelzési modell szerinti besorolását;
- adott esetben bármely más releváns észrevétel leírása.

Az eredmények tárgyalása

- a h-CLAT módszerrel kapott eredmények tárgyalása;
- a vizsgálat eredményeinek integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében történő tárgyalása, amennyiben rendelkezésre állnak más releváns információk.

Következtetések

SZAKIRODALOM

- (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. A dokumentum az alábbi helyről elérhető: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J Appl Toxicol.* 35, 1318-1332.
- (5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. *J Appl Toxicol.* 35, 1333-1347.
- (6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul Toxicol Pharmacol.* 63, 489-504.
- (7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 69, 371-379.
- (8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R,

- Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol.* 71, 337-351.
- (9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch Toxicol.* 89, 2355-2383.
- (10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol.* DOI 10.1002/jat.3281.
- (11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro* 26, 1150-60.
- (12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). A dokumentum az alábbi helyről elérhető: <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 A dokumentum az alábbi helyről elérhető: <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 metabolizin

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. A dokumentum az alábbi helyről elérhető: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
- (19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamoto K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70-82.
- (20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, , Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89-96.
- (21) OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 2005, 96 pp.
- (22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No 168. Elérhető a következő címen: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- (23) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Elérhető a következő címen: 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.

1.1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: a vizsgálattal kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálat megfelelőségének mutatója, és relevanciájának egyik szempontja. A kifejezés gyakran használatos az „egyezés” szó megfelelőjeként, amely arra utal, hogy egy adott vizsgálat milyen arányban szolgáltat helyes eredményeket (21).

Káros kimeneti út (Adverse Outcome Pathway, AOP): valamely megcélzott vegyi anyag vagy hasonló vegyi anyagok csoportjának kémiai szerkezetéből kiinduló, a molekuláris kiváltó eseményen keresztül az érintett in vivo eredményig végbemenő eseménysorozat (22).

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

CV75: 75 %-os sejtleletképeséget eredményező becsült koncentráció.

EC150: a CD86 expressziója során 150 %-os relatív fluoreszcencia-intenzitást eredményező koncentrációk.

EC200: a CD54 expressziója során 200 %-os relatív fluoreszcencia-intenzitást eredményező koncentrációk.

Áramlási citometria: citometrikus technika, amelyben a folyadékáramban szuszpendált sejtek egyenként áthaladnak egy fókuszált gerjesztő fénynyalábon, amely a sejtekre és összetevőire jellemző minták szerint szóródik szét; a sejteket gyakran fluoreszcens markerekkel jelölik meg, amelyek az abszorbeált fényt eltérő frekvenciákon bocsátják ki.

Veszély: valamely anyag vagy helyzet azon sajátossága, hogy káros hatásokat képes előidézni az élő szervezet, rendszer vagy (al)populáció anyagnak való expozíciója során.

Integrált vizsgálati és értékelési megközelítés: valamely vegyi anyag vagy vegyi anyagcsoport veszélyeinek azonosításához (potenciál), jellemzéséhez (hatáserősség) és/vagy biztonsági értékeléséhez (potenciál, hatáserősség és expozíció) alkalmazott strukturált megközelítés, amely stratégiai szempontból beépít és mérlegel minden olyan releváns adatot, amely hozzájárul a lehetséges veszélyre és/vagy kockázatra és/vagy a további célirányos és ezért minimális vizsgálat szükségességére vonatkozó szabályozói döntéshozatalhoz.

Tápellátott kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó kezeltetlen replikátum. Ezt a mintát a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt mintákkal és más kontrollmintákkal együtt kell feldolgozni annak megállapításához, hogy az

oldószer/vivőanyag kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati rendszerrel.

Keverék: két vagy több anyagot tartalmazó elegy vagy oldat.

Egy összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben az egyik fő összetevő legalább 80 tömegszázalékban van jelen.

Több összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben egynél több fő összetevő legalább 10 tömegszázalékban, de 80 tömegszázalékot nem meghaladó koncentrációban van jelen. A több összetevőből álló anyag gyártási folyamat eredménye. A keverék és a több összetevőből álló anyag között az a különbség, hogy a keverék két vagy több anyag összekeverésével, kémiai reakció nélkül jön létre. A több összetevőből álló anyag kémiai reakció eredménye.

Pozitív kontroll a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó anyaggal kezelt replikátum. Annak biztosítása érdekében, hogy a pozitív kontrollban jelentkező hatás időbeli változását fel lehessen mérni, a pozitív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Pre-hapténok: abiotikus átalakulás révén szenzibilizálónvá váló vegyi anyagok.

Pro-hapténok: olyan vegyi anyagok, amelyek enzimatisz aktivációt igényelnek bőrszenzibilizáló hatásuk kifejtéséhez.

Relatív fluoreszcencia-intenzitás (RFI): a vegyi anyaggal kezelt sejteknél mért fluoreszcencia-intenzitás mértani középértékének (MFI) az oldószerrel/vivőanyaggal kezelt sejteknél mért fluoreszcencia-intenzitás mértani középértékéhez viszonyított relatív értéke.

Relevancia: a vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálat pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (21).

Megbízhatóság: a vizsgálat laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. Megállapítása a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság, valamint a laboratóriumon belüli megismételhetőség kiszámításával történik (21).

Vizsgálatmenet: egy vizsgálatmenet során egy vagy több vizsgálati vegyi anyagot vizsgálnak egy párhuzamos oldószeres/vivőanyagot kontrollal és egy pozitív kontrollal.

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálat helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálat pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálat relevanciájának megítélésében (21).

Festő puffer: 0,1 % borjú szérum albuminnal kiegészített foszfátpuffert tartalmazó sóoldat.

Oldószeres/vivőanyagok kontroll: valamely vizsgálati rendszernek a vizsgálati vegyi anyagon kívüli összes összetevőjét tartalmazó kezeletlen minta, amely azonban magában foglalja az alkalmazott oldószert/vivőanyagot. Az ugyanabban az oldószerben/vivőanyagban feloldott vagy stabilan diszpergált vizsgálati vegyi anyaggal kezelt minták esetében a kiindulási érték létrehozásához használatos. Párhuzamos tápoldatos kontrollal elvégzett vizsgálata esetén ez a minta azt is bizonyítja, hogy az oldószer/vivőanyag kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati rendszerrel.

Specificitás: a vizsgálat elvégzésével helyesen besorolt összes negatív/inaktív vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (21).

Anyag: olyan természetes állapotban előforduló vagy gyártási eljárásból származó kémiai elem és vegyületei, amely a stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagot és az alkalmazott eljárásból származó szennyező anyagokat is tartalmazhat, de nem tartalmaz olyan oldószert, amely az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltoztatása nélkül elkülöníthető.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

A vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete által globálisan harmonizált rendszere (ENSZ-GHS): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (23).

UVCB: ismeretlen szerkezetű vagy változó összetételű, összetett reakcióban keletkezett vagy biológiai eredetű anyagok.

Érvényes vizsgálat: olyan vizsgálat, amely kellően relevánsnak és megbízhatónak minősül egy adott célra, és amely tudományosan megalapozott elveken alapul. Egy-egy vizsgálat abszolút értelemben soha nem érvényes, kizárólag meghatározott céllal összefüggésben (21).

1.2. függelék

JÁRTASSÁGI TESZTANYAGOK

A B.71. vizsgálati módszer e függelékben ismertetett vizsgálatának rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak igazolniuk kell szakmai jártasságukat oly módon, hogy az 1. táblázatban javasolt 10 anyagra vonatkozóan a h-CLAT vizsgálattal várható előrejelzést helyesen kapják meg, továbbá a 10 jártassági tesztanyag közül legalább 8 esetben referenciatartományba eső CV75, EC₁₅₀ és EC₂₀₀ értékeket kapnak. A jártassági tesztanyagok kiválasztása oly módon történt, hogy az a bőrszenzibilizáció veszélye esetén bekövetkező különféle válaszreakciók tartományát illetően reprezentatív legyen. A kiválasztás többi kritériuma az volt, hogy a vegyi anyagok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők legyenek, azokra vonatkozóan kiváló minőségű in vivo referenciaadatok álljanak rendelkezésre, és a h-CLAT módszer alapján kiváló minőségű in vitro adatok álljanak rendelkezésre. A h-CLAT módszerhez rendelkezésre állnak publikált referenciaadatok is (3) (14).

1. táblázat: A h-CLAT módszerben való szakmai jártasság bizonyításához ajánlott anyagok

Jártassági tesztanyagok	CAS-szám	Halmazállapot	In vivo előrejelzés ¹	CV75 referenciatartomány μ g/ml-ben ²	h-CLAT eredmények CD86 esetén (EC ₁₅₀ referenciatartomány μ g/ml-ben) ²	h-CLAT eredmények CD54 esetén (EC ₂₀₀ referenciatartomány μ g/ml-ben) ²
2,4-dinitro-klór-benzol	97-00-7	Szilárd	Szenzibilizáló (szélsőségesen)	2-12	Pozitív (0,5-10)	Pozitív (0,5-15)
4-Fenilén-diamin	106-50-3	Szilárd	Szenzibilizáló (erősen)	5-95	Pozitív (< 40)	Negatív (> 1,5) ³
Nikkel-szulfát	10101-97-0	Szilárd	Szenzibilizáló (mérsékelten)	30-500	Pozitív (< 100)	Pozitív (10–100)
2-merkaptó-benzotiazol	149-30-4	Szilárd	Szenzibilizáló (mérsékelten)	30-400	Negatív (> 10) ³	Pozitív (10-140)
R(+)-limonén	5989-27-5	Folyadék	Szenzibilizáló (enyhén)	> 20	Negatív (> 5) ³	Pozitív (< 250)
Imidazolidinil-urea	39236-46-9	Szilárd	Szenzibilizáló (enyhén)	25–100	Pozitív (20-90)	Pozitív (20-75)
Izopropanol	67-63-0	Folyadék	Nem szenzibilizáló	> 5000	Negatív (> 5000)	Negatív (> 5000)
Glicerín	56-81-5	Folyadék	Nem szenzibilizáló	> 5000	Negatív (> 5000)	Negatív (> 5000)
Tejsav	50-21-5	Folyadék	Nem szenzibilizáló	1500-5000	Negatív (> 5000)	Negatív (> 5000)
4-Aminobezoesav	150-13-0	Szilárd	Nem szenzibilizáló	> 1000	Negatív (> 1000)	Negatív (> 1000)

Rövidítések: CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám.

¹ Az in vivo veszélyekre (és a hatásereőségre) vonatkozó előrejelzés LLNA-adatokon alapul (3) (14). Az in vivo hatásereőség levezetése az ECETOC által javasolt kritériumok segítségével történik (24).

² A megfigyelt dokumentált értékek alapján (13) (25).

³ Az ismert adatok alapján többnyire negatív eredményeket hozott ez a marker, ezért az esetek többségében negatív eredmény várható. A megadott tartományt a néhány pozitív történeti eredmény alapján határozták meg. Pozitív eredmény esetén az EC-értéknek az ismert referenciatartományon belül kell lennie.

2. függelék

***IN VITRO* BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ: U937 SEJTVONAL AKTIVÁLÁSI VIZSGÁLAT (U-SENS™)**

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

1. Az U-SENS™ vizsgálat mennyiségileg meghatározza az U937 humán hisztiocitikus limfóma sejtvonal monocitáinak és dendritikus sejtjeinek a szenzibilizáló anyagokkal való kezelést követően beinduló aktivációs folyamata által a sejtfelületi marker (CD86) expressziójában előidézett változást (1). A CD86 sejtfelületi marker U937 sejtvonalban mért expressziós szintjét felhasználják a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetésének alátámasztására.
2. Az U-SENS™ vizsgálatot egy, a L'Oréal által koordinált validálási vizsgálatban (2) értékelték, majd az állatkísérletek alternatív módszereinek uniós referencialaboratóriumának (EURL ECVAM) tudományos tanácsadó bizottsága (ESAC) elvégezte a vizsgálat független szakértői értékelését (3). A rendelkezésre álló bizonyítékok, valamint a szabályozó hatóságok és az érdekeltek álláspontja alapján az U-SENS™ vizsgálatot az EURL ECVAM (4) integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében történő alkalmazásra ajánlotta, a bőrszenzibilizáló és nem szenzibilizáló anyagok veszélyességi osztályozás és címkézés céljából történő megkülönböztetésének alátámasztására. A bőrszenzibilizációs integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében alkalmazott adatintegrálás és egyedi információforrások strukturált megközelítéseire vonatkozó jelentéstételről szóló iránymutatásában az OECD beszámol számos, különböző vizsgálati stratégiát és előrejelzési modellt ismertető esettanulmányról. A különféle kidolgozott megközelítések egyike az U-SENS™ vizsgálaton alapul (5). Az U-SENS™ alkalmazásából származó adatok és más információk, egyebek mellett a dokumentált adatok és az ismert hiteles humán adatok (6) együttes használatára a szakirodalom hoz példákat (4) (5) (7).
3. Az U-SENS™ vizsgálatról bebizonyosodott, hogy áthelyezhető a sejtenyészési technikák és az áramlási citometriás elemzés terén tapasztalattal rendelkező laboratóriumokba. A vizsgálatról várható előrejelzések reprodukálhatóságának mértéke laboratóriumon belül mintegy 90 %, laboratóriumok között pedig 84 % (8). A validálási vizsgálatban (8) és más közzétett tanulmányokban (1) kapott eredmények összességében azt jelzik, hogy az U-SENS™ a bőrszenzibilizáló (azaz az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozó) anyagokat az LLNA vizsgálati módszer eredményeihez képest 86 %-os (N=166) pontossággal különbözteti meg a nem szenzibilizáló anyagoktól, 91 % az érzékenysége

(118/129), a specifikussága pedig 65 % (24/37). A humán vizsgálatokból származó eredményekkel összevetve a bőrszenzibilizáló (vagyis az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozó) anyagokat 77 %-os (N=101) pontossággal különbözteti meg a nem szenzibilizáló anyagoktól, 100 % az érzékenysége (58/58), míg a specifikussága 47 % (20/43). Az LLNA módszerrel összevetve az U-SENSTM nagyobb valószínűséggel ad hamis negatív előrejelzést olyan vegyi anyagoknál, amelyeknek alacsonytól mérsékeltig terjedő a szenzibilizáló hatása (azaz az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1B. alkategóriába tartozó anyagoknál), mint a rendkívül bőrszenzibilizáló hatást mutató vegyi anyagoknál (azaz az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1A. alkategóriába tartozó anyagoknál) (1) (8) (9). Ezek az információk összességében azt jelzik, hogy az U-SENSTM vizsgálat érdemben hozzájárul a bőrszenzibilizáció veszélyének azonosításához. Az U-SENSTM mint önálló vizsgálat esetében itt megadott pontossági értékek azonban csak irányadók, ugyanis a vizsgálatot az integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében más információforrásokkal együtt és az Általános bevezetés 7. és 8. pontjának rendelkezéseivel összhangban kell figyelembe venni. Ezen túlmenően a bőrszenzibilizáció nem állatokon alkalmazott módszereinek értékelésekor nem szabad megfeleledkezni arról, hogy az LLNA vizsgálat, valamint más állatkísérletek nem feltétlenül tükrözik teljes egészében az embernél fennálló helyzetet.

4. A jelenleg rendelkezésre álló adatok alapján az U-SENSTM vizsgálatról megállapították, hogy alkalmazható különféle szerves funkciós csoportokat, fizikai-kémiai tulajdonságokat, (in vivo vizsgálatok során meghatározott) bőrszenzibilizáló hatásokat és a bőrszenzibilizációval összefüggésbe hozható reakciómechanizmusok spektrumát (Michael-akceptor, Schiff-bázis képződés, aciltranszfer ágens, bimolekuláris nukleofil szubsztitúció [SN₂] vagy aromás nukleofil szubsztitúció [SNA_r]) képviselő vizsgálati vegyi anyagokra (ezen belül kozmetikai összetevőkre, pl. tartósítószerre, felületaktív anyagokra, hatóanyagokra, festékekre) (1) (8) (9) (10). Az U-SENSTM vizsgálat olyan vizsgálati vegyi anyagokra alkalmazandó, amelyek megfelelő oldószerben/vivőanyagban (lásd a 13. pontot) oldhatók vagy azokkal stabil diszperziót alkotnak (azaz olyan kolloidot vagy szuszpenziót, amelyben a vizsgálati vegyi anyag nem ülepedik le, illetve nem válik szét az oldószertől/vivőanyagtól különböző fázisokra). Az U-SENSTM megfelelően előrejelezte azon vegyi anyagok besorolását is, amelyek az adatbázisban pre-hapténokként (oxidációval aktiválódó anyagokként) vagy pro-hapténokként (például a P450 enzim közreműködésével enzimatis aktivációt igénylő anyagokként) tartottak nyilván (1) (10). A membránt károsító anyagok viszont álpozitív eredményre vezethetnek a CD86 expressziójának nem specifikus növelése miatt, mivel az in vivo referenciabesoroláshoz képest kapott 7 álpozitív eredményből 3 felületaktív anyagnál fordult elő (1). Bár a felületaktív anyagokkal elért pozitív eredményeket körültekintően kell mérlegelni, a felületaktív anyagok negatív

eredménye használható a vizsgálati vegyi anyag nem bőrszenzibilizáló anyagként való azonosításának alátámasztására. Az U-SENSTM vizsgálat alkalmas fluoreszcens vizsgálati vegyi anyagok értékelésére (1), mindazonáltal azok az erősen fluoreszcens vizsgálati vegyi anyagok, amelyek a fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC), illetve a propídium-jodiddal (PI) azonos hullámhosszon bocsátják ki a fényt, zavarják az áramlási citometriás észlelést, ezért FITC-vel összekapcsolt ellenanyagokkal (potenciális hamis negatív eredmény), illetve propídium-jodiddal (nem mérhető életképesség) nem értékelhetők megfelelően. Ilyen esetben használhatók más fluorokrómmal jelzett ellenanyagok vagy más citotoxicitási markerek, ha például a 2.2. függelékben szereplő jártassági tesztanyagok vizsgálata révén bizonyítást nyert, hogy a FITC-vel jelzett ellenanyagokhoz vagy a propídium-jodidhoz (lásd a 18. pontot) hasonló eredményt biztosítanak. A fentiek fényében: a felületaktív anyagokkal kapott pozitív eredményeket és az erősen fluoreszcens vizsgálati vegyi anyagokkal elért negatív eredményeket a közölt korlátokra tekintettel és az integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretébe tartozó egyéb információforrásokkal összefüggésben kell értelmezni. Olyan esetekben, amikor bizonyítékkal igazolható, hogy az U-SENSTM vizsgálat nem alkalmazható más, konkrét vegyi anyag-kategóriákra, a vizsgálatot nem szabad e vegyi anyag-kategóriákra alkalmazni.

5. A fentieknek megfelelően az U-SENSTM vizsgálat elősegíti a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetését. Hozzájárulhat azonban a szenzibilizáló hatás erősségének értékeléséhez is, ha az integrált vizsgálati és értékelési megközelítéshez hasonló integrált megközelítések keretében alkalmazzák. Lehetőleg humán adatokon alapuló további munkára van azonban szükség annak meghatározásához, hogy az U-SENSTM eredményei hogyan járulhatnak hozzá a hatásereőség vizsgálatához.
6. A fogalommeghatározások a 2.1. függelékben találhatók.

A VIZSGÁLAT ELVE

7. Az U-SENSTM vizsgálat egy in vitro eljárás, amely a vizsgálati vegyi anyaggal való 45 ± 3 órás kezelést követően mennyiségileg meghatározza a CD86 sejtfelületi markernek egy humán hisztiocitikus limfóma sejtvonal, az U937 sejtekben történő kifejeződésében előidézett változásokat. A CD86 sejtfelületi marker az U937 sejtek aktivációjának egyik jellegzetes markere. A CD86 egy ismert kostimuláló molekula, amely képes imitálni a monociták aktivációját, ami kulcsszerepet játszik a T-sejtek elsődleges aktiválásában. A CD86 sejtfelületi marker expressziójának változásait áramlási citometriával mérik, miután a sejteket megfestették, többnyire fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) jelzett ellenanyagokkal. Ezzel egyidejűleg citotoxicitás-méréseket is végeznek (például propídium-jodiddal) annak felméréséhez, hogy a citotoxikus koncentrációknál alacsonyabb

koncentráció mellett fokozódik-e a CD86 felületi marker expressziója. Meghatározzák a CD86 felületi marker oldószeres/vivőanyagok kontrollhoz viszonyított stimulációs indexét (S.I.), amit felhasználnak az előrejelzési modellben (lásd a 19. pontot) a bőrszenzibilizáló és nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetésének alátámasztására.

A JÁRTASSÁG BIZONYÍTÁSA

8. A B.71. vizsgálati módszer e függelékben ismertetett vizsgálatának rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak a 2.2. függelékben felsorolt tíz jártassági tesztanyag in vitro módszerekre vonatkozó bevált gyakorlatokkal összhangban történő felhasználásával igazolniuk kell szakmai jártasságukat (11). Ezenfelül a vizsgálat felhasználóinak történeti adatbázist kell fenntartaniuk, amely tartalmazza a reaktivitási tesztekben (lásd a 11. pontot), valamint a pozitív és az oldószeres/vivőanyagok kontrollokból (lásd a 15–16. pontot) származó adatokat, ezekkel az adatokkal igazolva a vizsgálat laboratóriumon belüli hosszú távú reprodukálhatóságát.

ELJÁRÁS

9. Ez a vizsgálat az állatkísérletek alternatív módszereire vonatkozó adatbázis-szolgáltatás (DB-ALM) U-SENSTM-t érintő 183. protokollján (12) alapul. Az U-SENSTM vizsgálat laboratóriumi végrehajtása és igénybevétele során alkalmazni kell a szabványműveleti eljárásokat. Az U-SENSTM vizsgálat automatizált rendszerrel is elvégezhető, ha például a 2.2. függelékben felsorolt jártassági tesztanyagok vizsgálatával kimutatták, hogy hasonló eredményekre vezet. Az alábbiakban az U-SENSTM főbb összetevőinek és eljárásainak leírása található.

Sejtek előkészítése

10. Az U-SENSTM vizsgálat végrehajtásához az U937 humán hisztiocitikus limfóma sejtvonalat (13) kell használni. Ajánlatos a (CRL1593.2 klón) sejteket egy megfelelő minősítéssel rendelkező sejtbankból, például az Amerikai Fajtakultúra Gyűjteményből beszerezni.
11. Az U937 sejteket 10 % magzati borjú szérummal (FCS), 2 mM L-glutaminnal, 100 egység/ml penicillinnel és 100 µg/ml sztreptomocinnal kiegészített RPMI-1640 tápoldatban (teljes tápoldat), valamint 37 °C-os, 5 %-os CO₂-tartalmú és vízgőzzel telített környezetben kell tenyészteni. Az U937 sejteket 2 vagy 3 naponta 1,5 vagy 3×10^5 sejt/ml sűrűségben rutinszerűen passzálják. A sejtsűrűség nem lépheti túl a 2×10^6 sejt/ml mennyiséget, a tripankék festékkizárásos teszttel mért sejtleletképeségnek pedig legalább

90 %-osnak kell lennie (ez a felolvasztást követő első passzálásra nem vonatkozik). A vizsgálatban való felhasználásuk előtt a sejtek, a magzati borjú szérum és az ellenanyagok minden tételét egy reaktivitási teszt során minősíteni kell. A sejtek reaktivitási tesztjét a pozitív kontrollanyaggal, a pikrilszulfonsavval (2,4,6-trinitro-benzol-szulfonsav: TNBS) (CAS-száma: 2508-19-2, legalább 99 %-os tisztaságban) és a negatív kontrollanyaggal, a tejsavval (LA) (CAS-száma: 50-21-5, legalább 85 %-os tisztaságban) kell végrehajtani, legalább egy héttel a felolvasztásukat követően. A reaktivitási tesztben mindkét kontrollanyag esetén hat végső koncentrációt kell tesztelni (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 µg/ml és tejsav: 1, 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml). A teljes tápoldatban feloldott TNBS-nak a CD86 pozitív és koncentrációfüggő válaszát kell előidéznie (pl. amikor egy pozitív eredményt, vagyis legalább 150-es CD86 S.I. értéket adó koncentrációt követő koncentrációérték a CD86 ennél magasabb S.I. értékét váltja ki), a teljes tápoldatban feloldott tejsavnak pedig a CD86 negatív válaszát kell előidéznie (lásd a 21. pontot). A vizsgálathoz kizárólag a reaktivitási tesztben 2 alkalommal megfelelt sejtételek használhatók. A sejtek a felolvasztásukat követően hét hétig szaporíthatók. A sejteket legfeljebb 21 alkalommal szabad passzálni. A reaktivitási tesztet a 18-22. pontban leírt eljárások szerint kell végrehajtani.

12. A vizsgálathoz az U937 sejteket vagy 3×10^5 sejt/ml vagy 6×10^5 sejt/ml sűrűségben átoljtják, majd sejtenyészítő lombikban az előbbi esetben 2 napig, az utóbbiban pedig 1 napig előtenyésztik. A fentiekől eltérő előtenyésztési körülmények is alkalmazhatók, ha megfelelő tudományos indokolással támasztják alá alkalmazásukat, és ha például a 2.2. függelékben felsorolt jártassági tesztanyagok vizsgálatával kimutatták, hogy hasonló eredményekhez vezetnek. A vizsgálat napján a sejtenyészítő lombikból begyűjtött sejteket frissen készített tápfolyadékban 5×10^5 sejt/ml sűrűségben újrászuszpendálják. Ezt követően a sejteket egy 96 lyukú, lapos fenekű lemezre helyezik 100 µl mennyiségben (lyukanként $0,5 \times 10^5$ sejt végső sejtsűrűségben).

A vizsgálati vegyi anyagok és a kontrollanyagok előkészítése

13. A vizsgálat előtt felméri az anyagok oldhatóságát. Ebből a célból a vizsgálati vegyi anyagokat 50 mg/ml koncentrációban feloldják vagy stabilan diszpergálják teljes tápoldatban, mint az első számú oldószer választás, vagy dimetil-szulfoxidban (DMSO, ≥ 99 %-os tisztaságban), mint második oldószer/vivőanyag választás, ha a vizsgálati vegyi anyag a teljes tápoldatos oldószerben/vivőanyagban nem oldható. A vizsgálati vegyi anyagot a vizsgálathoz 0,4 mg/ml végső koncentrációban oldják fel a teljes tápoldatban, amennyiben a vegyi anyag oldható ebben az oldószerben/vivőanyagban. Ha a vegyi anyag csak DMSO-ban oldható, akkor 50 mg/ml-es koncentrációban oldják fel. A fentiekől eltérő oldószerek/vivőanyagok megfelelő tudományos indokolással szintén használhatók.

Figyelembe kell venni azt is, hogy a vizsgálati vegyi anyag mennyire stabil a végső oldószerben/vivőanyagban.

14. A vizsgálati vegyi anyagokat és a kontrollanyagokat a vizsgálat napján kell előkészíteni. Mivel dózisbehatároló vizsgálatra nem kerül sor, az első vizsgálatmenetben 6 végső koncentrációt kell vizsgálni (1, 10, 20, 50, 100 és 200 µg/ml) a megfelelő oldószerben/vivőanyagban, amely vagy a teljes tápoldat, vagy 0,4 % DMSO-t tartalmazó tápoldat. A további vizsgálatmenetekben a megfelelő oldószerben/vivőanyagban legalább 4 munkaoldatot (vagyis legalább 4 koncentrációt) kell készíteni a vizsgálati vegyi anyagokból 0,4 mg/ml-től kezdve teljes tápoldat használata esetén, vagy 50 mg/ml-től kezdve DMSO használata esetén. A munkaoldatokat végül felhasználják a kezeléshez, ehhez a további kétszeres hígítás (12) érdekében a lemezbe helyezett munkaoldat térfogatával megegyező térfogatú U937 sejtuszpenziót (lásd a fenti 11. pontot) adagolnak a munkaoldatokhoz. Az esetleges további vizsgálatmenetekben alkalmazott legalább 4 koncentrációt az előző vizsgálatmenetek eredményei alapján határozzák meg (8). A következő végső koncentrációértékek használhatók: 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 és 200 µg/ml. A maximális végső koncentráció a 200 µg/ml. Amennyiben a CD86 már 1 µg/ml koncentrációnál pozitív választ eredményez, akkor a 0,1 µg/ml koncentráció értékelésével megkeresik a vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációját, amely nem indukál pozitív küszöbérték feletti CD86 kifejeződést. Ha a CD86 kifejeződés során pozitív koncentráció-válasz figyelhető meg, minden vizsgálatmenetben ki kell számolni az EC₁₅₀ értéket (ez a vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amelynél a CD86 eléri a pozitív besoroláshoz szükséges 150 %-os küszöbértéket, lásd a 19. pontot). Amikor a vizsgálati vegyi anyag által előidézett pozitív CD86 válasz nem hozható összefüggésbe a koncentrációval, akkor előfordulhat, hogy az U-SENSTM-re vonatkozó 183. sz. DB-ALM protokollban leírtak szerint (12) az EC₁₅₀ érték a vizsgálat szempontjából nem releváns. Amikor csak lehetséges, minden vizsgálatmenetben meg kell határozni CV70 értéket (12) (ez a vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amelynél a citotoxicitás eléri a 70 %-os küszöbértéket, lásd a 19. pontot). Annak megállapításához, hogy a CD86 expresszió növekedése összefüggésben áll-e a koncentráció növekedésével, a használható koncentrációk közül kiválasztott koncentrációértékeknek egyenletesen kell eloszlaniuk az EC₁₅₀ (vagy a legmagasabb, még negatív eredményhez vezető, nem citotoxikus koncentráció) és a CV70 (vagy a megengedett legmagasabb koncentráció, vagyis 200 µg/ml) között. Vizsgálatmenetenként legalább 4 koncentrációt kell vizsgálni, amelyek közül legalább kettőnek meg kell egyeznie az előző vizsgálatmenet(ek)ben alkalmazott koncentrációkkal, hogy összehasonlíthatók legyenek az eredmények.

15. Az U-SENS™ vizsgálatban alkalmazott oldószeres/vivőanyagok kontroll a teljes tápoldat (a feloldott vagy stabilan diszpergált vizsgálati vegyi anyagok esetében) (lásd a 4. pontot) vagy a 0,4 % DMSO-t tartalmazó teljes tápoldat (a DMSO-ban feloldott vagy stabilan diszpergált vizsgálati vegyi anyagok esetében).
16. Az U-SENS™ vizsgálat során használt pozitív kontrollanyag a TNBS (lásd a 11. pontot), amelyet teljes tápoldatban készítenek el. A CD86 expresszió mérésénél pozitív kontrollanyagként használt TNBS-t egyetlen végső (50 µg/ml) koncentrációban vizsgálják a lemezen, amely 70 % feletti sejtleletképeséget biztosít. Ahhoz, hogy 50 µg/ml koncentrációjú TNBS kerüljön a lemezre, teljes tápoldatban elkészítik a TNBS 1 M (azaz 293 mg/ml) koncentrációjú törzsoldatát, majd a törzsoldatot teljes tápoldattal a 2930-szorosára hígítva elkészítik a 100 µg/ml koncentrációjú munkaoldatot. Negatív kontrollanyagként tejsavat (LA, CAS-száma: 50-21-5) kell alkalmazni, teljes tápoldatban 200 µg/ml koncentrációban feloldva (amelyet 0,4 mg/ml koncentrációjú törzsoldatból készítenek el). Minden vizsgálatmenet valamennyi lemezén a teljes tápoldatból álló kezeletlen kontrollt, az oldószeres/vivőanyagok kontrollt, a negatív és a pozitív kontrollt egyaránt triplikátumban kell elkészíteni (12). Alkalmazhatók más, megfelelő pozitív kontrollok is, ha rendelkezésre állnak dokumentált adatok hasonló vizsgálatmenet-elfogadhatósági kritériumok származtatásához. A vizsgálatmenet elfogadhatósági kritériumai megegyeznek a vizsgálati vegyi anyag elfogadhatósági kritériumaival (lásd a 12. pontot).

A vizsgálati vegyi anyagok és a kontrollanyagok alkalmazása

17. A 14–16. pontban leírt módon elkészített oldószeres/vivőanyagok kontrollt vagy munkaoldatokat 1 : 1 térfogatszázalék arányban összekeverik a 96 lyukú lapos fenékű lemezen elkészített sejtszuspenziókkal (lásd a 12. pontot). A kezelt lemezeket ezt követően 45 óráig (± 3 óra) 37 °C-on 5 % CO₂ jelenlétében inkubálják. Inkubálás előtt a lemezeket félig áteresztő membránnal lezárják, hogy megelőzzék az illékony vizsgálati vegyi anyagok elpárolgását és a vizsgálati vegyi anyagokkal kezelt sejtek közötti keresztszennyeződés kialakulását (12).

Sejtfestés

18. A 45 órás (± 3 óra) inkubálást követően a sejteket V-aljú mikrotiterlemezekbe helyezik át és centrifugálással kinyerik őket. A vizsgálat kimenetelét zavaró oldhatósági problémát jelez, ha a 45 ± 3 órás kezelés utáni inkubálást követően (még sejtfestés előtt) mikroszkóp alatt kristályok vagy cseppek figyelhetők meg. A felülúszót eltávolítják, a maradék sejteket pedig egyszer átmoszák 100 µl jéghideg, 5 % magzati borjú szérummal kiegészített, foszfátpuffert tartalmazó sóoldattal (festő pufferrel). A centrifugálást követően a sejteket

100 µl festő pufferben újrasszuszpendálják, majd 30 percen keresztül, 4 °C-on, fénytől védve megfestik 5 µl (pl. 0,25 µg) FITC-vel jelzett anti-CD86 vagy egér IgG1 (izotípus) ellenanyagokkal. Az U-SENSTM-re vonatkozó 183. sz. DB-ALM protokollban (12) leírt ellenanyagokat kell használni (a CD86 esetében: BD-PharMingen #555657 Fun-1 klón vagy Caltag/Invitrogen #MHCD8601 BU63 klón; az IgG1 esetében: BD-PharMingen #555748 vagy Caltag/Invitrogen #GM4992). A vizsgálat kidolgozói által szerzett tapasztalatok arra utalnak, hogy az ellenanyagok fluoreszcencia-intenzitása a különböző tételeknél általában konzisztens. A vizsgálathoz használhatók a reaktivitási tesztben megfelelt egyéb ellenanyag klónok vagy forgalmazók is (lásd a 11. pontot). A legmegfelelőbb vizsgálati koncentráció meghatározásához azonban a felhasználók fontolóra vehetik az ellenanyagok saját laboratóriumi körülményeik mellett történő titrálását. Más detektálási rendszerek, többek között fluorokrómmal jelzett anti-CD86 ellenanyagok is alkalmazhatók, amennyiben például a 2.2. függelékben felsorolt jártassági tesztanyagok tesztelésével kimutatták, hogy a FITC-vel összekapcsolt ellenanyagokhoz hasonló eredményekre vezetnek. Miután 100 µl festő pufferrel kétszer, 100 µl jéghideg PBS-sel egyszer átmossák a sejteket, újrasszuszpendálják őket jéghideg PBS-ben (pl. 125 µl-ben, ha a mintákat manuálisan, csövenként elemzik, vagy 50 µl-ben, ha automatikus mintavevő lemezt használnak), majd propídium-jodid oldatot adnak hozzájuk (3 µg/ml végső koncentrációban). Más citotoxicitási markerek – például 7-amino-aktinomicin D (7-AAD) vagy tripának – is alkalmazhatók, amennyiben az alternatívaként használt festékről például a 2.2. függelékben felsorolt jártassági tesztanyagok vizsgálatával kimutatták, hogy a propídium-jodidhoz hasonló eredményekre vezet.

Áramlási citometria elemzés

19. A CD86 expressziójának mértékét és a sejttételekességet áramlási citometriával elemzik. A sejteket a méretük (FSC, előre felé irányuló szórás) és granuláltságuk (SCC, oldalra irányuló szórás) alapján felhődiagramon (logaritmikus skálán) ábrázolják, amely lehetővé teszi az első kapun (R1) kiválasztott sejtpopuláció egyértelmű azonosítását és a sejttöredékek eltávolítását. Lyukanként összesen 10 000 célsejt adatait gyűjtik össze az R1 kapuzás során. Az azonos R1 kapunál mért sejteket FL3 vagy FL4/SSC arányt vizsgáló felhődiagramon jelenítik meg. Az élő sejteket egy második, R2 kapu elhelyezésével különítik el, amelynek segítségével kiválasztják a propídium-jodid negatív sejtpopulációt (FL3 vagy FL4 csatorna). A sejttételekességet az alábbi egyenlet alapján kalkulálja ki a citométer elemzőprogramja. Alacsony sejttételekességnél az elhalt sejtekkel együtt akár 20 000 sejt adatait is összegyűjthetik. Ennek alternatívája lehet az, amikor az adatokat az elemzés elindításától számítva egy percen át gyűjtik.

$$\text{Sejtéletképesség} = \frac{\text{élő sejtek száma}}{\text{összegyűjtött sejtek száma összesen}} \times 100$$

Ezt követően megméri az R2 kapuval kiválasztott élő sejtek közötti FL1 pozitív sejtek arányát (R1-en belül). Az élő sejteken (R2) a CD86 sejtfelületi kifejeződését FL1/SSC arányt vizsgáló felhődiagrammal elemzik.

A teljes tápoldatot/IgG1-et tartalmazó lyukak esetében az elemző markert a fő sejtpopuláció közelébe helyezik, hogy a teljes tápoldat kontrollok IgG1 ellenanyagai a 0,6–0,9 %-os céltartományba essenek.

A színinterferenciát az FITC-vel jelzett IgG1 felhődiagram eltolódása jelzi (IgG1 FL1 S.I. mértani középértéke ≥ 150 %).

A kezeletlen vagy 0,4 %-os DMSO-val kezelt kontrollsejtek és a vegyi anyaggal kezelt sejtek CD86 expressziójának stimulációs indexét (S.I.) az alábbi egyenlettel számítják ki:

$$S.I. = \frac{CD86^{+} \text{ kezelt sejtek } \% - a - IgG1^{+} \text{ kezelt sejtek } \% - a}{CD86^{+} \text{ kontrollsejtek } \% - a - IgG1^{+} \text{ kontrollsejtek } \% - a} \times 100$$

A kezeletlen kontrollsejtek IgG1⁺ aránya: az elemző markerrel jelölt FL1 pozitív IgG1 sejtek aránya (elfogadhatósági tartomány: legalább 0,6 % és kisebb mint 1,5 %, lásd a 22. pontot) az élő kezeletlen sejtekhez képest.

A kontroll/kezelt sejtek IgG1⁺/CD86⁺ aránya: az FL1 pozitív IgG1/CD86 sejtek elemző marker áthelyezése nélkül mért aránya az élő kontroll/kezelt sejtekhez képest.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Az adatok kiértékelése

20. Az U-SENSTM vizsgálatban az alábbi paramétereket kell kiszámítani: CV70 érték, vagyis az a koncentráció, amely az U937 sejtek 70 %-os túlélését eredményezi (30 %-os citotoxicitás) és az EC₁₅₀ érték, vagyis az a koncentráció, amelynél a vizsgálati vegyi anyag 150 %-os CD86 stimulációs indexet (S.I.) idéz elő.

A CV70 értéket logaritmikus-lineáris interpolációval számítják ki, az alábbi egyenlet alapján:

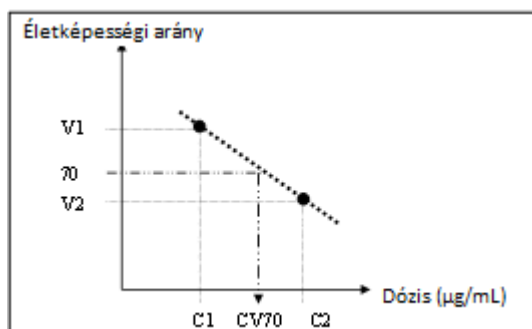
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

ahol:

V1 = a 70 % feletti sejtéletképesség minimumértéke

V2 = a 70 % alatti sejtéletképesség maximumértéke

C1 és C2 = a V1 és V2 sejtéletképességet előidéző koncentráció



A CV70 érték más módon is meghatározható, amennyiben (pl. a jártassági tesztanyagok tesztelésével) igazolható, hogy az nem befolyásolja az eredményt.

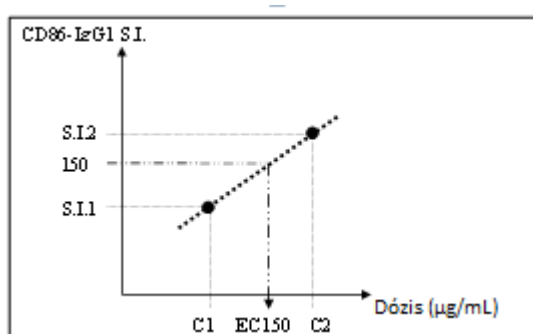
A EC150 értéket logaritmusos-lineáris interpolációval számítják ki, az alábbi egyenlet alapján:

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

ahol:

C1 az a µg/ml-ben megadott legmagasabb koncentráció, amelynél a CD86 stimulációs indexe kisebb mint 150 % (S.I. 1);

C2 az a µg/ml-ben megadott legalacsonyabb koncentráció, amelynél a CD86 stimulációs indexe legalább 150 % (S.I. 2).



Az EC150 és CV70 érték kiszámolása

- minden vizsgálatmenet esetében: az egyes EC150 és CV70 értékek annak meghatározására szolgálnak, hogy a CD86 expressziójának növekedése összefüggésben áll-e a koncentráció növekedésével (lásd a 14. pontot),
- az átlagos sejtéletképesség alapján meghatározzák az összesített CV70 értéket (12),

- a CD86 értékek átlagos stimulációs indexe alapján meghatározzák az összesített EC150 értéket, amely szerint az U-SENS™ vizsgálatban előrejelzik a vizsgálati vegyi anyag POZITÍV besorolását (lásd a 21. pontot) (12).

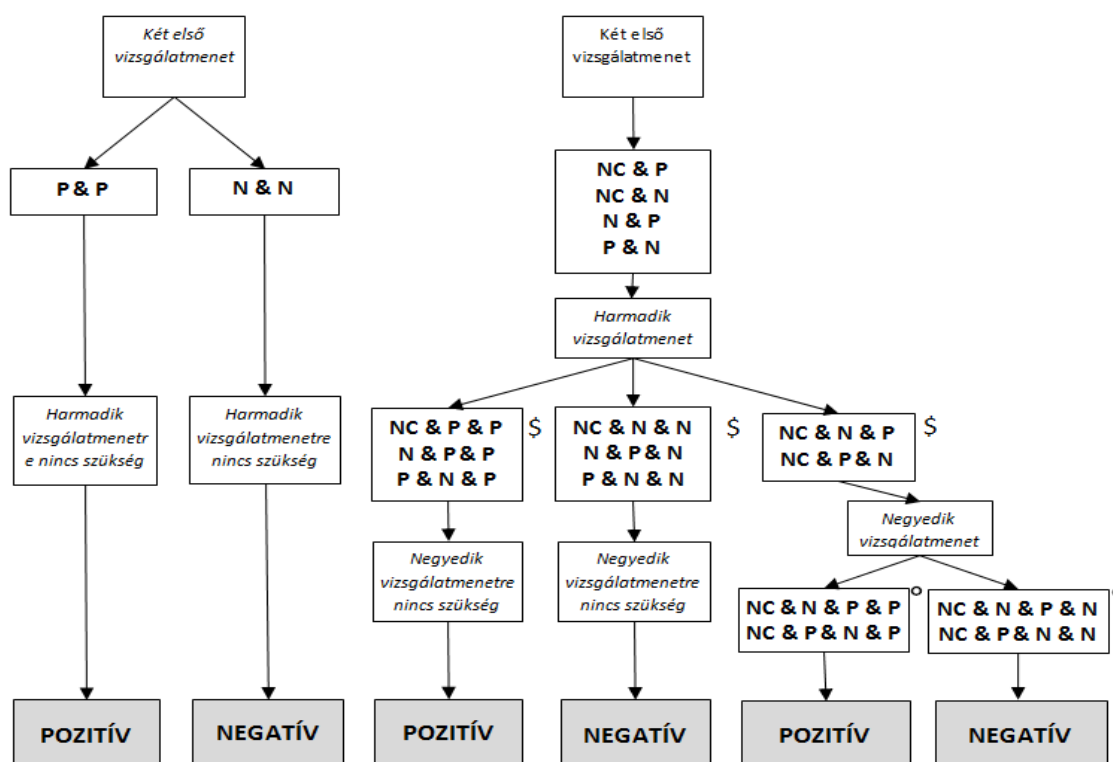
Előrejelzési modell

21. A CD86 expressziós mérésnél minden vizsgálati vegyi anyagot legalább négy koncentrációban és legalább két független (különböző napokon végzett) vizsgálatmenetben tesztelnek, amelyek alapján meghatározzák a (NEGATÍV vagy POZITÍV) előrejelzést.

- Az U-SENS™ vizsgálat egyes vizsgálatmeneteinek eredménye akkor negatív (a továbbiakban N), ha a CD86 stimulációs indexe valamennyi nem citotoxikus koncentrációban (amikor a sejtleletkéesség $\geq 70\%$) kisebb mint 150 %, és ha nem állt elő a vizsgálat kimenetelét zavaró körülmény (citotoxicitási, oldhatósági interferencia: lásd a 18. pontot, vagy színinterferencia: lásd a 19. pontot, függetlenül az interferenciát előidéző nem citotoxikus koncentrációktól). Minden más esetben: a CD86 stimulációs indexe eléri vagy meghaladja a 150 %-ot és/vagy interferenciát figyeltek meg, akkor az U-SENS™ egyes vizsgálatmeneteinek eredménye pozitív (a továbbiakban P).
- Az U-SENS™ vizsgálat előrejelzése akkor tekinthető NEGATÍVNAK, ha legalább két független vizsgálatmenet negatív (N) eredménnyel zárult (1. ábra). Ha az első két vizsgálatmenet mindegyike negatív (N) eredményre vezetett, az U-SENS™ vizsgálat előrejelzése NEGATÍVNAK minősül, és harmadik vizsgálatmenetre nincs szükség.
- Az U-SENS™ vizsgálat előrejelzése akkor tekinthető POZITÍVNAK, ha legalább két független vizsgálatmenet pozitív (P) eredménnyel zárult (1. ábra). Ha az első két vizsgálatmenet mindegyike pozitív (P) eredményre vezetett, az U-SENS™ vizsgálat előrejelzése POZITÍVNAK minősül, és harmadik vizsgálatmenetre nincs szükség.
- Mivel dózisbehatároló vizsgálatra nem kerül sor, ez alól kivételt képez az az eset, amikor az első vizsgálatmeneten a CD86 stimulációs indexe csak a legmagasabb nem citotoxikus koncentrációban éri el vagy haladja meg a 150 %-ot. Ekkor a vizsgálatmenetet NEM MEGGYŐZŐNEK (NC) kell tekinteni, és újabb vizsgálatmenetekben meg kell vizsgálni további, a legmagasabb nem citotoxikus koncentráció és a legalacsonyabb citotoxikus koncentráció közé eső koncentrációértékeket (lásd a 20. pontot). Amennyiben valamely vizsgálatmenetet nem meggyőzőnek értékelnek, legalább két további vizsgálatmenetet kell lefolytatni, illetve egy negyediket is, ha a 2. és a 3. vizsgálatmenet eredményei nem egyeznek (független vizsgálatban N és/vagy P) (1. ábra). A további vizsgálatmenetek abban az esetben is pozitívnak minősülnek, ha a CD86 expressziója csak egyetlen nem citotoxikus koncentrációban éri el vagy haladja meg a 150 %-ot, mivel a koncentrációértékeket az adott vizsgálati vegyi anyagra igazították. A végső előrejelzés a

három vagy négy független vizsgálatmenet többségi eredményén alapul (vagyis 3-ból 2 vagy négyből 2 eredményén) (1. ábra).

1. ábra: Az U-SENSTM vizsgálatban alkalmazott előrejelzési modell. Az U-SENSTM vizsgálat előrejelzését integrált értékelési és vizsgálati megközelítés keretében, valamint a 4. pont és az Általános bevezetés 7., 8. és 9. pontjának rendelkezéseivel összhangban kell figyelembe venni.



N: olyan vizsgálatmenet, amelyben nem figyeltek meg sem pozitív CD86 expressziót, sem interferenciát;

P: olyan vizsgálatmenet, amelyben pozitív CD86 expressziót és/vagy interferenciá(ka)t figyeltek meg;

NC: nem meggyőző. Az első vizsgálatmenet akkor minősül nem meggyőzőnek, ha a CD86 csak a legmagasabb nem citotoxikus koncentrációban pozitív.

#: amennyiben csak az első vizsgálatmenetet nem meggyőzőnek (NC) nyilvánítják, automatikusan szükség van egy harmadik vizsgálatmenetre is, hogy 3 független vizsgálatmenetből legalább 2-ben pozitív (P) vagy negatív (N) többséget lehessen elérni.

\$: a keretek a három vizsgálatmenetből származó eredmények releváns kombinációit jelenítik meg az első két vizsgálatmenet fenti keretben látható eredményei alapján.

°: a keretek a négy vizsgálatmenetből származó eredmények releváns kombinációit jelenítik meg az első három vizsgálatmenet fenti keretben látható eredményei alapján.

Elfogadhatósági kritériumok

22. Az U-SENS™ vizsgálat alkalmazásakor az alábbi elfogadhatósági kritériumoknak kell teljesülniük (12).

- A 45 ± 3 órás expozíciós időtartam végére a triplikátumban vizsgált kezeletlen U937 sejtek átlagos életképességének meg kell haladnia a 90 %-ot, és a CD86 expressziója nem tolódhat el. A kezeletlen U937 sejtek CD86 bazális expressziójának a legalább 2 % és legfeljebb 25 % közötti tartományban kell lennie.
- Ha DMSO-t használnak oldószerként, a DMSO vivőanyagok kontroll érvényességét úgy mérik fel, hogy meghatározzák a DMSO kezeletlen sejtekhez viszonyított stimulációs indexét, ugyanakkor a triplikátumban vizsgált sejtek átlagos életképességének meg kell haladnia a 90 %-ot. A DMSO vivőanyagok kontroll akkor tekinthető érvényesnek, ha a triplikátumban vizsgált CD86 stimulációs indexének átlaga nem éri el a kezeletlen U937 sejtek triplikátumban vizsgált CD86 S.I. átlagának 250 %-át.
- A vizsgálatmenetek akkor minősülnek érvényesnek, ha a kezeletlen U937 sejtek három IgG1 értéke közül minimum kettő legalább 0,6 % és kisebb mint 1,5 %.
- A párhuzamosan vizsgált negatív kontroll (tejsav) akkor tekinthető érvényesnek, ha a három replikátumból legalább kettő negatív (CD86 S.I. < 150 %) és nem citotoxikus (sejtéletképesség ≥ 70 %).
- A pozitív kontroll (TNBS) akkor érvényes, ha a három replikátumból legalább kettő pozitív (CD86 S.I. ≥ 150 %) és nem citotoxikus (sejtéletképesség ≥ 70 %).

Vizsgálati jegyzőkönyv

23. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag

Egy összetevőből álló anyag

- kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;
- fizikai megjelenés, teljes tápoldatban való oldhatóság, DMSO-ban való oldhatóság, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;
- tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;
- vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

- vizsgált koncentráció(k);
- tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;
- az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében.

Több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek:

- amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítójával (lásd fent), tisztaságával, mennyiségi előfordulásával és releváns fizikai-kémiai tulajdonságaival (lásd fent) jellemezve; amennyiben rendelkezésre állnak;
- fizikai megjelenés, teljes tápoldatban való oldhatóság, DMSO-ban való oldhatóság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;
- molekulatömeg vagy látszólagos molekulatömeg ismert összetételű keverékek/polimerek esetén, vagy a vizsgálat lebonyolítása szempontjából releváns egyéb információ;
- vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);
- vizsgált koncentráció(k);
- tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;
- az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében.

Kontrollok

Pozitív kontroll

- kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;
- fizikai megjelenés, DMSO-ban való oldhatóság, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak és szükség szerint;
- tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;
- vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);
- vizsgált koncentráció(k);
- tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;

- adott esetben hivatkozás a pozitív történeti kontrollok eredményeire, amelyek a vizsgálatmenet elfogadhatósági kritériumainak való megfelelést bizonyítják.

Negatív és oldószeres/vivőanyagok kontroll

- kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;
- tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;
- fizikai megjelenés, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben a vizsgálati iránymutatásban említett kontroll oldószerektől/vivőanyagoktól eltérő oldószerek/vivőanyagok használatosak, és amennyiben rendelkezésre állnak;
- tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;
- az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében.

Vizsgálati körülmények

- a megbízó, a vizsgálatot végző laboratórium és a vizsgálatvezető neve és címe;
- az alkalmazott vizsgálat leírása;
- használt sejtvonala, annak tárolási feltételei és eredete (például az a létesítmény, ahonnan beszerezték);
- az alkalmazott áramlási citometria rendszer (pl. modell) és annak műszerbeállításai, valamint az alkalmazott ellenanyagok és citotoxicitási markerek;
- a vizsgálat végrehajtásában való, a jártassági tesztanyagok vizsgálatával megszerzett laboratóriumi jártasság bizonyítására alkalmazott eljárás és a vizsgálat idővel reprodukálható teljesítményének bizonyítására alkalmazott eljárás, pl. a dokumentált kontrolladatok és/vagy a dokumentált reaktivitási vizsgálatok adatai.

A vizsgálat elfogadhatósági kritériumai

- az oldószeres/vivőanyagok kontroll során kapott sejtéletképesség és CD86 stimulációs index az elfogadhatósági tartományokkal való összevetésben;
- a pozitív kontroll során kapott sejtéletképesség és stimulációs index az elfogadható tartományokkal való összevetésben;

- a vizsgálati vegyi anyag minden vizsgált koncentrációjában mért sejtéletképesség.

A vizsgálat menete

- az alkalmazott vizsgálatmenetek száma;
- a vizsgálati vegyi anyag koncentrációi, alkalmazása és a használt expozíciós idő (ha eltér az ajánlottól);
- az expozíció időtartama;
- az alkalmazott értékelési és döntési kritériumok leírása;
- a vizsgálati eljárás bármilyen változtatásának leírása.

Eredmények

- az egyes vizsgálatmenetekben a vizsgálati vegyi anyaggal és a pozitív kontrollal kapott eredmények táblázatba foglalása, feltüntetve a CV70 értéket (ha alkalmazandó), a stimulációs indexet, a sejtéletképességi értékeket, az EC₁₅₀ értéket (ha alkalmazandó), valamint a vizsgálati vegyi anyag előrejelzési modell szerinti besorolását;
- adott esetben bármely más releváns észrevétel leírása.

Az eredmények tárgyalása

- az U-SENSTM vizsgálattal kapott eredmények tárgyalása;
- a vizsgálat eredményeinek integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében történő tárgyalása, amennyiben rendelkezésre állnak más releváns információk.

Következtetések

SZAKIRODALOM

- (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. A dokumentum az alábbi helyről elérhető: 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. Elérhető a következő címen: [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. Elérhető a következő címen: <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing>.
- (5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014. *Cosmetics* 3, 14.
- (6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen: [<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.

- (8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.
- (9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehn, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.
- (10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683-1696.
- (11) OECD. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen: 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-SENS™), 33pp. A dokumentum az alábbi helyről elérhető: [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. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (15) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: United Nations Publications. Elérhető a következő címen: 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. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. Elérhető a következő címen: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

2.1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: a vizsgálattal kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálat megfelelőségének mutatója, és relevanciájának egyik szempontja. A kifejezés gyakran használatos az „egyezés” szó megfelelőjeként, amely arra utal, hogy egy adott vizsgálat milyen arányban szolgáltat helyes eredményeket (14).

Káros kimeneti út (Adverse Outcome Pathway, AOP): valamely megcélzott vegyi anyag vagy hasonló vegyi anyagok csoportjának kémiai szerkezetéből kiinduló, a molekuláris kiváltó eseményen keresztül az érintett in vivo eredményig végbemenő eseménysorozat (15).

CD86 koncentrációfüggő válasz: koncentrációfüggésről (vagy koncentráció válaszról) akkor lehet szó, amikor egy pozitív választ ($\text{CD86 S.I.} \geq 150$) kiváltó koncentrációt követő koncentráció növeli a CD86 stimulációs indexét.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

CV70: 70 %-os sejtelétképességet eredményező becsült koncentráció.

Eltolódás: eltolódásnak nevezik azt, ha i) a kezeletlen kontroll 3. replikátumának kiigazított CD86^+ értéke nem éri el a kezeletlen kontroll 1. és 2. replikátumánál mért kiigazított CD86^+ értékek átlagának 50 %-át; és ha ii) a negatív kontroll 3. replikátumának kiigazított CD86^+ értéke nem éri el a negatív kontroll 1. és 2. replikátumánál mért kiigazított CD86^+ értékek átlagának 50 %-át.

EC150: a CD86 expressziója során 150 %-os stimulációs indexet eredményező becsült koncentrációk.

Áramlási citometria: citometrikus technika, amelyben a folyadékáramban szuszpendált sejtek egyenként áthaladnak egy fókuszált gerjesztő fénynyalábon, amely a sejtekre és összetevőire jellemző minták szerint szóródik szét; a sejteket gyakran fluoreszcens markerekkel jelölik meg, amelyek az abszorbeált fényt eltérő frekvenciákon bocsátják ki.

Veszély: valamely anyag vagy helyzet azon sajátossága, hogy káros hatásokat képes előidézni az élő szervezet, rendszer vagy (al)populáció anyagnak való expozíciójakor.

Integrált vizsgálati és értékelési megközelítés: valamely vegyi anyag vagy vegyi anyag-csoport veszélyeinek azonosításához (potenciál), jellemzéséhez (hatáserősség) és/vagy biztonsági értékeléséhez (potenciál, hatáserősség és expozíció) alkalmazott strukturált megközelítés, amely stratégiai szempontból beépít és mérlegel minden olyan releváns

adatot, amely hozzájárul a lehetséges veszélyre és/vagy kockázatra és/vagy a további célirányos és ezért minimális vizsgálat szükségességére vonatkozó szabályozói döntéshozatalhoz.

Keverék: két vagy több anyagot tartalmazó elegy vagy oldat.

Egy összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben az egyik fő összetevő legalább 80 tömegszázalékban van jelen.

Több összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben egynél több fő összetevő legalább 10 tömegszázalékban, de 80 tömegszázalékot nem meghaladó koncentrációban van jelen. A több összetevőből álló anyag gyártási folyamat eredménye. A keverék és a több összetevőből álló anyag között az a különbség, hogy a keverék két vagy több anyag összekeverésével, kémiai reakció nélkül jön létre. A több összetevőből álló anyag kémiai reakció eredménye.

Pozitív kontroll a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó anyaggal kezelt replikátum. Annak biztosítása érdekében, hogy a pozitív kontrollban jelentkező hatás időbeli változását fel lehessen mérni, a pozitív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Pre-hapténok: abiotikus átalakulás, például oxidáció révén szenzibilizálónak váló vegyi anyagok.

Pro-hapténok: olyan vegyi anyagok, amelyek enzimátikus aktivációt igényelnek bőrszenzibilizáló hatásuk kifejtéséhez.

Relevancia: a vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálat pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (14).

Megbízhatóság: a vizsgálat laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. Megállapítása a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság, valamint a laboratóriumon belüli megismételhetőség kiszámításával történik (14).

Vizsgálatmenet: egy vizsgálatmenet során egy vagy több vizsgálati vegyi anyagot vizsgálnak egy párhuzamos oldószeres/vivőanyagot kontrollal és egy pozitív kontrollal.

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálat helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében

(14).

S.I.: stimulációs index. A vegyi anyaggal kezelt sejteknel mért fluoreszcencia-intenzitás mértani középértékének az oldószerrel kezelt sejtekéhez viszonyított relatív értéke.

Oldószeres/vivőanyagos kontroll: valamely vizsgálati rendszernek a vizsgálati vegyi anyagon kívüli összes összetevőjét tartalmazó kezeletlen minta, amely azonban magában foglalja az alkalmazott oldószert/vivőanyagot. Az ugyanabban az oldószerben/vivőanyagban feloldott vagy stabilan diszpergált vizsgálati vegyi anyaggal kezelt minták esetében a kiindulási érték létrehozásához használatos. Párhuzamos tápoldatos kontrollal elvégzett vizsgálata esetén ez a minta azt is bizonyítja, hogy az oldószer/vivőanyag kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati rendszerrel.

Specifitás: a vizsgálat elvégzésével helyesen besorolt összes negatív/inaktív vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (14).

Festő puffer: 5 % magzati borjú szérummal kiegészített foszfátpuffert tartalmazó sóoldat.

Anyag: olyan természetes állapotban előforduló vagy gyártási eljárásból származó kémiai elem és vegyületei, amely a stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagot és az alkalmazott eljárásból származó szennyező anyagokat is tartalmazhat, de nem tartalmaz olyan oldószert, amely az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltoztatása nélkül elkülöníthető.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálat alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

A vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete által globálisan harmonizált rendszere (ENSZ-GHS): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (16).

UVCB: ismeretlen szerkezetű vagy változó összetételű, összetett reakcióban keletkezett vagy biológiai eredetű anyagok.

Érvényes vizsgálat: olyan vizsgálat, amely kellően relevánsnak és megbízhatónak minősül egy adott célra, és amely tudományosan megalapozott elveken alapul. Egy-egy vizsgálat abszolút értelemben soha nem érvényes, kizárólag meghatározott céllal összefüggésben

(14).

2.2. függelék

JÁRTASSÁGI TESZTANYAGOK

A B.71. vizsgálati módszer e függelékben ismertetett vizsgálatának rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak igazolniuk kell szakmai jártasságukat oly módon, hogy az 1. táblázatban javasolt 10 anyagra vonatkozóan az U-SENSTM vizsgálattal várható előrejelzést helyesen kapják meg, továbbá a 10 jártassági tesztanyag közül legalább 8 esetben referenciatartományba eső CV70 és EC₁₅₀ értékeket kapnak. A jártassági tesztanyagok kiválasztása oly módon történt, hogy az a bőrszenzibilizáció veszélye esetén bekövetkező különféle válaszreakciók tartományát illetően reprezentatív legyen. A kiválasztás többi kritériuma az volt, hogy a vegyi anyagok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők legyenek, azokra vonatkozóan kiváló minőségű in vivo referenciaadatok álljanak rendelkezésre, és az U-SENSTM vizsgálat alapján kiváló minőségű in vitro adatok álljanak rendelkezésre. Az U-SENSTM vizsgálathoz rendelkezésre állnak publikált referenciaadatok is (1) (8).

1. táblázat: Az U-SENSTM vizsgálatban való szakmai jártasság bizonyításához ajánlott anyagok

Jártassági tesztanyagok	CAS- szám	Halmaz állapot	In vivo előrejelzés ¹	U- SENS TM Oldószer/ vivőanya g	U-SENS TM CV70 referencia- tartomány µg/ml- ben ²	U-SENS TM EC ₁₅₀ referencia- tartomány µg/ml-ben ²
4-Fenilén-diamin	106-50-3	Szilárd	Szenzibilizáló (erősen)	Teljes tápoldat ³	< 30	Pozitív (≤ 10)
Pikril-szulfonsav	2508-19-2	Folyadék	Szenzibilizáló (erősen)	Teljes tápoldat	> 50	Pozitív (≤ 50)
dietil-maleát	141-05-9	Folyadék	Szenzibilizáló (mérsékelten)	DMSO	10–100	Pozitív (≤ 20)
Rezorcín	108-46-3	Szilárd	Szenzibilizáló (mérsékelten)	Teljes tápoldat	> 100	Pozitív (≤ 50)
Cinnamil-alkohol	104-54-1	Szilárd	Szenzibilizáló (enyhén)	DMSO	> 100	Pozitív (10–100)
4-allil-anisol	140-67-0	Folyadék	Szenzibilizáló (enyhén)	DMSO	> 100	Pozitív (< 200)
Szaharin	81-07-2	Szilárd	Nem szenzibilizáló	DMSO	> 200	Negatív (> 200)
Glicerín	56-81-5	Folyadék	Nem szenzibilizáló	Teljes tápoldat	> 200	Negatív (> 200)
Tejsav	50-21-5	Folyadék	Nem szenzibilizáló	Teljes tápoldat	> 200	Negatív (> 200)

Szalicilsav	69-72-7	Szilárd	Nem szenzibilizáló	DMSO	> 200	Negatív (> 200)
-------------	---------	---------	-----------------------	------	-------	--------------------

Rövidítések: CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám.

¹ Az in vivo veszélyekre (és a hatáserősségre) vonatkozó előrejelzés LLNA-adatokon alapul (1) (8). Az in vivo hatáserősség levezetése az ECETOC által javasolt kritériumok segítségével történik (17).

² A megfigyelt dokumentált értékek alapján (1) (8).

³ Teljes tápoldat: 10 % magzati borjú szérummal, 2 mM L-glutaminnal, 100 egység/ml penicillinnel és 100 µg/ml sztreptomicinnel kiegészített RPMI-1640 tápoldat (8).

3. függelék

IN VITRO BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ: IL-8 LUC VIZSGÁLAT

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

1. A sejtfelületi markerek kifejeződését elemző vizsgálatokkal ellentétben az IL-8 Luc vizsgálat egy citokin, az IL-8 dendritikus sejtek aktivációja általi expressziójában előidézett változásokat számszerűsíti. A THP-1 sejtekből származó IL-8 riporter sejtvonalat (THP-G8, amelyet a THP-1 humán monocita akut leukémia sejtvonalból hoztak létre) szenzibilizáló anyagokkal kezelik, majd megméri az IL-8 kifejeződését (1). Ezt követően a luciferáz kifejeződését felhasználják a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetésének alátámasztására.
2. Az IL-8 Luc vizsgálatot értékelték egy, az Alternatív Módszerek Validálásával Foglalkozó Japán Központ (JaCVAM), a **Gazdasági, Kereskedelmi és Ipari Minisztérium (METI)** és a japán **állatkísérletek alternatív módszereivel foglalkozó társaság (JSAAE)** irányításával végzett validálási tanulmányban (2), amelyet később a JaCVAM és az Egészségügyi, Munkaügyi és Népjóléti Minisztérium (MHLW) égisze alatt, valamint az **alternatív vizsgálati módszerekre vonatkozó nemzetközi együttműködési keret (ICATM)** támogatásával független szakértői értékelésnek vetettek alá (3). A rendelkezésre álló bizonyítékok, valamint a szabályozó hatóságok és az érdekelt álláspontja alapján az IL-8 Luc vizsgálat egy integrált vizsgálati és értékelési megközelítés részeként hasznosan alkalmazható a bőrszenzibilizáló és nem szenzibilizáló anyagok veszélyességi osztályozás és címkézés céljából történő megkülönböztetésére. Az IL-8 Luc vizsgálatból származó adatok és más információk együttes használatára fellelhetők példák a szakirodalomban (4) (5) (6).
3. Az IL-8 Luc vizsgálatról bebizonyosodott, hogy áthelyezhető a sejtenyésztes és a luciferáz mérése területén tapasztalattal rendelkező laboratóriumokba. A laboratóriumon belüli reprodukálhatóság 87,7 %, a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság pedig 87,5 % (2). A validálási tanulmányból (2) és más közzétett munkákból (1) (6) származó adatok azt jelzik, hogy az LLNA vizsgálati módszerhez képest az IL-8 Luc vizsgálat 143 vegyi anyagból 118-at minősített pozitívnak vagy negatívnak, és 25-öt nem meggyőzőnek, valamint hogy az IL-8 Luc vizsgálat a bőrszenzibilizáló (azaz az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozó) anyagokat 86 %-os (101/118) pontossággal különbözteti meg a nem szenzibilizáló (vagyis az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerint nem besorolt) anyagoktól, 96 % az érzékenysége (92/96), a specifikussága pedig 41 % (9/22). A vizsgálat alábbiakban (az 5. pontban) ismertetett alkalmazási körén kívül eső anyagok kizárása

esetén az IL-8 Luc vizsgálat 136 vegyi anyagból 113-at minősített pozitívnak vagy negatívnak, és 23 vegyi anyagot nem meggyőzőnek, így az IL-8 Luc vizsgálat pontossága 89 % (101/113), 96 % az érzékenysége (92/96), míg a specifikussága 53 % (9/17). Az Urbisch és munkatársai (7) által idézett humán adatok felhasználása alapján az IL-8 Luc vizsgálat 90 vegyi anyagból 76-ot minősített pozitívnak vagy negatívnak, és 14 vegyi anyagot nem meggyőzőnek, így pontossága 80 % (61/76), érzékenysége 93 % (54/58), míg a specifikussága 39 % (7/18). A vizsgálat alkalmazási körén kívül eső anyagok kizárása esetén az IL-8 Luc vizsgálat 84 vegyi anyagból 71-et minősített pozitívnak vagy negatívnak, és 13-at nem meggyőzőnek, így pontossága 86 % (61/71), érzékenysége 93 % (54/58), specifikussága pedig 54 % (7/13). Az IL-8 Luc vizsgálat nagyobb valószínűséggel vezet hamis negatív előrejelzésekhez olyan vegyi anyagoknál, amelyeknek alacsony/mérsékelt a bőrszenzibilizáló hatása (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1B. alkategóriába tartozó anyagoknál), mint a rendkívül bőrszenzibilizáló hatást mutató (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1A. alkategóriába tartozó) anyagoknál (6). Ezek az információk összességében azt jelzik, hogy az IL-8 Luc vizsgálat érdemben hozzájárul a bőrszenzibilizáció veszélyének azonosításához. Az IL-8 Luc vizsgálat mint önálló vizsgálat esetében megadott pontossági értékek csak irányadók, ugyanis a vizsgálatot az integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében más információforrásokkal együtt és az Általános bevezetés 7. és 8. pontjának rendelkezéseivel összhangban kell figyelembe venni. Ezen túlmenően a bőrszenzibilizáció nem állatokon alkalmazott vizsgálatainak értékelésekor nem szabad megfeledezni arról, hogy az LLNA vizsgálat és más állatkísérletek nem feltétlenül tükrözik teljes egészében az embernél fennálló helyzetet.

4. Az aktuálisan rendelkezésre álló adatok alapján az IL-8 Luc vizsgálatról bebizonyosodott, hogy különféle szerves funkciós csoportokat, reakciómechanizmusokat, (in vivo vizsgálatok során meghatározott) bőrszenzibilizáló hatásokat és fizikai-kémiai tulajdonságokat képviselő vizsgálati vegyi anyagokra alkalmazható (2) (6).
5. Bár az IL-8 Luc vizsgálat során használt oldószer az X-VIVO™ 15, a vizsgálat megfelelően értékelte a 3,5-nél magasabb Log K_{ow} értékkel és 100 µg/ml körüli vízdékonysággal rendelkező vegyi anyagokat (az EPI Suite™ számításai szerint), és a vízben nehezen oldódó szenzibilizáló anyagokat jobb hatékonysággal detektálja, mint az oldószerként dimetil-szulfoxidot (DMSO) alkalmazó IL-8 Luc vizsgálat (2). Azonban az oldószer 20 mg/ml koncentrációjában nem oldódó vizsgálati vegyi anyagok hamis negatív eredményhez vezethetnek, mivel nem oldhatók X-VIVO™ 15-ben. Ezért az ilyen vegyi anyagok negatív eredményeit figyelmen kívül kell hagyni. Az anhidridek esetében a validációs tanulmány magas hamisnegatív-arányt mutatott ki. Ezen túlmenően a sejtvonal korlátozott metabolikus képessége (8) és a kísérleti körülmények miatt a pro-hapténok

(metabolikus aktiválást igénylő vegyi anyagok) és a pre-hapténok (a levegő oxidáló hatására aktiválódó anyagok) is negatív eredményre vezethetnek a vizsgálat során. Bár a feltételezhető pre-/pro-hapténok negatív eredményét elővigyázatosan kell kezelni, az IL-8 Luc vizsgálat az adatbázisában szereplő 11 pre-hapténból 11-et, a 6 pro-hapténból 6-ot és a 8 pre-/pro-hapténból 6-ot helyesen sorolt be (2). A három nem állatokon alkalmazott, pre- és pro-hapténokat észlelni képes vizsgálat (a DPRA, a KeratinoSens™ és a h-CLAT) közelmúltbeli átfogó felülvizsgálata alapján (9), és figyelembe véve, hogy az IL-8 Luc vizsgálatban használt THP-G8 sejtek a h-CLAT vizsgálatban alkalmazott THP-1 sejtekből származnak, az IL-8 Luc vizsgálat más vizsgálatokkal való együttes alkalmazása esetén hozzájárulhat ahhoz, hogy növekedjen a nem állatokon alkalmazott vizsgálatok érzékenysége a pre- és pro-hapténok detektálása terén. Az ez idáig vizsgált felületaktív anyagok típusuktól (pl. kationos, anionos, nem ionos) függetlenül (hamis) pozitív eredményekhez vezetnek. Végezetül a luciferázzal kölcsönhatásba lépő vegyi anyagok megzavarhatják a luciferáz aktivitását/mérését, látszólagos gátlást vagy megnövekedett lumineszcenciát okozva (10). Beszámoltak például arról, hogy az 1 µM-nél magasabb fitoösztrogén-koncentráció a luciferáz riportergén túlzott aktiválása miatt zavarja a lumineszcencia jeleit más, luciferáz alapú riportergén-vizsgálatokban. Következésképp a magas fitoösztrogén-koncentráció mellett vagy feltehetőleg a luciferáz riportergént a fitoösztrogénhez hasonló mértékben aktiváló vegyületek magas koncentrációja mellett kapott luciferáz-expressziót körültekintően meg kell vizsgálni (11). A fentiek fényében a felületaktív anyagok, az anhidridek és a luciferáz aktivitását zavaró vegyi anyagok kívül esnek a vizsgálat alkalmazási körén. Olyan esetekben, amikor bizonyítékkal igazolható, hogy az IL-8 Luc vizsgálat nem alkalmazható más, konkrét vegyianyag-kategóriákra, a vizsgálatot nem szabad e vegyianyag-kategóriákra alkalmazni.

6. A fentieknek megfelelően az IL-8 Luc vizsgálat elősegíti a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetését. Szükség van további, lehetőleg humán adatokon alapuló kutatásra annak meghatározása érdekében, hogy az IL-8 Luc vizsgálat eredményei – más információforrásokkal együtt mérlegelve – hozzájárulhatnak-e a hatáserősség értékeléséhez.
7. A fogalommeghatározások a 3.1. függelékben találhatók.

A VIZSGÁLAT ELVE

8. Az IL-8 Luc vizsgálat THP-1 humán monocita leukémia sejtvonalat alkalmaz, amely az amerikai típustörzsanyag-gyűjteményből szerezhető be (Manassas, VA, USA). Ezt a sejtvonalat felhasználva a Tohokui Egyetem Orvostudományi Karának Bőrgyógyászati Tanszéke létrehozott egy THP-1 származék IL-8 riportter sejtvonalat, a THP-G8-at, amely

IL-8 promóterrel szabályozott stabil narancssárga luciferáz (SLO) luciferáz gént és gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) promóterrel szabályozott stabil vörös luciferáz (SLR) luciferáz gént hordoz (1). Ez lehetővé teszi a luciferázgén-indukció kvantitatív mérését, mégpedig az IL-8 és a GAPDH szenzibilizáló vegyi anyagokkal való kezelést követő, sejteken belüli aktivitásának mutatójaként szolgáló – jól bevált fénytermelő luciferáz szubsztrátok által kibocsátott – lumineszcencia észlelése révén.

9. A két szint detektáló vizsgálati rendszer magában foglal egy narancssárga fényt kibocsátó luciferázt (SLO; $\lambda_{\max} = 580 \text{ nm}$) (12), amely az IL-8 promóterrel szabályozott génkifejeződést jelzi, és egy vörös fényt kibocsátó luciferázt (SLR; $\lambda_{\max} = 630 \text{ nm}$) (13), amely a belső szabályozó promóterrel, a GAPDH-val szabályozott génkifejeződést jelzi. A két luciferáz a d-luciferinnel reakcióba lépve eltérő szint bocsát ki; lumineszcenciájukat egyidejűleg, egylépéses reakció keretében mérik úgy, hogy optikai szűrő használatával elkülönítik a kibocsátást a vizsgálati keveréktől (14) (3.2. függelék).
10. A THP-G8 sejteket 16 órán át kezelik a vizsgálati vegyi anyaggal, majd megméri az IL-8 promóter aktivitását tükröző SLO luciferázaktivitást (SLO-LA) és a GAPDH promóter aktivitását tükröző SLR luciferázaktivitást (SLR-LA). A rövidítések értelmezésének megkönnyítése érdekében az SLO-LA a továbbiakban IL8LA, az SLR-LA pedig GAPLA néven szerepel. Az 1. táblázat ismerteti az IL-8 Luc vizsgálatban mért luciferázaktivitással kapcsolatos kifejezések leírását. A mért értékek alapján meghatározzák az IL8LA normalizált értékét (nIL8LA), amely az IL8LA és a GAPLA hányadosa; az nIL8LA indukcióját (Ind-IL8LA), amely a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt THP-G8 sejtek négyszeresen mért nIL8LA értéke számtani átlagának a kezeletlen THP-G8 sejtek nIL8LA értékeinek számtani átlagához viszonyított aránya; és a GAPLA gátlását (Inh-GAPLA), amely a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt THP-G8 sejtek négyszeresen mért GAPLA értéke számtani átlagának a kezeletlen THP-G8 sejtek GAPLA értékeinek számtani átlagához viszonyított aránya, és amely a citotoxicitás mutatója.

1. táblázat: Az IL-8 Luc vizsgálatban mért luciferázaktivitással kapcsolatos kifejezések leírása

Rövidítések	Fogalommeghatározás
GAPLA	A GAPDH promóter aktivitását tükröző SLR luciferázaktivitás
IL8LA	Az IL-8 promóter aktivitását tükröző SLO luciferázaktivitás
nIL8LA	IL8LA/GAPLA
Ind-IL8LA	A vegyi anyagokkal kezelt THP-G8 sejtek nIL8LA értéke/kezeletlen sejtek nIL8LA értéke
Inh-GAPLA	A vegyi anyagokkal kezelt THP-G8 sejtek GAPLA értéke/kezeletlen sejtek GAPLA értéke
CV05	A vegyi anyag azon legalacsonyabb koncentrációja, amely 0,05 alatti

Inh-GAPLA értéket idéz elő.

11. Az IL-8 Luc vizsgálathoz hasonló in vitro IL-8 luciferáz vizsgálatok validálásának megkönnyítéséhez rendelkezésre állnak teljesítményszabványok (15), amelyek lehetővé teszik az OECD 442E vizsgálati iránymutatásának időben történő módosítását az IL-8 luciferáz vizsgálatok e vizsgálati iránymutatásba való beépítéséhez. Az adatok OECD-megállapodás szerinti kölcsönös elfogadása csak a teljesítményszabványoknak megfelelően validált vizsgálatok esetében lesz garantált, ha e vizsgálatokat az OECD felülvizsgálta és belefoglalta 442E vizsgálati iránymutatásába (16).

A JÁRTASSÁG BIZONYÍTÁSA

12. A B.71. vizsgálati módszer e függelékben ismertetett vizsgálatának rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak a 3.3. függelékben felsorolt tíz jártassági tesztanyag in vitro módszerekre vonatkozó bevált gyakorlatokkal összhangban történő vizsgálatával igazolniuk kell szakmai jártasságukat (17). Ezenfelül a vizsgálat felhasználóinak történeti adatbázist kell fenntartaniuk, amely tartalmazza a reaktivitási tesztekben (lásd a 15. pontot), valamint a pozitív és az oldószeres/vivőanyagok kontrolljából (lásd a 21–24. pontot) származó adatokat, ezekkel az adatokkal igazolva a vizsgálat laboratóriumon belüli hosszú távú reprodukálhatóságát.

ELJÁRÁS

13. Az IL-8 Luc vizsgálathoz rendelkezésre állnak szabványműveleti eljárások, amelyeket alkalmazni kell e vizsgálat végrehajtása során (18). A vizsgálat elvégzésére vállalkozó laboratóriumok a rekombináns THP-G8 sejtvonalat az OECD sablonban szereplő feltételeknek megfelelően egy anyagátadási megállapodás aláírását követően a GPC Lab. Co. Ltd. vállalattól (Tottori, Japán) szerezhetik be. A következő pontok ismertetik a vizsgálat főbb összetevőit és eljárásait.

Sejtek előkészítése

14. Az IL-8 Luc vizsgálathoz THP-G8 sejtvonalat kell használni, amely a GPC Lab. Co. Ltd. vállalattól (Tottori, Japán) szerezhető be (lásd a 8. és a 13. pontot). A sejteket a beérkezésüket követően (2–4 passzálassal) fel kell szaporítani, és homogén állományként fagyaszttva kell tárolni. Az ebből az állományból származó sejteket legfeljebb 12 passzáls erejéig vagy legfeljebb 6 héten át lehet szaporítani. A szaporításhoz használt közeg az RPMI-1640 tápfolyadék, kiegészítve 10 % magzati borjú szérummal (FBS),

antibiotikumos/antimikotikus oldattal (100 egység/ml penicillin G, 100 µg/ml sztreptomycin és 0,25 µg/ml amfotericin B 0,85 %-os sóoldatban) (pl. GIBCO, kat.szám: 15240-062), 0,15 µg/ml puromicinnel (CAS-szám: 58-58-2) és 300 µg/ml G418-cal (CAS-szám: 108321-42-2).

15. A vizsgálatban való felhasználásuk előtt a sejteket egy reaktivitási teszt során minősíteni kell. A reaktivitási tesztet a felolvasztás után 1–2 héttel vagy 2–4 passzálást követően kell elvégezni, a pozitív kontrollanyaggal, vagyis a 4-nitrobenzil-bromiddal (4-NBB) (CAS-szám: 100-11-8, legalább 99 %-os tisztaságban) és a negatív kontrollanyaggal, a tejsavval (LA) (CAS-szám: 50-21-5, legalább 85 % tisztaságban). A 4-NBB-nak pozitív választ (legalább 1,4-es Ind-IL8LA), a tejsavnak pedig negatív választ (1,4-nél kisebb Ind-IL8LA) kell kiváltania. A vizsgálatához kizárólag a reaktivitási tesztben megfelelt sejtek használhatók. A tesztet a 22–24. pontban leírt eljárások szerint kell végrehajtani.
16. A vizsgálatához a THP-G8 sejteket $2-5 \times 10^5$ sejt/ml sűrűségben átolttják, majd sejttenyésztő lombikban 48–96 órán keresztül előtenyésztik. A vizsgálat napján a sejttenyésztő lombikból begyűjtött sejteket 10 % FBS-t tartalmazó, antibiotikum-mentes RPMI-1640 tápoldatban átmossák, majd 10 % FBS-t tartalmazó, antibiotikum-mentes RPMI-1640 tápoldatban 1×10^6 sejt/ml sűrűségben újraszuszpendálják. Ezt követően a sejteket 50 µl mennyiségben (lyukanként 5×10^4 sejt sűrűségben) elhelyezik egy 96 lyukú, lapos fenekű fekete lemezben (pl. Costar, kat.szám: 3603).

A vizsgálati vegyi anyag és a kontrollanyagok előkészítése

17. A vizsgálati vegyi anyagot és a kontrollanyagokat a vizsgálat napján kell előkészíteni. Az IL-8 Luc vizsgálatban a vizsgálati vegyi anyagokat X-VIVO™ 15-ben, egy kereskedelmi forgalomban kapható, szérumentes tápoldatban (Lonza, 04-418Q) oldják fel, 20 mg/ml végső koncentrációban. Egy mikrocentrifuga csőbe töltött 20 mg vizsgálati vegyi anyaghoz (a vegyi anyag oldhatóságától függetlenül) hozzáadnak annyi X-VIVO™ 15 tápoldatot, hogy a keverék térfogata 1 ml legyen, majd a keveréket 30 percig, körülbelül 20 °C-os környezeti hőmérsékleten intenzív örvénykeverésnek vetik alá és rotorral legfeljebb 8 rpm sebességen ráztatják. Amennyiben a szilárd vegyi anyagok ilyen módon nem oldódnak fel, a csövet ultrahanggal kezelik mindaddig, amíg a vegyi anyag teljesen feloldódik vagy stabilan diszpergálódik. Az X-VIVO™ 15 tápoldatban oldható vizsgálati vegyi anyagok esetében az oldatot X-VIVO™ 15-ben 5-szörös tényezővel hígítják, és a kapott keveréket a vizsgálati vegyi anyag X-VIVO™ 15 (4 mg/ml-os) törzsoldataként hasznosítják. Az X-VIVO™ 15 tápoldatban nem oldható vizsgálati vegyi anyagok esetében a keveréket ismét legalább 30 percig ráztatják, majd 5 percen keresztül 15 000 rpm ($\approx 20\,000\text{ g}$) sebességen centrifugálják; a létrejött felülúszót a vizsgálati vegyi anyag X-VIVO™ 15 törzsoldataként

hasznosítják. Más oldószerek, például DMSO, víz vagy a tápfolyadék használatát tudományosan meg kell indokolni. A vegyi anyagok feloldásának részletes eljárását a 3.5. függelék ismerteti. A 18–23. pontban leírtak szerint elkészített X-VIVO™ 15 oldatokat 1 : 1 térfogatszázalék arányban össze kell keverni a 96 lyukú, lapos fenekű fekete lemezen elkészített sejtszuspenziókkal (lásd a 16. pontot).

18. Az első vizsgálatmenet célja a citotoxikus koncentráció meghatározása és a vegyi anyagok bőszenzibilizáló potenciáljának felmérése. A vizsgálati vegyi anyagok X-VIVO™ 15 törzsoldataiból X-VIVO™ 15 tápoldattal, kétszeres hígítási tényezővel oldatsorozatot készítenek (lásd a 3.5. függelék) egy 96 lyukú vizsgálati lemezen (pl. Costar, kat.szám: EW-01729-03). Ezután lyukanként 50 µl mennyiségű hígított oldatot adagolnak a 96 lyukú, lapos fenekű fekete lemezen elkészített 50 µl mennyiségű sejtszuspenziókhöz. Tehát az X-VIVO™ 15-ben oldható vizsgálati vegyi anyagok esetében a vizsgálati vegyi anyagok végső koncentrációértékei a 0,002–2 mg/ml-es tartományban helyezkednek el (3.5. függelék). A 20 mg/ml koncentrációjú X-VIVO™ 15-ben nem oldható vizsgálati vegyi anyagoknál csak a 2 és 2¹⁰ közötti hígítási tényező határozható meg, a vizsgálati vegyi anyagok tényleges végső koncentrációértékei bizonytalanok, mivel attól függnék, hogy a vizsgálati vegyi anyagoknak mekkora a telítési koncentrációja az X-VIVO™ 15 törzsoldatban.
19. A további vizsgálatmenetekben (vagyis a második, harmadik és negyedik ismétlésben) az X-VIVO™ 15 törzsoldat koncentrációja négyszerese annak a koncentrációértéknek, amely az első kísérlet során 05-ös sejtelétképességet eredményezett (CV05; az a legalacsonyabb koncentráció, amely 0,05 alatti Inh-GAPLA értéket idéz elő). Amennyiben az első vizsgálatmenetben alkalmazott legmagasabb koncentrációnál az Inh-GAPLA nem süllyed 0,05 alá, az X-VIVO™ 15 törzsoldatát az első vizsgálatmenet legmagasabb koncentrációjában készítik el. A CV05 értéket eredményező koncentráció kiszámításához elosztják az első vizsgálatmenet törzsoldatának koncentrációját a CV05 hígítási tényezővel (X) (CV05 hígítási tényező (X); az a hígítási tényező, amellyel a törzsoldat CV05 értéket eredményező koncentrációra hígítható) (lásd a 3.5. függelék). A 20 mg/ml koncentrációjú X-VIVO-ban nem oldható vizsgálati anyagoknál a CV05 meghatározásához a törzsoldat koncentrációját megszorozzák 1/X-szel. A 2–4. vizsgálatmenethez egy második törzsoldatot készítenek, 4 x CV50 koncentrációban (3.5. függelék).
20. Az X-VIVO™ 15 második törzsoldatából 1,5-szörös hígítási tényezővel készítenek oldatsorozatot, egy 96 lyukú vizsgálati lemezen. Ezután lyukanként 50 µl mennyiségű hígított oldatot adagolnak a 96 lyukú, lapos fenekű fekete lemez lyukaiba helyezett 50 µl mennyiségű sejtszuspenziókhöz. Minden vizsgálati vegyi anyag valamennyi koncentrációját 4 lyukban vizsgálják. Ezt követően a mintákat lemezrázón összekeverik, és

16 órán át inkubálják 37 °C-on, 5 % CO₂ mellett, majd az alább leírt módon megméri a luciferázaktivitást.

21. Az oldószeres kontroll a lyukanként 50 µl X-VIVO™ 15 és a lyukanként 50 µl, 10 % FBS-t tartalmazó RPMI-1640 tápoldatban lévő sejtszuszpenzió keveréke.
22. Az ajánlott pozitív kontroll a 4-NBB. Egy 1,5 ml-es mikrocentrifuga csőben elhelyeznek 20 mg 4-NBB-t, majd hozzáadnak annyi X-VIVO™ 15-öt, hogy a keverék térfogata 1 ml legyen. A csövet legalább 30 percig intenzív örvénykeverésnek vetik alá és rotorral legfeljebb 8 rpm sebességen rázatják. Ezt követően a keveréket 5 percig 20 000 g-n centrifugálják, majd a felülúszót 4-szeres tényezővel X-VIVO™ 15-tel hígítják, és 500 µl hígított felülúszót áthelyeznek a 96 lyukú vizsgálati lemez egyik lyukába. A hígított felülúszót 2-szeres és 4-szeres tényezővel tovább hígítják X-VIVO™ 15-tel, majd 50 µl mennyiségű oldatot adagolnak a 96 lyukú, lapos fenekű fekete lemez lyukaiba helyezett 50 µl mennyiségű THP-G8 sejtszuszpenziókhoz (3.6. függelék). A pozitív kontroll valamennyi koncentrációját 4 lyukban vizsgálják. A lemez tartalmát lemezrázón összekeverik, és CO₂ inkubátorban 16 órán át inkubálják (37 °C-on, 5 % CO₂ mellett), majd a 29. pontban leírt módon megméri a luciferázaktivitást.
23. Az ajánlott negatív kontrollanyag a tejsav. Egy 1,5 ml-es mikrocentrifuga csőben elhelyeznek 20 mg tejsavat, majd hozzáadnak annyi X-VIVO™ 15-öt, hogy a keverék térfogata 1 ml legyen (20 mg/ml). A 20 mg/ml koncentrációjú tejsavoldatot 5-szörös tényezővel X-VIVO™ 15-tel hígítják (4 mg/ml); majd a 4 mg/ml koncentrációjú tejsavoldatból 500 µl mennyiséget áthelyeznek a 96 lyukú vizsgálati lemez egyik lyukába. Ezt az oldatot 2-szeres tényezővel X-VIVO™ 15-tel hígítják, majd ismét 2-szeres tényezővel tovább hígítják, 2 mg/ml-es és 1 mg/ml-es oldatokat hozva létre. E 3 oldatból és a vívőanyagok kontrollból (X-VIVO™ 15) 50 µl mennyiséget adagolnak a 96 lyukú, lapos fenekű fekete lemez lyukaiba helyezett 50 µl mennyiségű THP-G8 sejtszuszpenziókhoz. A negatív kontroll valamennyi koncentrációját 4 lyukban vizsgálják. A lemez tartalmát lemezrázón összekeverik, és CO₂ inkubátorban 16 órán át inkubálják (37 °C-on, 5 % CO₂ mellett), majd a 29. pontban leírt módon megméri a luciferázaktivitást.
24. Alkalmazhatók más, megfelelő pozitív vagy negatív kontrollok is, ha rendelkezésre állnak dokumentált adatok hasonló vizsgálatmenet-elfogadhatósági kritériumok származtatásához.
25. Ügyelni kell az illékony vizsgálati vegyi anyagok elpárolgásának elkerülésére, valamint a lyukak vizsgálati vegyi anyagokkal való keresztszennyeződésének elkerülésére, például a lemezek befedhetők fóliával a vizsgálati vegyi anyagokkal való inkubálás előtt.

26. A vizsgálati vegyi anyagokat és az oldószeres kontrollt 2–4 vizsgálatmenetben kell vizsgálni ahhoz, hogy meg lehessen állapítani a besorolás pozitív vagy negatív előrejelzését (lásd a 2. táblázatot). Mindegyik vizsgálatmenetet más-más napon, a vizsgálati vegyi anyaggal frissen készített X-VIVO™ 15 törzsoldattal és egymástól függetlenül begyűjtött sejtekkel kell elvégezni. A sejtek származhatnak ugyanabból a passzálásból.

A luciferáz-aktivitás mérése

27. A lumineszcenciát 96 lyukú mikrolemezhez való luminométerrel mérik, amelyet optikai szűrőkkel szerelnek fel, pl. Phelios (ATTO, Tokió, Japán), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Németország) és az ARVO sorozat (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). A reprodukálhatóság biztosítása érdekében a luminométert minden vizsgálat előtt kalibrálni kell (19). A kalibráláshoz rendelkezésre állnak rekombináns, narancssárga és vörös fényt kibocsátó luciferázok.
28. A lemez valamennyi vegyi anyaggal kezelt vagy kezeletlen sejtszuspenziót tartalmazó lyukába helyeznek 100 µl felmelegített Tripluc® luciferáz vizsgálati reagenst (Tripluc). A lemezt körülbelül 20 °C-os környezeti hőmérsékleten 10 percig rázatják. Ezután a lemezt a luciferáz-aktivitás méréséhez a luminométerbe helyezik. A biolumineszcenciát 3 másodpercig mérik optikai szűrő nélkül (F0) és optikai szűrővel (F1). Ha például a használt luminométer típusa miatt ettől eltérő beállításokat alkalmaznak, azt tudományosan indokolni kell.
29. A mért értékek alapján meghatározzák az egyes koncentrációk paramétereit, például az IL8LA, a GAPLA, az nIL8LA, az Ind-IL8LA, az Inh-GAPLA értékét, az IL8LA átlagát $\pm$ SD, a GAPLA átlagát $\pm$ SD, az nIL8LA átlagát $\pm$ SD, az Ind-IL8LA átlagát $\pm$ SD, az Inh-GAPLA átlagát $\pm$ SD és az Ind-IL8LA 95 %-os konfidenciaintervallumát. Az ebben a pontban említett paraméterek meghatározását az I. és a IV. függelék tartalmazza.
30. A mérés előtt a több szint észlelő riporter vizsgálatokban a színek elkülönítését általában optikai szűrővel – például sharp-cut (long-pass vagy short-pass) szűrővel vagy sávszűrővel – felszerelt detektorokkal (luminométerrel és lemezolvasóval) végzik. Az egyes biolumineszcens jelzőszínek kiszűréséhez használt szűrők transzmissziós koefficiensét a vizsgálatot megelőzően a 3.2. függelékben foglaltak szerint kalibrálni kell.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Az adatok kiértékelése

31. A pozitív/negatív döntés kritériumai alapján minden vizsgálatmenetre érvényesek az alábbiak:

- az IL-8 Luc vizsgálat előrejelzése akkor pozitív, ha az Ind-IL8LA legalább 1,4 és az Ind-IL8LA 95 %-os konfidenciaintervallumának alsó határértéke legalább 1,0;
- az IL-8 Luc vizsgálat előrejelzése akkor negatív, ha az Ind-IL8LA kisebb mint 1,4 és/vagy az Ind-IL8LA 95 %-os konfidenciaintervallumának alsó határértéke kisebb mint 1,0.

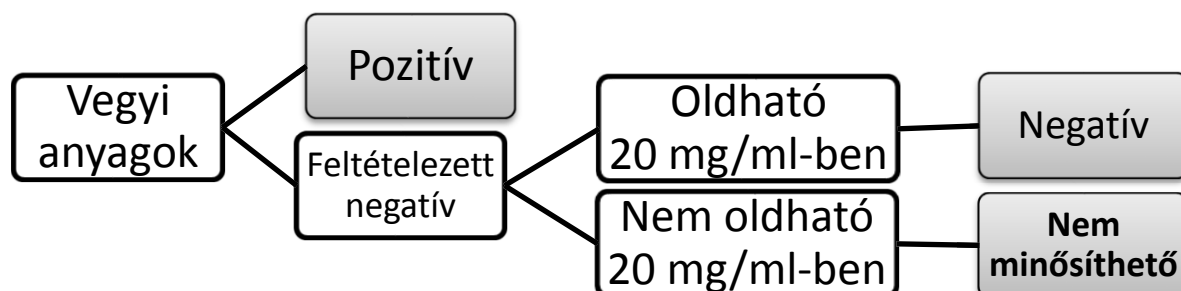
Előrejelzési modell

32. Azok a vizsgálati vegyi anyagok, amelyek az 1., 2., 3. és 4. vizsgálatmenetben két pozitív eredményre vezettek, pozitívnak minősülnek, míg azok, amelyek az 1., 2., 3. és 4. vizsgálatmenetben három negatív eredményre vezettek, feltételezett negatívnak tekintendők (2. táblázat). A feltételezett negatív vegyi anyagok közül azok, amelyek oldódnak 20 mg/ml koncentrációjú X-VIVO™ 15-ben, negatívnak tekintendők, azok a vegyi anyagok pedig, amelyek nem oldódnak 20 mg/ml koncentrációjú X-VIVO™ 15-ben, nem minősíthetők (1. ábra).

2. táblázat: A pozitív és a feltételezett negatív anyagok azonosításának kritériumai

1. vizsgálatmenet	2. vizsgálatmenet	3. vizsgálatmenet	4. vizsgálatmenet	Végső előrejelzés
Pozitív	Pozitív	-	-	Pozitív
	Negatív	Pozitív	-	Pozitív
		Negatív	Pozitív	Pozitív
			Negatív	Feltételezett negatív
Negatív	Pozitív	Pozitív	-	Pozitív
		Negatív	Pozitív	Pozitív
			Negatív	Feltételezett negatív
	Negatív	Pozitív	Pozitív	Pozitív
		Negatív	Negatív	Feltételezett negatív
			Negatív	-

1. ábra: A végső döntés előrejelzési modellje



Elfogadhatósági kritériumok

33. Az IL-8 Luc vizsgálat alkalmazásakor az alábbi elfogadhatósági kritériumoknak kell teljesülniük.

- Az Ind-IL8LA értékének minden vizsgálatmenetben a pozitív kontrollanyag, a 4-NBB legalább egyik koncentrációjában nagyobbnek kell lennie mint 5,0.
- Az Ind-IL8LA értékének minden vizsgálatmenetben a negatív kontrollanyag, a tejsav minden koncentrációjában kisebbnek kell lennie mint 1,4.
- Azon lemezek adatait, amelyeknél a sejteket és Tripluc reagenst tartalmazó, de vegyi anyag nélküli, kontrollként szolgáló lyukak GAPLA értéke nem éri el a csak a vizsgálati tápoldatot (vagyis lyukanként 50 µl, 10 % FBS-sel kiegészített RPMI-1640 és lyukanként 50 µl X-VIVO™ 15 keverékét) tartalmazó lyuk GAPLA értékének 5-szörösét, nem szabad figyelembe venni.
- Szintén nem vehetők figyelembe azon lemezek adatai, amelyeknél a vizsgálati vagy kontrollként szolgáló vegyi anyagok összes koncentrációjánál az Inh-GAPLA kevesebb mint 0,05. Ez utóbbi esetben az első vizsgálatot meg kell ismételni, méghozzá úgy, hogy az ismételésben alkalmazott legmagasabb végső koncentráció az előző vizsgálat legalacsonyabb végső koncentrációja legyen.

Vizsgálati jegyzőkönyv

34. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyagok

Egy összetevőből álló anyag:

- kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok), SMILES-vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;
- fizikai megjelenés, vízdékonyság, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;
- tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;
- vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);
- oldhatóság X-VIVO™ 15-ben. Az X-VIVO™ 15-ben oldhatatlan vegyi anyagok esetében: a centrifugálást követően megfigyeltek-e kicsapódást vagy flotációt;
- vizsgált koncentráció(k);
- tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;
- nem X-VIVO™ 15 használata esetén az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében.

Több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek:

- amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítójával (lásd fent), tisztaságával, mennyiségi előfordulásával és releváns fizikai-kémiai tulajdonságaival (lásd fent) jellemezve; amennyiben rendelkezésre állnak;
- fizikai megjelenés, vízdékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;
- molekulatömeg vagy látszólagos molekulatömeg ismert összetételű keverékek/polimerek esetén, vagy a vizsgálat lebonyolítása szempontjából releváns egyéb információ;
- vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);
- oldhatóság X-VIVO™ 15-ben. Az X-VIVO™ 15-ben oldhatatlan vegyi anyagok esetében: a centrifugálást követően megfigyeltek-e kicsapódást vagy flotációt;
- vizsgált koncentráció(k);
- tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak.
- nem X-VIVO™ 15 használata esetén az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében.

Kontrollok

Pozitív kontroll

- kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;
- fizikai megjelenés, vízben való oldhatóság, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak és szükség szerint;
- tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;
- vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);
- vizsgált koncentráció(k);
- tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;
- adott esetben hivatkozás a pozitív történeti kontrollok eredményeire, amelyek a vizsgálatmenet elfogadhatósági kritériumainak való megfelelést bizonyítják.

Negatív kontroll:

- kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok) és/vagy más azonosítók alapján;
- tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;
- fizikai megjelenés, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben a vizsgálati iránymutatásban említett negatív kontrollanyagoktól eltérő negatív kontrollanyagok használatosak, és amennyiben rendelkezésre állnak;
- tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;
- az oldószer kiválasztásának indoklása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében.

Vizsgálati körülmények

- a megbízó, a vizsgálatot végző laboratórium és a vizsgálatvezető neve és címe;
- az alkalmazott vizsgálat leírása;
- használt sejtvonala, tárolási feltételei és eredete (például az a létesítmény, ahonnan azt beszerezték);
- a magzati borjú szérum gyártási száma és eredete, a forgalmazó neve, a 96 lyukú, lapos fenekű fekete lemez gyártási száma, valamint a Tripluc reagens gyártási száma;

- a vizsgálathoz használt sejtek passzálásának száma és sűrűsége;
- a vizsgálat előtt a leoltáshoz alkalmazott sejtszámlálási módszer és a homogén sejtszám-eloszlás biztosítása érdekében hozott intézkedések;
- az alkalmazott luminométer (például modell), beleértve a műszer beállításait, a használt luciferáz szubsztrátot, valamint a megfelelő lumineszcencia-mérések szemléltetése a 3.2. függelékben ismertetett kontrollvizsgálat alapján;
- a vizsgálat végrehajtásában való laboratóriumi jártasság bizonyítására alkalmazott eljárás (például jártassági tesztanyagok vizsgálatával) vagy a vizsgálat idővel reprodukálható végrehajtásának bizonyítására alkalmazott eljárás.

A vizsgálat menete

- az alkalmazott replikátumok és vizsgálatmenetek száma;
- a vizsgálati vegyi anyag koncentrációi, alkalmazási eljárása és az expozíciós idő (ha eltér az ajánlottól);
- az alkalmazott értékelési és döntési kritériumok leírása;
- az alkalmazott vizsgálat-elfogadhatósági kritériumok leírása;
- a vizsgálati eljárás bármilyen változtatásának leírása.

Eredmények

- az IL8LA és a GAPLA mért értékei;
- az nIL8LA, az Ind-IL8LA és az Inh-GAPLA kiszámolt értékei;
- az Ind-IL8LA 95 %-os konfidenciaintervalluma;
- a luciferáz-aktivitás indukciójára és az életképességre vonatkozó dózis-válasz görbéket ábrázoló grafikon;
- adott esetben bármely más releváns észrevétel leírása.

Az eredmények tárgyalása

- az IL-8 Luc vizsgálattal kapott eredmények tárgyalása;
- a vizsgálat eredményeinek integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében történő tárgyalása, amennyiben rendelkezésre állnak más releváns információk.

Következtetés

SZAKIRODALOM

- (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. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen: <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. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen: <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. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol* 69:371-9.
- (6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 29:1816-30.
- (7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol* 71:337-51.

- (8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Alternatives to laboratory animals: ATLA* 38:275-84.
- (9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? *Regul Toxicol Pharmacol*, 82:147-155.
- (10) Thorne N, Inglese J, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. *Chem Biol* 17:646-57.
- (11) OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en>.
- (12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. *Biochem Biophys Res Commun* 280:1286-91.
- (13) Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active *Phrixothrix* railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. *Biochemistry* 38:8271-9.
- (14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. *Biotechniques* 38:891-4.
- (15) OECD (2017). To be published - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Paris, France
- (16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OECD, Párizs, Franciaország.

- (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. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf).
- (18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, elérhető a következő címen: 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, Párizs, Franciaország.
- (21) United Nations (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Elérhető a következő címen: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

3.1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: a vizsgálattal kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálat megfelelőségének mutatója, és relevanciájának egyik szempontja. A kifejezés gyakran használatos az „egyezés” szó megfelelőjeként, amely arra utal, hogy egy adott vizsgálat milyen arányban szolgáltat helyes eredményeket (16).

Káros kimeneti út (Adverse Outcome Pathway, AOP): valamely megcélzott vegyi anyag vagy hasonló vegyi anyagok csoportjának kémiai szerkezetéből kiinduló, a molekuláris kiváltó eseményen keresztül az érintett in vivo eredményig végbemenő eseménysorozat (20).

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

CV05: 05-ös életképesség, vagyis az a legalacsonyabb koncentráció, amelynél a vegyi anyag az Inh-GAPLA 0,05 alatti szintjét idézi elő.

FInSLO-LA: az Ind-IL8LA értékre utaló rövidítés, amelyet az IL-8 Luc vizsgálatra vonatkozó validálási jelentésben és korábbi publikációkban használtak. Meghatározását lásd az Ind-IL8LA címszó alatt.

GAPLA: a stabil vörös luciferáz (SLR) luciferáz-aktivitása ($\lambda_{\max} = 630 \text{ nm}$), amelyet a GAPDH promóter szabályoz, és amely a sejtéletképességről és az élő sejtek számáról nyújt felvilágosítást.

Veszély: valamely anyag vagy helyzet azon sajátossága, hogy káros hatásokat képes előidézni az élő szervezet, rendszer vagy (al)populáció anyagnak való expozíciójakor.

Integrált vizsgálati és értékelési megközelítés: valamely vegyi anyag vagy vegyi anyagcsoport veszélyeinek azonosításához (potenciál), jellemzéséhez (hatáserősség) és/vagy biztonsági értékeléséhez (potenciál, hatáserősség és expozíció) alkalmazott strukturált megközelítés, amely stratégiai szempontból beépít és mérlegel minden olyan releváns adatot, amely hozzájárul a lehetséges veszélyre és/vagy kockázatra és/vagy a további célirányos és ezért minimális vizsgálat szükségességére vonatkozó szabályozói döntéshozatalhoz.

II-SLR-LA: az Inh-GAPLA értékre utaló rövidítés, amelyet az IL-8 Luc vizsgálatra vonatkozó validálási jelentésben és korábbi publikációkban használtak. Meghatározását lásd az Inh-GAPLA címszó alatt.

IL-8 (Interleukin-8): endoteliális sejtekből, fibroblasztokból, keratinsejtekből, makrofágokból és monocitákból származó citokin, amely a neutrofilek és a T-sejt limfociták

kemotaxisát idézi elő.

IL8LA: a stabil narancssárga luciferáz (SLO) luciferáz-aktivitása ($\lambda_{\max} = 580 \text{ nm}$), amelyet az IL-8 promóter szabályoz.

Ind-IL8LA: az IL8LA indukciós faktora. Meghatározásához elosztják a vegyi anyaggal kezelt THP-G8 sejtek nIL8LA értékét a nem stimulált THP-G8 sejtek nIL8LA értékével, az Ind-IL8LA a vegyi anyagok által előidézett IL-8 promóter aktivitás mutatója.

Inh-GAPLA: A GAPLA gátlása. Meghatározásához elosztják a vegyi anyaggal kezelt THP-G8 sejtek GAPLA értékét a nem kezelt THP-G8 sejtek GAPLA értékével, az Inh-GAPLA a vegyi anyagok által előidézett citotoxicitás mutatója.

Minimális indukciós küszöbérték (MIT): az a legalacsonyabb koncentráció, amelynél a vegyi anyag eleget tesz a pozitív besorolás kritériumainak.

Keverék: két vagy több anyagot tartalmazó elegy vagy oldat.

Egy összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben az egyik fő összetevő legalább 80 tömegszázalékban van jelen.

Több összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben egynél több fő összetevő több mint 10 tömegszázalékban, de 80 tömegszázalékot nem meghaladó koncentrációban van jelen. A több összetevőből álló anyag gyártási folyamat eredménye. A keverék és a több összetevőből álló anyag között az a különbség, hogy a keverék két vagy több anyag összekeverésével, kémiai reakció nélkül jön létre. A több összetevőből álló anyag kémiai reakció eredménye.

nIL8LA: az IL-8 promóter aktivitását tükröző SLO luciferáz-aktivitás (IL8LA) a GAPDH promóter aktivitását tükröző SLR luciferáz-aktivitással (GAPLA) normalizálva. A sejtleletképeség és a sejtszám figyelembevételét követő IL-8 luciferáz-aktivitás mutatója.

nSLO-LA: az nIL8LA értékre utaló rövidítés, amelyet az IL-8 Luc vizsgálatra vonatkozó validálási jelentésben és korábbi publikációkban használtak. Meghatározását lásd az nIL8LA címszó alatt.

Pozitív kontroll a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó anyaggal kezelt replikátum. Annak biztosítása érdekében, hogy a pozitív kontrollban jelentkező hatás időbeli változását fel lehessen mérni, a pozitív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Pre-hapténok: abiotikus átalakulás révén szenzibilizálóká váló vegyi anyagok.

Pro-hapténok: olyan vegyi anyagok, amelyek enzimatisz aktivációt igényelnek bőrszenzibilizáló hatásuk kifejtéséhez.

Relevancia: a vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálat pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (16).

Megbízhatóság: a vizsgálat laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. Megállapítása a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság, valamint a laboratóriumon belüli megismételhetőség kiszámításával történik (16).

Vizsgálatmenet: egy vizsgálatmenet során egy vagy több vizsgálati vegyi anyagot vizsgálnak egy párhuzamos oldószeres/vivőanyagos kontrollal és egy pozitív kontrollal.

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálat helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (16).

SLO-LA: az IL8LA értékre utaló rövidítés, amelyet az IL-8 Luc vizsgálatra vonatkozó validálási jelentésben és korábbi publikációkban használtak. Meghatározását lásd az IL8LA címszó alatt.

SLR-LA: a GALPA értékre utaló rövidítés, amelyet az IL-8 Luc vizsgálatra vonatkozó validálási jelentésben és korábbi publikációkban használtak. Meghatározását lásd a GAPLA címszó alatt.

Oldószeres/vivőanyagos kontroll: valamely vizsgálati rendszernek a vizsgálati vegyi anyagon kívüli összes összetevőjét tartalmazó kezeletlen minta, amely azonban magában foglalja az alkalmazott oldószert/vivőanyagot. Az ugyanabban az oldószerben/vivőanyagban feloldott vagy stabilan diszpergált vizsgálati vegyi anyaggal kezelt minták esetében a kiindulási érték létrehozásához használatos. Párhuzamos tápoldatos kontrollal elvégzett vizsgálata esetén ez a minta azt is bizonyítja, hogy az oldószer/vivőanyag kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati rendszerrel.

Specifitás: a vizsgálat elvégzésével helyesen besorolt összes negatív/inaktív vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (16).

Anyag: természetes állapotban előforduló vagy termelőfolyamatból származó kémiai elemek és azok vegyületei, amelyek a termék stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagokat és az alkalmazott folyamatból származó szennyeződések is tartalmazhatnak, de nem tartalmaznak olyan oldószereket, amelyek az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltozása nélkül elkülöníthetők.

Felületaktív anyag: olyan anyag (például mosószer), amely csökkentheti a folyadékok felületi feszültségét, és így lehetővé teszi, hogy habozzanak vagy áthatoljanak szilárd anyagokon; nedvesítőszerként is ismert. (TG437)

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

THP-G8: az IL-8 Luc vizsgálatban használt IL-8 riporter sejtvonalt. A humán makrofágyszerű THP-1 sejtvonalt transzfektálták az IL-8 promóterrel szabályozott stabil narancssárga luciferáz (SLO) luciferáz génnel és a GAPDH promóterrel szabályozott stabil vörös luciferáz (SLR) luciferáz génnel.

A vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete által globálisan harmonizált rendszere (ENSZ-GHS): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (21).

UVCB: ismeretlen szerkezetű vagy változó összetételű, összetett reakcióban keletkezett vagy biológiai eredetű anyagok.

Érvényes vizsgálati módszer: olyan vizsgálat, amely kellően relevánsnak és megbízhatónak minősül egy adott célra, és amely tudományosan megalapozott elveken alapul. Egy-egy vizsgálat abszolút értelemben soha nem érvényes, kizárólag meghatározott céllal összefüggésben.

3.2. függelék

A LUCIFERÁZ-AKTIVITÁS MÉRÉSÉNEK ÉS AZ SLO/SLR MÉRÉSÉHEZ HASZNÁLT OPTIKAI SZŰRŐ TRANZMISSZIÓS KOEFFICIENSE MEGHATÁROZÁSÁNAK ELVE

Több riportert alkalmazó vizsgálati rendszer – Tripluc – használható, több szint detektálására képes rendszerrel működő mikrolemez típusú luminométerrel, amely felszerelhető optikai szűrővel (pl. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). A mérések során használt optikai szűrő 600–620 nm-es long vagy short pass szűrő, illetve 600–700 nm-es sávszűrő.

Két különböző színű luciferáz mérése egy optikai szűrővel

Az alábbi példában Phelios AB-2350 (ATTO) típusú szűrőt használtak. Ez a luminométer az SLO ($\lambda_{\max} = 580$ nm) és az SLR ($\lambda_{\max} = 630$ nm) lumineszcens jeleinek megkülönböztetésére egy 600 nm-es long pass szűrőt alkalmaz (R60 HOYA Co., 600 nm-es LP, 1. szűrő).

A 600 nm-es LP-szűrő transzmissziós koeficiensének meghatározásához tisztított SLO és SLR luciferáz enzim használatával megméri i) az SLO és az SLR biolumineszcenciájának intenzitását szűrő nélkül (F_0), ii) az SLO és az SLR biolumineszcenciájának intenzitását 600 nm-es LP-szűrőn (1. szűrőn) keresztül, valamint iii) kiszámolják a 600 nm-es LP-szűrő alábbi transzmissziós koeficiensait az SLO és az SLR méréséhez.

Transzmissziós koeficiens		Rövidítés	Meghatározás
SLO	1. szűrő transzmissziós koeficiens	$k_{O_{R60}}$	a szűrő transzmissziós koeficiens az SLO esetében
SLR	1. szűrő transzmissziós koeficiens	$k_{R_{R60}}$	a szűrő transzmissziós koeficiens az SLR esetében

Ha a vizsgálati minta SLO intenzitását O-val, SLR intenzitását R-rel jelöljük, akkor i) a fény (optikai) szűrő nélküli intenzitása (F_0) és ii) a 600 nm-es LP-szűrőn (1. szűrőn) keresztül haladó fény intenzitása (F_1) az alábbiak szerint határozható meg.

$$F_0 = O + R$$

$$F_1 = k_{O_{R60}} \times O + k_{R_{R60}} \times R$$

Ezeket a képleteket az alábbi módon is fel lehet állítani:

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

Ezt követően a kiszámított transzmissziós tényezők (κO_{R60} és κR_{R60}), valamint a mért F0 és F1 alapján kiszámolható az O és az R értéke:

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

A transzmissziós tényező meghatározásához használat eszközök és módszerek

(1) Reagensek

Az egyes tisztított luciferáz enzimek:

Liofilizált tisztított SLO enzim

Liofilizált tisztított SLR enzim

(amelyeket a validálási tevékenységek céljára a GPC Lab. Co. Ltd. vállalatától (Tottori, Japán) szereztek be, a THP-G8 sejtvonallal együtt)

Vizsgálati reagens:

Tripluc® luciferáz vizsgálati reagens (beszerezhető például: TOYOBO, kat.száma: MRA-301)

Tápoldat: a luciferáz vizsgálatához (30 ml, 2–8 °C-on tárolva)

Reagens	Konc.	Végső konc. tápoldatban	Szükséges mennyiség
RPMI-1640	-	-	27 ml
FBS	-	10 %	3 ml

(2) Az enzimoldat elkészítése

Csőbe helyezett liofilizált tisztított luciferáz enzimet oldjunk fel 10 tömegszázalékos glicerinnel kiegészített, 200 µl mennyiségű 10 ~ 100 mM Tris/HCl-dal vagy Hepes/HCl-dal (pH-értéke: 7,5 ~ 8,0), majd az enzimoldatot 10 µl mennyiségben adagoljuk ki 1,5 ml-es eldobható csövekbe, és tároljuk fagyasztoóban, –80 °C-on. A fagyasztott enzimoldat akár 6 hónapig is felhasználható. Felhasználásukkor az enzimoldatot tartalmazó csövekhez adjunk hozzá 1 ml-t a luciferáz vizsgálat tápoldatából (10 % FBS-sel kiegészített RPMI-1640), így egy hígított enzimoldatot kapunk, amelyet az enzim deaktivációjának megelőzése érdekében jégen kell tartani.

(3) A biolumineszcencia mérése

Olvasszuk fel a Tripluc® luciferáz vizsgálati reagenst (Tripluc), és tartsuk szobahőmérsékletű vízfürdőben vagy szobahőmérsékletű levegőn. A fotomultiplikátor stabilizálódása érdekében a mérés előtt 30 perccel kapcsoljuk be a luminométert. Helyezzünk át 100 µl feloldott enzimoldatot egy fekete 96 lyukú (lapos fenekű) lemezre (az SLO referenciamintáját a B1, B2 és B3 lyukakba, az SLR referenciamintáját pedig a D1, D2 és D3 lyukakba). Ezt követően pipettával adagoljunk 100 µl felmelegített Tripluc reagenst a lemez feloldott enzimoldatot tartalmazó valamennyi lyukába. Lemezrázón rázassuk a lemezt szobahőmérsékleten (kb. 25 °C-on) 10 percig. Ha a lyukakban lévő oldatokban buborékok keletkeznének, távolítsuk el azokat. Helyezzük a lemezt a luciferáz-aktivitás méréséhez a luminométerbe. A biolumineszcenciát 3 másodpercig mérik optikai szűrő nélkül (F0) és optikai szűrővel (F1).

Az optikai szűrő transzmissziós koefficiensét az alábbi módon határozhatjuk meg:

Transzmissziós koefficiens (SLO ($\kappa_{O_{R60}}$)) = (B1-nél mért F1 + B2-nél mért F1 + B3-nál mért F1) / (B1-nél mért F0 + B2-nél mért F0 + B3-nál mért F0)

Transzmissziós koefficiens (SLR ($\kappa_{O_{R60}}$)) = (D1-nél mért F1 + D2-nél mért F1 + D3-nál mért F1) / (D1-nél mért F0 + D2-nél mért F0 + D3-nál mért F0)

Az ily módon meghatározott transzmissziós tényezők az adott luminométerrel végzett valamennyi méréshez felhasználhatók.

A berendezések minőség-ellenőrzése

Az IL-8 Luc vizsgálati protokollban leírt eljárásokat kell használni (18).

3.3. függelék

JÁRTASSÁGI TESZTANYAGOK

A B.71. vizsgálati módszer e függelékben ismertetett vizsgálatának rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak igazolniuk kell szakmai jártasságukat oly módon, hogy az 1. táblázatban javasolt 10 anyagra vonatkozóan az IL-8 Luc vizsgálattal várható előrejelzést kapják meg, továbbá a 10 jártassági testanyag közül legalább 8 esetben referenciatartományba eső értékeket kapnak (e jártassági testanyagokat úgy választották ki, hogy a bőrszenzibilizáció veszélye esetén bekövetkező válaszreakciók teljes tartományát képviseljék). A kiválasztás többi kritériuma az volt, hogy a vegyi anyagok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők legyenek, azokra vonatkozóan kiváló minőségű in vivo referenciaadatok álljanak rendelkezésre, és az IL-8 Luc vizsgálat alapján kiváló minőségű in vitro adatok álljanak rendelkezésre. Az IL-8 Luc vizsgálathoz rendelkezésre állnak publikált referenciaadatok is (6) (1).

1. táblázat: Az IL-8 Luc vizsgálatban való szakmai jártasság bizonyításához ajánlott anyagok

Jártassági testanyagok	CAS- szám	Oldhatósági	állapot 20 mg/ml X- VIVO15- ben	In vivo előrejelzés ¹	IL-8 Luc előrejelzés ²	Referenciatartomány (µg/ml) ³	
						CV05 ⁴	IL-8 Luc MIT ⁵
2,4-dinitro-klór- benzol	97- 00-7	Szilárd	Oldhatatlan	Szenzibilizáló (szélsőségesen)	Pozitív	2,3–3,9	0,5–2,3
Formaldehid	50- 00-0	Folyadék	Oldható	Szenzibilizáló (erősen)	Pozitív	9–30	4–9
2- merkaptobenzotiazol	149- 30-4	Szilárd	Oldhatatlan	Szenzibilizáló (mérsékelt)	Pozitív	250–290	60–250
Etilén-diamin	107- 15-3	Folyadék	Oldható	Szenzibilizáló (mérsékelt)	Pozitív	500–700	0,1–0,4
Etilén-glikol- dimetakrilát	97- 90-5	Folyadék	Oldhatatlan	Szenzibilizáló (enyhén)	Pozitív	> 2000	0,04–0,1
4-allil-anisol (esztragol)	140- 67-0	Folyadék	Oldhatatlan	Szenzibilizáló (enyhén)	Pozitív	> 2000	0,01– 0,07
Sztreptomicin- szulfát	3810- 74-0	Szilárd	Oldható	Nem szenzibilizáló	Negatív	> 2000	> 2000
Glicerín	56- 81-5	Folyadék	Oldható	Nem szenzibilizáló	Negatív	> 2000	> 2000
Izopropanol	67- 63-0	Folyadék	Oldható	Nem szenzibilizáló	Negatív	> 2000	> 2000

Rövidítések: CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám.

¹Az in vivo hatáserősség levezetése az ECETOC által javasolt kritériumok segítségével történik (19).

²A megfigyelt dokumentált értékek alapján (1) (6).

³A CV05 és az IL-8 Luc MIT értékét az EPI Suite™ által megadott vízőldékonyság alapján számították ki.

⁴CV05: az a legalacsonyabb koncentráció, amelynél a vegyi anyag az Inh-GAPLA 0,05 alatti szintjét idézi elő.

⁵MIT: az a legalacsonyabb koncentráció, amelynél a vegyi anyag eleget tesz a pozitív besorolás kritériumainak.

3.4. függelék

INDEXEK ÉS DÖNTÉSI KRITÉRIUMOK

nIL8LA (nSLO-LA)

Az IL8LA (SLO-LA) és a GAPLA (SLR-LA) tekintetében megméri az *i.* koncentráció (*i* = 0–11) *j.* ismétlését (*j* = 1–4). A normalizált IL8LA, vagyis az nIL8LA (nSLO-LA), az alábbiak szerint határozható meg:

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

Ez a vizsgálat alapvető mutatója.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Az ismétlés átlagos nIL8LA (nSLO-LA) értékének az *i.* koncentrációban tapasztalt növekedési faktora összevetve a 0. koncentráció növekedési faktorával, ez a vizsgálat elsődleges mutatója. A két növekedési faktor aránya az alábbi egyenlettel írható le:

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

A vezető laboratórium javaslata szerint az 1,4-es érték a vizsgálati vegyi anyag pozitív besorolását eredményezi. Ez az érték a vezető laboratórium dokumentált adatainak vizsgálatán alapul. Az adatkezelő csoport ezt az értéket használta a validálási tanulmány valamennyi szakaszában. Az elsődleges eredmény, az Ind-IL8LA a két számtani átlag aránya, ahogyan az az egyenletből is látszik.

95 %-os konfidenciaintervallum (95 % CI)

Az Ind-IL8LA arányon alapuló 95 %-os konfidenciaintervallum (95 % CI) megbecsülésével kimutatható az elsődleges eredmény mérésének pontossága. Amennyiben a 95 %-os konfidenciaintervallum alsó határértéke legalább 1, az arra utal, hogy az *i.* koncentrációnál elért nIL8LA érték jelentősen nagyobb az oldószeres kontroll nIL8LA értékénél. A 95 %-os konfidenciaintervallum meghatározásának több módja is létezik. Ebben a vizsgálatban az úgynevezett Fieller-tételt alkalmaztuk. E tétel alapján a 95 %-os konfidenciaintervallumot az alábbi egyenlet segítségével határozhatjuk meg:

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

ahol:

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

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

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

a $t_{0.975(v)}$ a centrális t eloszlás 97,5. percentilise v szabadságfokkal, ahol

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

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Az Inh-GAPLA az ismétlés i. koncentrációjában mért átlagos GAPLA (SLR-LA) érték és az oldószeres kontroll átlagos GAPLA (SLR-LA) értékének aránya, amely az alábbi egyenlettel írható le:

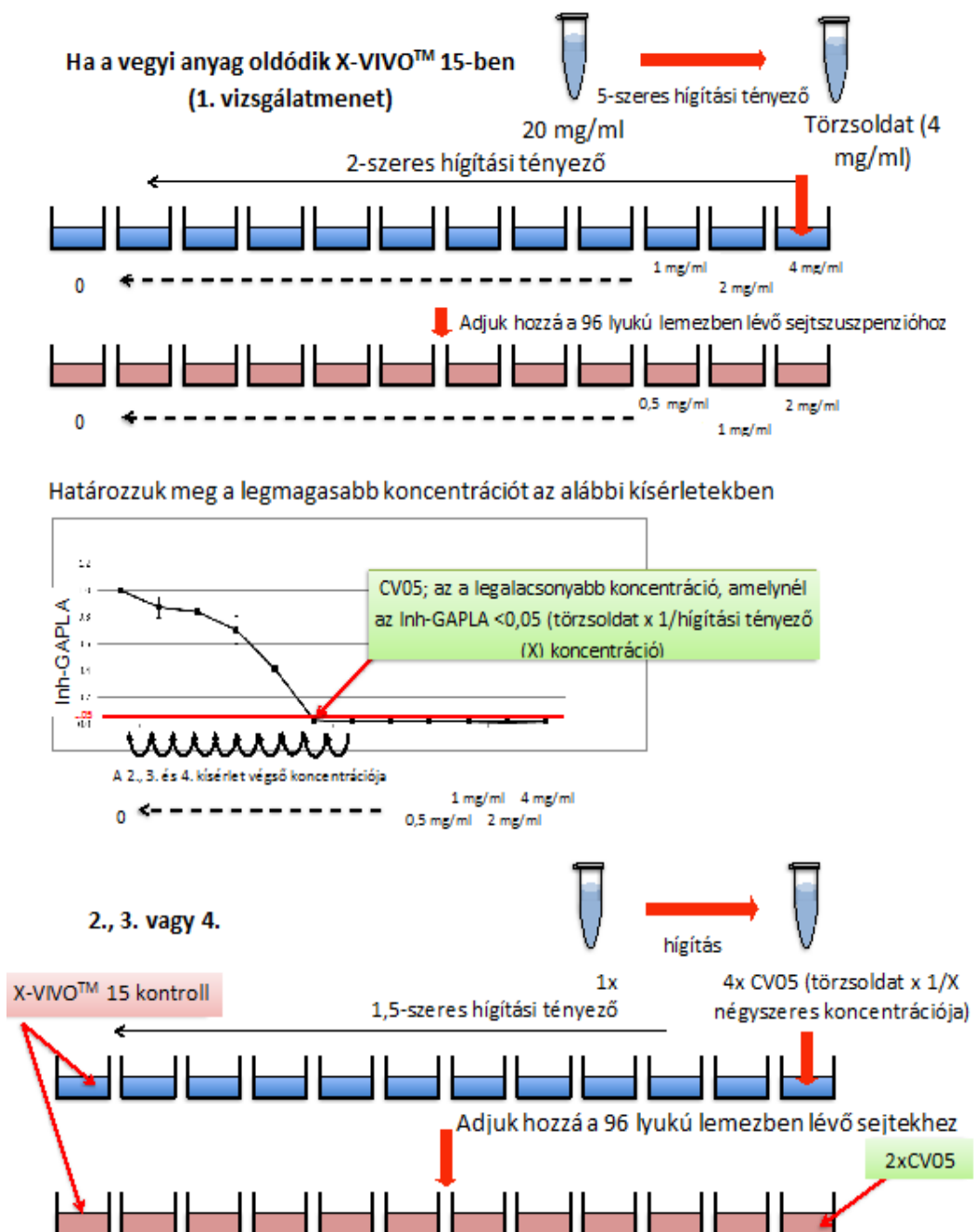
$$Inh - GAPLA_i = \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij}\} / \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j}\}.$$

Mivel a GAPLA az nIL8LA nevezője, a szélsőségesen alacsony értékek az nIL8LA nagy variabilitását jelzik. Ezért előfordulhat, hogy a szélsőségesen alacsony (0,05-nál kisebb) Inh-GAPLA értékkel rendelkező Ind-IL8LA értékek csekély pontosságúak.

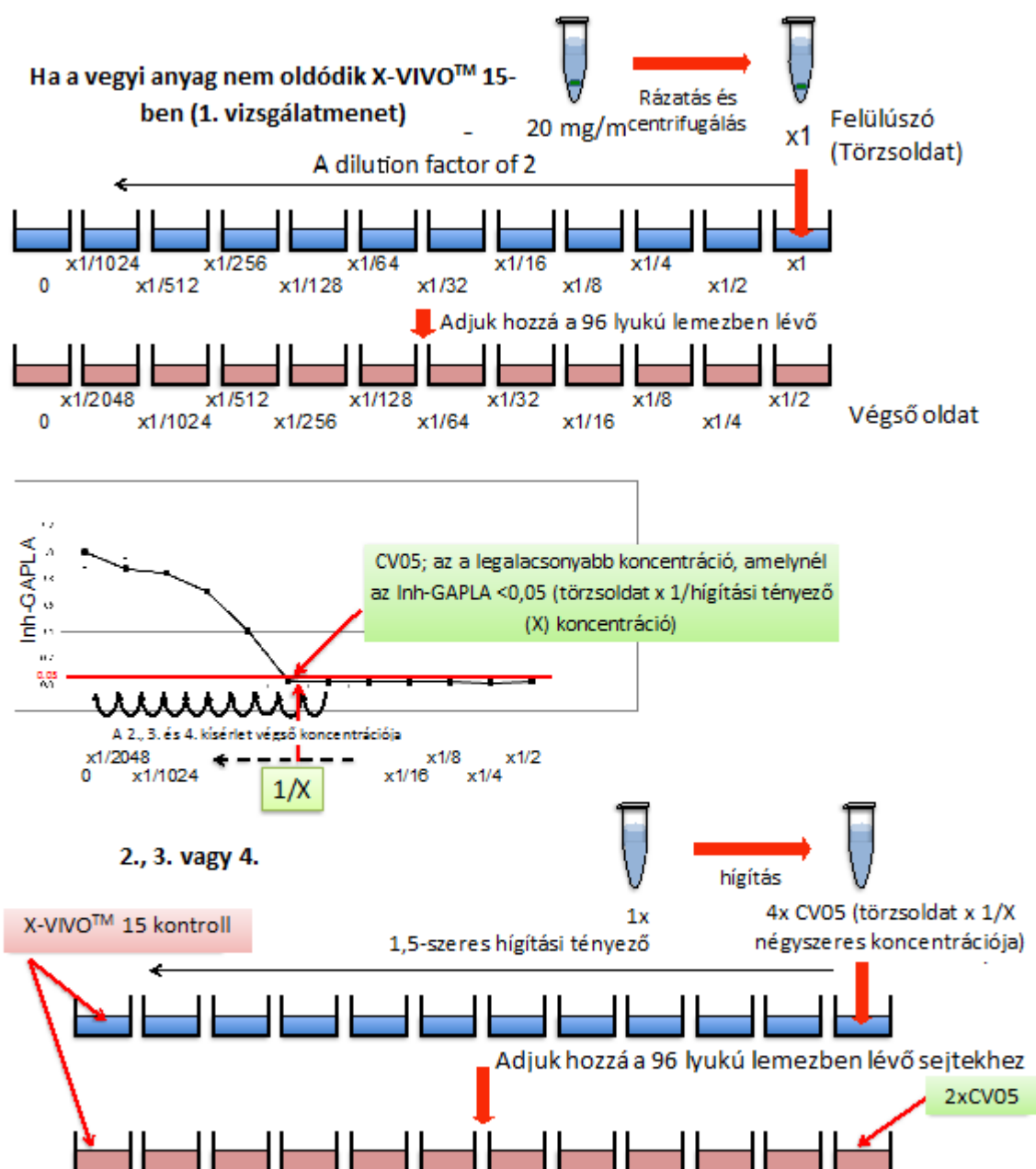
3.5. függelék

**AZ IL-8 LUC VIZSGÁLATBAN A VEGYI ANYAGOK FELOLDÁSÁRA ALKALMAZOTT
MÓDSZEREK SEMATIKUS ÁBRÁJA**

- a) A 20 mg/ml koncentrációjú X-VIVO™ 15-ben oldódó vegyi anyagok esetében

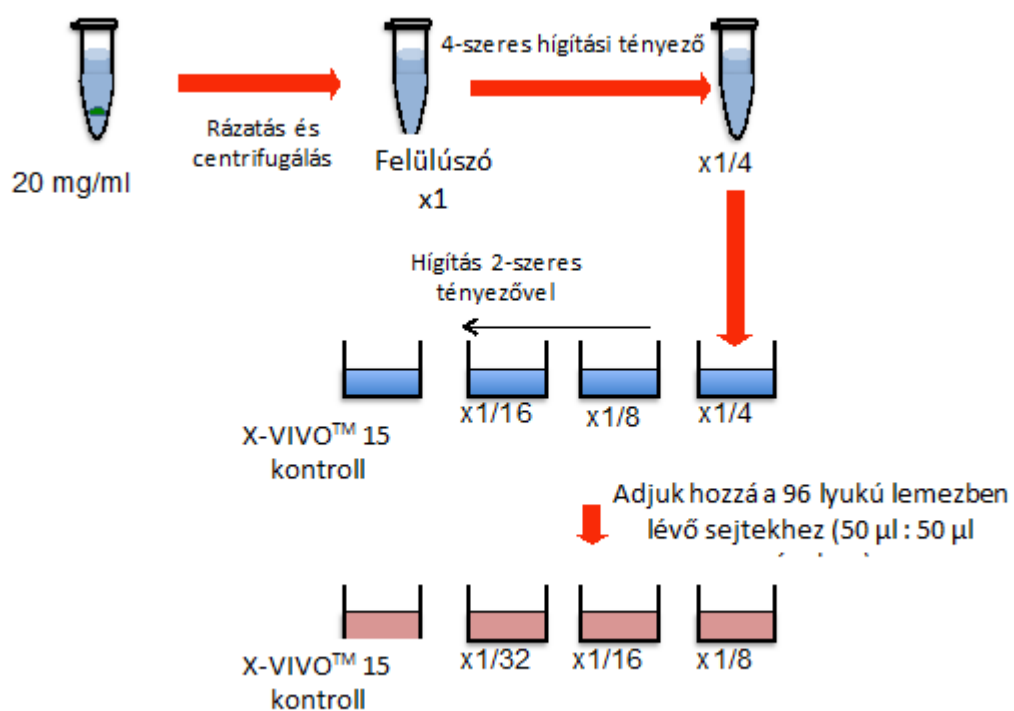


b) A 20 mg/ml koncentrációjú X-VIVO™ 15-ben nem oldódó vegyi anyagok esetében



3.6. függelék

AZ IL-8 LUC VIZSGÁLATBAN A POZITÍV KONTROLLANYAGKÉNT SZOLGÁLÓ 4-NBB FELOLDÁSÁRA ALKALMAZOTT MÓDSZER SEMATIKUS ÁBRÁJA



”

(9) A C. rész a következő fejezetekkel egészül ki:

„C.52. FOGASPONTYON VÉGZETT KIBŐVÍTETT EGYGENERÁCIÓS REPRODUKCIÓS VIZSGÁLAT (MEOGRT)

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 240. vizsgálati iránymutatásában (2015) leírt módszerrel. A fogaspontyon végzett kibővített egygenerációs vizsgálat (MEOGRT) egy átfogó, halak több generációjának kezelésén alapuló vizsgálati módszert ír le, amelynek során adatokat gyűjtenek vegyi anyagok, köztük az endokrin rendszert feltételezhetően károsító vegyi anyagok ökológiai veszélyeinek és kockázatainak értékeléséhez. A fogaspontyon végzett kibővített egygenerációs vizsgálatban a halakat a második (F2) generáció kikeléséig (a megtermékenyítés után két hétig) folyamatosan kezelik. Az F2 generáció kikelés utáni fenntartásának hasznosságát további vizsgálatokkal kellene alátámasztani; jelenleg nem áll rendelkezésre elegendő információ olyan körülmények vagy feltételek meghatározásához, amelyek indokolttá tennék az F2 generáció fennmaradásának meghosszabbítását. A vizsgálati módszert azonban új információk és adatok fényében aktualizálhatják. Bizonyos körülmények között például hasznosnak bizonyulhat egy iránymutatás az F2 generáció fenntartásának a szaporodási fázist is magában foglaló meghosszabbításáról (pl. olyan vegyi anyagok esetében, amelyek jelentős mértékű bioakkumulációt idéznek elő, illetve ha más taxonokat érintő transzgenerációs hatás figyelhető meg). Ezzel a vizsgálati módszerrel a vegyi anyagok, köztük az endokrin rendszert potenciálisan zavaró vegyi anyagok halakra gyakorolt potenciális krónikus hatásai értékelhetők. A módszer elsődleges célja a halpopulációnál esetlegesen fellépő releváns hatások (vagyis a túlélésre, a fejlődésre, a növekedésre és a szaporodásra gyakorolt káros hatások) meghatározása, amelyek alapján kiszámítható a megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC) vagy a hatásos koncentráció (ECx), ugyanakkor megjegyzendő, hogy az ECx megállapításán alapuló megközelítések ritkán alkalmazhatók az ilyen nagy léptékű vizsgálatokra, ahol a vizsgált koncentrációk számának a kívánt ECx meghatározásához szükséges növelése kivitelezhetetlen lehet, ráadásul a vizsgált állatok nagy száma miatt állatjóléti szempontból jelentős aggályokat vethet fel. Azok a vegyi anyagok, amelyek értékeléséhez nincs szükség több generáció bevonására, illetve amelyek feltételezhetően nem zavarják az endokrin rendszer működését, más vizsgálati módszerekkel esetleg hatékonyabban vizsgálhatók (1). E vizsgálati módszer alkalmazására a japán fogasponty a megfelelő faj, mivel életciklusa rövid és genetikai ivara meghatározható (2), ez utóbbi a vizsgálati módszer egyik alapvető fontosságú eleme. A módszer által leírt egyedi eljárások és megfigyelt végpontok kizárólag a japán

fogasponyra alkalmazhatók. Esetlegesen más kistestű halfajokra (pl. a zabradánióra) is kidolgozhatók hasonló vizsgálati protokollok.

2. Ezzel a vizsgálati módszerrel több biológiai végpont mérhető. A módszer elsősorban a populáció szempontjából releváns paraméterekre – többek között a túlélésre, az általános fejlődésre, a növekedésre és a szaporodásra – gyakorolt esetleges káros hatásokra helyezi a hangsúlyt. Másodsorban, annak érdekében, hogy adatokat szolgáltatson a mechanizmusra vonatkozólag és összekapcsolja más típusú terepvizsgálatok és laboratóriumi vizsgálatok azon eredményeit, amelyek utólagosan bizonyítják egy adott (pl. más tesztekben és vizsgálatokban androgén- vagy ösztrogénhatásúnak bizonyult) vegyi anyag potenciális hormonháztartást zavaró hatását, egyéb hasznos adatokat is biztosít a *vitellogenin* (*vtg*) mRNS (vagy vitellogenin fehérje, VTG) mérése, a fenotípusos másodlagos ivari jellegek (SCC) genetikai ivarhoz kapcsolódásának meghatározása és kórszövettani értékelések révén. Amennyiben azonban egy adott vizsgálati vegyi anyag vagy metabolitjai feltételezhetően nem fejtenek ki hormonháztartást zavaró hatást, szükségtelen lehet e másodlagos végpontok mérése, így megfelelőbbek lehetnek kevésbé erőforrásigényes, kevesebb vizsgált állatot alkalmazó vizsgálatok (1). Az e vizsgálati módszerben használt fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatók.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

3. Miután e meglehetősen összetett vizsgálat validálását korlátozott számú vegyi anyagon és korlátozott számú laboratórium bevonásával végezték el, várható, hogy amikor elegendő számú vizsgálat áll rendelkezésre ezen új vizsgálati terv hatásának megállapítására, a vizsgálati módszert a szerzett tapasztalatok fényében felülvizsgálják, és szükség szerint átdolgozzák. Az adatok az OECD endokrin rendszert károsító anyagok vizsgálatára és értékelésére vonatkozó fogalmi keretének 5. szintjén alkalmazhatók (3). A vizsgálati módszer első lépéseként szaporodási fázisban lévő felnőtt halakat (az F0 generációt) kezelnek a vizsgálati vegyi anyaggal. A kezelés folytatódik az F1 generáció kifejlődése és szaporodása alatt, egészen az F2 generáció kikeléséig; a vizsgálat ebből kifolyólag lehetővé teszi mind a strukturális, mind az aktivációs endokrin útvonalak értékelését. Az endokrin rendszerrel összefüggő végpontok értelmezhetők bizonyíték súlyán (WoE) alapuló megközelítés keretében.
4. A vizsgálatban megfelelő számú egyednek kell alkalmazni ahhoz, hogy kellő statisztikai erőt képviseljenek a szaporodáshoz kapcsolódó végpontok értékeléséhez (lásd a 3. függelék), állattól okok miatt ugyanakkor a vizsgált állatok számát a szükséges minimumra kell korlátozni. Tekintettel a vizsgált állatok nagy számára, alaposan mérlegelni kell a vizsgálat szükségességét a már rendelkezésre álló adatok fényében, amelyek a fogaspontyon végzett

kibővített egygenerációs vizsgálat számos végpontját illetően tartalmazhatnak releváns információkat. Ezzel kapcsolatban az OECD halakon végzett toxicitásvizsgálatokra vonatkozó keretrendszere nyújthat támpontokat (1).

5. A vizsgálati módszert elsősorban az egyetlen anyag által előidézett hatások azonosítására dolgozták ki. Amennyiben a vizsgálatot keverékeken szükséges alkalmazni, akkor meg kell vizsgálni, hogy az elfogadható eredményeket biztosít-e a szándékolt szabályozási célra.
6. A vizsgálat megkezdése előtt információkat kell szerezni a vizsgálati vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságairól, különösen azért, hogy stabil oldatokat lehessen készíteni a vegyi anyagból. Emellett szükség van egy, a vizsgálati vegyi anyag koncentrációjának ellenőrzésére alkalmas, megfelelő érzékenységgű elemzési módszerre.

A VIZSGÁLAT ELVE

7. A vizsgálat első lépéseként tenyészpárokba rendezett, ivarérett (a megtermékenyítéstől számítva legalább 12 hetes) hím és nőstény halakat kezelnek 3 héten keresztül, amelynek során a vizsgálati vegyi anyagot toxikokinetikai tulajdonságainak megfelelően adagolják a szülői generáció (F0) egyedei számára. A negyedik hét első napjához lehető legközelebbi időpontban begyűjtik az ikrákat, amelyekből létrehozzák az F1 generációt. Az F1 generáció felnevelése során (ami összesen 15 hetet vesz igénybe) felmérik a kikelési és a túlélési arányt. Emellett a megtermékenyítés utáni 9–10. héten mintákat vesznek a halaktól a fejlődési végpontok méréséhez, valamint értékelik az ivást a megtermékenyítés utáni 12. héttől a 14. hétig tartó háromhetes időszakon keresztül. Az F2 generáció a szaporodás értékelésének 3. hetét követően indul, nevelésük a kikelés lezárultáig tart.

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGI KRITÉRIUMAI

8. A vizsgálat érvényességéhez az alábbi kritériumoknak kell teljesülniük:
 - a vizsgálat során az oldott oxigén koncentrációjának mindvégig el kell érnie a levegőteltettségi érték 60 %-át;
 - a vizsgálat teljes időtartama alatt a víz átlaghőmérsékletének 24 és 26 °C között kell lennie. Az egyes akváriumok csak rövid ideig és legfeljebb 2 °C-kal térhetnek el ettől az átlagértéktől;
 - a kontrollok átlagos fekunditásának az egyes generációk (F0 és F1) tekintetében tenyészpáronként és naponként meg kell haladnia a 20 ikrát. Az értékelési időszak során lerakott ikrák termékenysége meg kell haladnia a 80 %-ot. Ezenfelül az ajánlott 24

kontrollként szolgáló tenyészpárból 16-nak (> 65 %) naponta és tenyészpáronként több mint 20 ikrát kell leraknia;

- a kontrollvizsgálatokban az ikrák kikelési arányának (átlagosan) el kell érnie a 80 %-ot (mind az F1, mind az F2 generációban);
- az F1 kontrollvizsgálatokban az F1 generáció kikeléstől a megtermékenyítés utáni 3. hétig mért túlélési arányának el kell érnie az átlag 80 %-ot, a megtermékenyítés utáni 3. héttől a elpusztításig (vagyis a megtermékenyítés utáni 15. hétig) pedig az átlag 90 %-ot;
- bizonyítékkal kell alátámasztani, hogy a vizsgálati vegyi anyag oldatban lévő koncentrációit az átlagos mért értékek ± 20 %-os tartományán belül sikerült tartani.

Bár ez nem érvényességi kritérium, a vízhőmérséklet tekintetében az egy kezeléshez tartozó ismétlések statisztikailag nem különbözhetnek egymástól, csakúgy mint az egy vizsgálaton belüli kezelési csoportok sem különbözhetnek statisztikailag egymástól (a napi hőmérsékletmérések alapján, a rövid idejű ingadozásokat leszámítva).

9. Bár a magasabb koncentrációknak kitett csoportokban csökkenhet a reprodukciós arány, az F0 generáció harmadik legmagasabb koncentrációnak kitett csoportjában és az összes alacsonyabb koncentrációval kezelt csoportjában elegendő szaporulatnak kell lennie ahhoz, hogy megteljenek a keltető inkubátorok. Ezen túlmenően az F1 generáció harmadik legmagasabb koncentrációval és az alacsonyabb koncentrációkkal kezelt csoportjaiban az embriók túlélési arányának lehetővé kell tennie az ivarérés előtti egyedektől vett mintákon végzett végpontértékelést (lásd a 36. és a 38. pontot, valamint a 9. függelék). Emellett az F1 generáció második legmagasabb koncentrációval kezelt csoportjában a kikelés utáni túlélési arálynak el kell érnie egy minimális szintet (~20 %). Ezek nem kifejezett érvényességi kritériumok, hanem ajánlások, amelyek megbízható NOEC-értékek meghatározását teszik lehetővé.
10. Az érvényességi kritériumoktól való eltérés esetén mérlegelni kell a vizsgálat eredményeinek megbízhatóságára gyakorolt következményeket, az eltéréseket és a mérlegelt következményeket pedig bele kell foglalni a vizsgálati jegyzőkönyvbe.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Berendezés

11. Normál laboratóriumi felszerelés és különösen az alábbiak:

- a) oxigéntartalom- és pH-mérők;
- b) a víz keménységi fokának és lúgosságának mérésére szolgáló berendezések;

- c) a hőmérséklet szabályozására és lehetőleg folyamatos figyelemmel kísérésére is alkalmas készülékek;
- d) kémiaiilag semleges anyagból készült és az ajánlott betelepítési aránynak és állománysűrűségnek megfelelő kapacitású tartályok (lásd a 3. függelékét);
- e) megfelelő pontosságú mérleg (azaz $\pm 0,5$ mg pontosságú).

Víz

12. A vizsgálat céljára bármilyen víz felhasználható, amelyben a vizsgálati fajok kellően hosszú ideig megélnek a vizsgálati körülmények mellett, és növekednek. A víz minőségét a vizsgálat során mindvégig azonos szinten kell tartani. Annak biztosítására, hogy a hígítóvíz ne gyakoroljon nem kívánt hatást a vizsgálat eredményeire (pl. mert komplexet képez a vizsgálati vegyi anyaggal), illetve ne gyakoroljon kedvezőtlen hatásokat a tenyészállomány teljesítményére, időnként mintákat kell venni elemzésre. Nehézfémek (pl. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), főbb anionok és kationok (pl. Ca^{2+} , mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), növényvédő szerek, összes szerves szén és szuszpendált szilárd anyag mérését el kell végezni, például félévente, amennyiben a hígítóvíz ismerten viszonylag állandó minőségű. Az elfogadható minőségű hígítóvíz néhány kémiai tulajdonságának felsorolása a 2. függelékben található. A víz pH-értékének a 6,5–8,5 tartományon belül kell lennie, azonban egy adott vizsgálat során a pH-érték csak $\pm 0,5$ egységgel térhet el a kiindulási értéktől.

Expozíciós rendszer

13. Az expozíciós rendszer kialakítása és az alkalmazott eszközök nem kerültek meghatározásra. A vizsgálati rendszer felépítéséhez üveg, rozsdamentes acél és kémiaiilag semleges anyagok használhatók, amelyek nem szennyeződtek be korábbi vizsgálatok során. Ebben a vizsgálatban megfelelő expozíciós rendszer lehet a folyamatos vízcserét biztosító átfolyósos rendszer (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13).

Vizsgálati oldatok

14. A vizsgálati vegyi anyag törzsoldatát megfelelő szivattyúval adagolják az expozíciós rendszerbe. Az expozíciót megelőzően a törzsoldat áramlási sebességét a vizsgálati oldatok analitikus módszerrel való megerősítésével összhangban kalibrálják, az áramlási mennyiséget pedig a vizsgálat során rendszeresen ellenőrzik. A vizsgálati oldatot minden kamrában megfelelő módon, a vizsgálati vegyi anyag stabilitásától és a vízminőségtől függően megújítják (pl. legalább napi 5 térfogatcsere és legfeljebb napi 16 térfogatcsere vagy legfeljebb 20 ml/perc áramlás).
15. A kiválasztott koncentrációjú vizsgálati oldatok a törzsoldat hígításával készíthetők el. A törzsoldatot lehetőleg a vizsgálati vegyi anyagnak a hígítóvízbe mechanikai eszközök (pl.

keverő és/vagy ultrahang) segítségével történő bekeverésével vagy hozzákeverésével kell elkészíteni. Telítési oszlopok/rendszerek vagy passzív adagolási módszerek (14) is alkalmazhatók a megfelelő koncentrációjú törzsoldat elkészítéséhez. Minden erőfeszítést meg kell tenni az oldószerek vagy hordozók elkerülése érdekében, mivel: (1) bizonyos oldószerek maguk is toxicitást és/vagy nem kívánatos vagy nem várt válaszokat idézhetnek elő, (2) a vegyi anyagoknak a vízdoldhatóságuk határán túli vizsgálata (ami gyakran előfordul oldószerek használata esetén) a hatásos koncentráció pontatlan meghatározását eredményezheti, (3) hosszabb távú vizsgálatok során az oldószerek használata jelentős mértékű „biofilmképződést” eredményezhet, ami mikrobiális tevékenységgel jár együtt, amely befolyásolhatja a környezeti feltételeket és a vizsgált koncentrációk fenntartásának képességét, valamint (4) olyan dokumentált adatok hiányában, amelyek igazolják, hogy az oldószer nem befolyásolja a vizsgálat kimenetelét, oldószer használata esetén oldószeres kontrollként szolgáló kezelést kell végezni, aminek állatjóléti következményei vannak, mivel a vizsgálat lefolytatása további állatok bevonását igényli. A nehezen vizsgálható vegyi anyagoknál legvégső esetben lehet oldószert alkalmazni, és a legjobb módszer meghatározása érdekében tanulmányozni kell „A nehezen vizsgálható anyagok és keverékek vízi toxikológiai vizsgálata” című 23. OECD-iránymutatást (15). A megfelelő oldószert a vizsgálati vegyi anyag kémiai tulajdonságai és az oldószer használatára vonatkozó dokumentált adatok rendelkezésre állása alapján választják ki. Oldószerhordozó használata esetén a nem oldószeres (negatív) kontrollok (csak hígítóvíz) mellett értékelni kell megfelelő oldószeres kontrollokat is. Amennyiben elkerülhetetlen az oldószer használata, és mikrobiális tevékenység (biofilmképződés) figyelhető meg, ajánlatos a vizsgálat során (legalább hetente) feljegyezni/jelentésbe foglalni a tartályonkénti biofilmképződést. Ideális esetben az oldószer koncentrációját állandó értéken tartják az oldószeres kontroll és a vizsgálati vegyi anyaggal történő minden kezelés során. Amennyiben az oldószer koncentrációját nem tartják állandó értéken, az oldószeres kontrollban a vizsgálati kezelés során alkalmazott legmagasabb oldószer-koncentrációt kell vizsgálni. Oldószerhordozó használata esetén az oldószer legmagasabb koncentrációja nem haladhatja meg a 100 µl/l vagy 100 mg/l értéket (15), és az oldószer koncentrációját a lehető legalacsonyabb szinten (pl. 20 µl/l alatt) javasolt tartani annak érdekében, hogy az oldószer ne gyakoroljon hatást a mért végpontokra (16).

Kísérlethez felhasznált állatok

A halak kiválasztása és tartása

16. A vizsgálatban alkalmazott halfaj rövid életciklusa és genetikai ivarának meghatározhatósága miatt a japán fogaspony (*Oryzias latipes*). Habár más kistestű halfajokra is kidolgozható hasonló vizsgálati protokoll, a vizsgálati módszerben leírt

egyedi eljárások és megfigyelt végpontok kizárólag a japán fogaspontyra alkalmazhatók (lásd az 1. pontot). A fogasponty könnyen szaporítható fogságban; tenyésztésére vonatkozóan léteznek közzétett módszerek (17) (18) (19), továbbá rendelkezésre állnak adatok a rövid időn belüli elhullásával, korai életszakaszával és teljes életciklusával kapcsolatban végzett vizsgálatokból (5) (6) (8) (9) (20). A halakat 16 órás világos és 8 órás sötét időszakot tartalmazó megvilágítás mellett tartják. A halakat élő *Artemia* nauplius sórakkal etetik, szükség esetén kereskedelmi forgalomban kapható pelyhesített haleledellel kiegészítve. Rendszeresen ellenőrizni kell, hogy a kereskedelmi forgalomban beszerezhető haleledel nem tartalmaz-e szennyező anyagokat.

17. A megfelelő haltenyésztési gyakorlatok betartása esetén nem szükséges egyedi tenyésztési protokollt alkalmazni. A fogasponty nevelhető például úgy, hogy 2 literes tartályokba tartályonként 240 lárvát helyeznek a megtermékenyítéstől számított 4. hétig, majd 2 literes tartályokban tartályonként 10 halat tenyésztene a megtermékenyítéstől számított 8. hétig, amikor tenyészpáronként 2 literes tartályba helyezik át őket.

Akklimatizáció és a halak kiválasztása

18. A kísérleti halakat egyetlen laboratóriumi tenyészetből választják ki, és a vizsgálat megkezdése előtt legalább két hétig a vizsgálat során alkalmazandó vízminőség és megvilágítás mellett akklimatizálják (megjegyzés: az akklimatizációs időszak nem in situ expozíciót előkészítő időszak). Ajánlatos a kísérleti halakat saját tenyészetből beszerezni, mivel a felnőtt halaknál a szállítás stresszhatást vált ki, ami befolyásolhatja az ívás megbízhatóságát. A halakat a tartási időszak és az expozíciós fázis alatt naponta kétszer nauplius sórakkal etetik, szükség esetén kereskedelmi forgalomban kapható pelyhesített haleledellel kiegészítve. A megfelelő szaporulat biztosítása érdekében a vizsgálat megkezdéséhez legalább 42 tenyészpár szükséges (illetve 54 tenyészpár, ha az oldószer használatát alátámasztó dokumentált adatok hiánya miatt oldószeres kontrollt kell végezni). Emellett az F0 generáció minden tenyészpárjánál ellenőrizni kell, hogy XX-XY kromoszómával rendelkeznek-e (ami az egyes ivarok esetében a nemi kromoszómák normál eloszlása), hogy elkerülhető legyen a spontán változás következtében XX kromoszómával rendelkező hímek esetleges belefoglalása a vizsgálatba (lásd a 39. pontot).
19. Az akklimatizációs fázis során fel kell jegyezni a haltenyészetben tapasztalt mortalitási arányt, majd egy 48 órás szoktatási időszakot követően az alábbi követelményeket kell alkalmazni:
 - amennyiben a vizsgálati rendszerbe történő áthelyezést megelőző hét napban a mortalitás a halpopuláció 10 %-ánál nagyobb: az egész halállományt ki kell cserélni;

- amennyiben a vizsgálati rendszerbe történő áthelyezést megelőző hét napban a mortalitás a halpopuláció 5–10 %-át érinti: a kéthetes akklimatizációs időszakot további hét nappal meg kell hosszabbítani; amennyiben a mortalitási arány a második hétnapos időszakban meghaladja az 5 %-ot, az egész állományt ki kell cserélni;
 - amennyiben a vizsgálati rendszerbe történő áthelyezést megelőző hét napban a mortalitás a halpopuláció kevesebb mint 5 %-át érinti: az állomány alkalmazható a vizsgálathoz.
20. A vizsgálatot megelőző kéthetes akklimatizációs időszak és az expozíciós időszak alatt a halak nem kaphatnak betegség elleni kezelést, lehetőség szerint a betegségeket egyáltalán ne kezeljék. Betegség klinikai tüneteket mutató halak nem használhatók a vizsgálatban. A vizsgálatot megelőző tenyésztési időszakban tett megfigyeléseket, valamint a megelőző és terápiás kezeléseket fel kell jegyezni.
21. Az expozíciós fázist ivari kétalakúságot mutató, ivarérett kifejlett állatok laboratóriumi készletéből származó, genetikai ivaruk szerint azonosított, 25 ± 2 °C-on tenyésztett halakkal kell megkezdeni. Olyan halakat kell használni, amelyek a kezelést megelőző hét során bizonyították nemzőképességüket (vagyis élő utódokat nemzettek). A vizsgálatban alkalmazott egész halállomány tekintetében a halak vizsgálat elején mért ivaronkénti egyéni testtömegének az azonos ivarú halak testtömege számtani átlagának ± 20 %-os tartományában kell lennie. Az átlagos testtömeg becsült értékének meghatározása érdekében a vizsgálat előtt le kell mérni a halak egy részmintájának tömegét. Olyan halakat kell kiválasztani, amelyek a megtermékenyítéstől számítva legalább 12 hetesek, a nőstények testtömege minimum 300 mg, a hímeké pedig minimum 250 mg.

VIZSGÁLATI TERV

Vizsgálati koncentrációk

22. A vizsgálati vegyi anyagot öt koncentrációban ajánlatos vizsgálni, plusz a kontroll(ok). A vizsgálati koncentrációtartomány meghatározásánál minden információforrást figyelembe kell venni, ideértve a mennyiségi szerkezetaktivitási összefüggéseket (QSAR-okat), az analógokból kereszthivatkozással kapott adatokat, a halakon végzett vizsgálatok, például az akut mortalitási vizsgálatok (e melléklet C.1. fejezete), a halakon végzett rövid távú reprodukciós vizsgálat (e melléklet C.48. fejezete) és más vizsgálati módszerek, pl. e melléklet C.15., C.37., C.41., C.47. vagy C.49. fejezetében szereplő vizsgálatok (21) (22) (23) (24) (25) (26) rendelkezésre álló eredményeit, illetve ha szükséges, egy, lehetőleg reprodukciós fázist is magában foglaló dóziskereső vizsgálat eredményeit. Amennyiben dóziskereső vizsgálatra van szükség, azt a végleges vizsgálat során alkalmazott körülményekhez hasonló feltételek (vízminőség, vizsgálati rendszer, állatok betelepítése)

mellett lehet elvégezni. Amennyiben oldószer használata szükséges, és nem állnak rendelkezésre dokumentált adatok, a dóziskereső vizsgálat használható az oldószer megfelelőségének megállapítására. A legmagasabb vizsgált koncentráció nem haladhatja meg a 10 mg/l vagy 1/10 koncentrációjú 96h-LC50 vízdoldhatóságát (27). A legalacsonyabb koncentrációnak 10-szer–100-szor alacsonyabbnak kell lennie a legmagasabb koncentrációnál. Öt vizsgálati koncentráció alkalmazása nem csupán a dózis-válasz összefüggés mérését teszi lehetővé, hanem a megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció (LOEC) és a megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC) meghatározását is, amelyek bizonyos szabályozói programokban vagy jogrendszerben szükségesek a kockázatértékeléshez. Általában a vizsgálati vegyi anyag nominális koncentrációi közötti osztásköz az egymás melletti kezelési szintek tekintetében legfeljebb 3,2.

Vizsgálati csoportok és kontrollok ismételései

23. Vizsgálati koncentrációnként a vizsgálati kamrákból legalább hat ismétlést kell készíteni (lásd a 7. függelék). A reprodukciós fázis során (az F0 generáció kivételével) az ismétlések számát meg kell duplázni a fekunditás méréséhez, ebben a fázisban minden ismétlés csak egyetlen tenyészpárt tartalmaz (lásd a 42. pontot).
24. A vizsgálati koncentrációk mellett hígítóvízes kontrollt és ha szükséges, oldószeres kontrollt is kell futtatni. A megfelelő statisztikai erő biztosítása érdekében a kontrollvizsgálatokban a kamrákat dupla mennyiségű ismétlésben kell vizsgálni (vagyis a kontrollokhoz legalább tizenkét ismétlést kell alkalmazni). A reprodukciós fázis során a kontrollokban alkalmazott ismétlések számát meg kell kétszerezni (vagyis legalább 24 ismétlést kell alkalmazni, és mindegyik ismétlés csak egy tenyészpárt tartalmaz). A reprodukciós fázist követően a kontrollként szolgáló ismétlések legfeljebb 20 embriót (halat) tartalmazhatnak.

ELJÁRÁS

A vizsgálat elindítása

25. A vizsgálat F0 generációjának elindításához használt, szaporodásbiológiailag aktív felnőtt halak kiválasztása két követelmény alapján történik: életkor (jellemzően a megtermékenyítéstől számítva legalább 12, legfeljebb 16 hetes egyedek) és a testtömeg (nőstényeknél minimum 300 mg, hímeknél minimum 250 mg).
26. A fenti követelményeknek megfelelő nőstény-hím párokat páronként áthelyezik egy-egy tartályba, vagyis a vizsgálat kezdetén a tartályokból tizenkét ismétlést készítenek a

kontrollokhoz és hat ismétlést a vegyi anyaggal való kezelésekhez. A tartályokat véletlenszerűen kezelési (pl. T1–T5 és kontroll) és ismétlési (pl. A–L kontroll és A–F kezelési) csoportba sorolják, majd kialakítják az expozíciós rendszert, az egyes tartályokban biztosítva a megfelelő anyag áramlását.

Az expozíció körülményei

27. A vizsgálati paraméterek és körülmények teljes összefoglalása a 3. függelékben található. A vizsgálati paraméterek és körülmények megvalósítása esetén a kontrollként szolgáló halak végpontértékei hasonlóak a 4. függelékben feltüntetett értékekhez.
28. A vizsgálat során minden kezelt és kontrollcsoport legalább egy kísérleti edényében mérni kell az oldott oxigén koncentrációját, a pH-értéket és a hőmérsékletet. A hőmérséklet kivételével ezeket a méréseket a teljes expozíciós időszak során legalább heti egy alkalommal el kell végezni. Az átlagos víz hőmérsékletnek az egész vizsgálat során 24 és 26 °C között kell lennie. Az expozíciós időszak alatt mindvégig naponta mérni kell a hőmérsékletet. A víz pH-értékének a 6,5–8,5 tartományon belül kell lennie, azonban egy adott vizsgálat során a pH-érték csak $\pm 0,5$ egységgel térhet el a kiindulási értéktől. Az egy kezeléshez tartozó ismétlések statisztikailag nem különbözhetnek egymástól, csakúgy mint az egy vizsgálaton belüli kezelési csoportok sem különbözhetnek statisztikailag egymástól (a napi hőmérsékletmérések alapján, a rövid idejű ingadozásokat leszámítva).

Az expozíció időtartama

29. A vizsgálatban az F0 generáció szaporodóképes halait három héten át kezelik. A 4. héten, körülbelül a 24. vizsgálati napon létrehozzák az F1 generációt, az F0 generáció tenyészpárjait pedig kíméletesen leölik, az egyedek testtömegét és hosszát feljegyzik (lásd a 34. pontot). Ezt követően az F1 generációt további 14 hétig (összesen 15 hétig) kezelik, majd az F2 generációt kezelik a kikelésig tartó két héten keresztül. A vizsgálat teljes időtartama alapvetően 19 hét (vagyis az F2 generáció kikeléséig tart). A vizsgálat ütemezését a 2. táblázat, további részletes magyarázatát pedig a 9. függelék tartalmazza.

Etetési rend

30. A halak *ad libitum* etethetők *Artemia* sósórákkal (24 órás naupliusszal), szükség esetén kereskedelmi forgalomban kapható pelyhesített haleledellel kiegészítve. A kereskedelmi forgalomban beszerezhető pelyhesített haleledelben rendszeresen vizsgálni kell a szennyező anyagok – szerves klórt tartalmazó növényvédő szerek, policiklikus aromás szénhidrogének (PAH) és poliklórozott bifenilek (PCB-k) – jelenlétét. Kerülni kell az olyan táplálékokat, amelyek nagy arányban tartalmaznak a vizsgálatban kapott választ esetlegesen befolyásoló, endokrin rendszerre ható anyagokat (pl. fitoösztrogéneket). Az el

nem fogyasztott táplálékot és az ürüléket szükség szerint el kell távolítani a kísérleti edényekből, pl. a tartályok alját szifonnal megtisztítva. A tartályok oldalát és alját hetente egy vagy két alkalommal szintén meg kell tisztítani (pl. spatulával le kell kaparni). Az etetési ütemtervre vonatkozó példa az 5. függelékben található. A haleledel mennyisége az egyes tartályokban tartott halak számán alapul. Ezért a haltáp mennyiségét a tartályban bekövetkezett elhalálozásokkal párhuzamosan csökkenteni kell.

Analitikai meghatározások és mérések

31. Az expozíciós időszak megkezdése előtt gondoskodni kell a vegyi anyagot adagoló rendszer megfelelő működéséről. Az összes szükséges analitikai módszernek megalapozottnak kell lennie, ideértve a vegyi anyag tesztrendszerben való stabilitásával kapcsolatos ismereteket. A vizsgálat során a vizsgálati vegyi anyag koncentrációit megfelelő időközönként – lehetőleg legalább hetente egyszer – meghatározzák az egyes kezelési csoportok egyik ismételésében, az adott kezelési csoporton belül forgórendszerben minden héten másik ismételést vizsgálva.
32. A vizsgálat során a hígítóvíz és a törzsoldat áramlási sebességét időszakosan (legalább hetente három alkalommal) ellenőrizni kell. Az eredményeket célszerű a ténylegesen mért koncentrációértékekre alapozni. Amennyiben azonban az oldatban lévő vizsgálati vegyi anyag koncentrációját sikerült a vizsgálat során mindvégig a mért átlagértékek ± 20 %-os tartományán belül tartani, akkor az eredményeket a névleges vagy a mért értékekre is lehet alapozni. A halakban jelentős mennyiségben felhalmozódó vegyi anyagok esetében a vizsgálati koncentrációk a halak növekedésével párhuzamosan csökkenthetők. Ilyenkor érdemes a kísérleti oldat megújítási arányát minden kamrában úgy meghatározni, hogy a vizsgálati koncentrációk a lehető legállandóbbak legyenek.

Megfigyelések és mért végpontok

33. A mért végpontok közé tartozik a fekunditás, a termékenység, a kikelés, a növekedés és a túlélés, ezek alapján értékelik az esetleges populációsintű hatásokat. Naponta meg kell figyelni a halak viselkedését is, és a szokatlan viselkedési formákat fel kell jegyezni. Más mechanisztikus végpontok közé tartozik a máj *vtg* mRNS vagy VTG fehérje szintjének mérése immunvizsgálattal (28), az ivari fenotípusos markerek, például a hímekre jellemző farok alatti úszó papilláris nyúlványai, az ivarmirigy szerinti nem szövettani értékelése, valamint a vese, a máj és az ivarmirigy kórszövettani értékelése (lásd az 1. táblázatban felsorolt végpontokat). Ezeket a konkrét végpontokat az egyedek genetikai ivara szerint értékelik, amelyet a fogasponty hímvart meghatározó *dmy* génjének jelenléte vagy hiánya alapján állapítanak meg (lásd a 41. pontot). Ezeken túlmenően értékelik az ívásig eltelt időt is. Emellett az egyszerű fenotípusos ivararány meghatározható a farok alatti úszó papilláris

nyúlványainak megszámlálása révén, amelynek alapján az egyes fogaspontyok fenotípusos hímként vagy nőtényként azonosíthatók. Ez a vizsgálati módszer várhatóan nem észleli a várt ivararánytól való kis mértékű eltéréseket, mivel az egyes ismétlésekben vizsgált halak viszonylag csekély száma nem biztosít kellő statisztikai erőt. A kórszövettani vizsgálat során az ivarmirigyet értékelik és sokkal hatékonyabb elemzéseket végeznek az ivari fenotípus genetikusan ivar tükrében való meghatározásához.

34. E vizsgálati módszer elsődleges célja egy adott vizsgálati vegyi anyag esetleges populációsztű hatásainak felmérése. A mechanisztikus végpontok (a VTG, a másodlagos ivari jellegek (SCC) és az ivarmirigyek kórszövettani elemzésével feltárható bizonyos hatások) szintén hozzájárulhatnak annak megállapításához, hogy valamely hatás visszavezethető-e endokrin aktivitásra. Ezeket a mechanisztikus végpontokat azonban befolyásolhatja szisztémás és egyéb jellegű toxicitás is. Következésképpen a máj és a vese részletes kórszövettani értékelésével elősegíthető a mechanisztikus végpontoknál jelentkező válaszok jobb megértése. Ha ilyen részletes értékelésekre nem kerül sor, a kórszövettani vizsgálat során tapasztalt súlyos rendellenességeket akkor is fel kell jegyezni és fel kell tüntetni a jegyzőkönyvben.

A halak humánus elpusztítása

35. Az F0 és F1 generáció kezelésének végeztével, amikor részmintát veszek az ivarézés előtt álló halakból, a halakon a nyálkahártya-irritáció csökkentése érdekében 300 mg/l NaHCO_3 (nátrium-hidrogénkarbonát, CAS-száma: 144-55-8) oldattal pufferolt megfelelő mennyiségű érzéstelenítő oldattal (pl. trikain-metán-szulfonát, MS-222 (CAS-száma: 886-86-2), 100–500 mg/l) eutanáziát kell végrehajtani. Ha a halakon jelentős mértékű szenvedésre utaló jelek figyelhetők meg és elhullásközei állapotban vannak (súlyosan szenvednek és elhullásukat megbízhatóan előre lehet jelezni), az állatokat érzésteleníteni kell és el kell altatni, és adatelemzés szempontjából mortalitásként kell kezelni. A betegség miatt elaltatott halakról feljegyzést kell készíteni, amit fel kell tüntetni a jegyzőkönyvben. Attól függően, hogy a halakat a vizsgálat mely szakaszában altatják el, a halakon kórszövettani elemzést végezhetnek (a halat fixálhatják az esetleges kórszövettani elemzéshez).

Az ikrák és a lárvák kezelése

A tenéspárok ikráinak begyűjtése a következő generáció szaporításához

36. Az ikrákat az F0-ból az F1 generáció létrehozásához a vizsgálat 4. hetének, az F1-ből az F2 generáció létrehozásához pedig a vizsgálat 18. hetének első napján (vagy szükség esetén első két napján) gyűjtik be. A 18. héten az F1 generáció felnőtt halai a

megtermékenyítéstől számítva 15 hetesek. Az ikrák begyűjtésének kezdete előtti napon minden tartályból el kell távolítani az összes ikrát, ezáltal biztosítva, hogy a tenyészpártól begyűjtött valamennyi ikra egyetlen ívból származzon. Az ívást követően a nőtény fogasponty néha a végbélnyílása közelében hordozza az ikrákat, amíg le nem rakja őket szubsztrátumba. Ha nincs szubsztrátum a tartályban, az ikrák vagy a nőtényen, vagy a tartály alján helyezkednek el. Elhelyezkedésüktől függően az ikrákat a nőtényről vagy a tartály aljáról kell szifonnal eltávolítani, az F0 generációnál a vizsgálat 4. hetében, az F1 generációnál pedig a vizsgálat 18. hetében. Az egy kezeléson belül begyűjtött ikrákat egybegyűjtik, majd szétosztják az inkubációs kamrák között.

37. A lerakott ikrákat együtt tartó ikrafonalakat el kell távolítani. Minden tenyészpártól (ismétlésenként 1 pártól) begyűjtik a megtermékenyített ikrákat (legfeljebb 20-at), kezelésként egybegyűjtik őket, majd szisztematikusan szétosztják a megfelelő inkubációs kamrák között (6. és 7. függelék). Jó minőségű preparálómikroszkóppal láthatók a megtermékenyítés/fejlődés korai jelei, úgy mint a külső magzatburok (chorion), a folyamatban lévő sejtosztódás vagy a hólyagcsíra kialakulása. Az inkubátor kamrák elhelyezhetők az egyes kezelésekhöz felállított külön inkubátor akváriumokban (amely esetben a vízminőség paramétereit és a vizsgálati vegyi anyag koncentrációit ezekben kell mérni), illetőleg azokban az akváriumokban, amelyek majd otthont adnak a kikelt lárváknak (pl. a szabad embrióknak). Amennyiben a begyűjtés igénybe vesz egy második napot is (a vizsgálat 23. napját), a két nap alatt begyűjtött valamennyi ikrát egybegyűjtik, majd szisztematikusan szétosztják az egyes kezelt ismétlések között.

Ikrák nevelése a kikelésig

38. A megtermékenyített ikrákat folyamatosan mozgatják, például az ikrakeltető inkubátoron belül előállított légbuborékokkal, vagy az inkubátor függőleges irányú mozgatásával. A megtermékenyített ikrák (embriók) mortalitását naponta ellenőrizni és rögzíteni kell. Az elpusztult ikrákat eltávolítják az inkubátorokból (9. függelék). A megtermékenyítés utáni 7. napon leállítják az ikrák mozgását vagy csökkentik annak intenzitását, hogy a megtermékenyített ikrák le tudjanak üledni az inkubátor aljára. Ez ugyanis elősegíti a többnyire a következő egy vagy két napban bekövetkező kikelésüket. Az egyes ismétlésekben kikelt ivadékokat (fiatal lárvákat; szabad embriókat) kezelésként és kontrollonként egybegyűjtik és megszámlálják. Azokat a megtermékenyített ikrákat, amelyek nem keltek ki a kontroll átlagos kikelési napjának kétszereséig (ami általában a megtermékenyítés utáni 16. vagy 18. nap), életképtelennek tekintik és eltávolítják.
39. Minden tartályba tizenkét ivadékot helyeznek át. A inkubátor kamrákból egybegyűjtik az ivadékokat, és szisztematikusan szétosztják a tartályok között (7. függelék). Ez történhet

úgy, hogy véletlenszerűen kiválasztanak egy ivadékokat az egybegyűjtött kezelt állományból, majd egymás után hozzátesznek egy-egy válogatás nélkül kiválasztott ivadékokat az egyik akváriumba. Mindegyik tartálynak azonos számú ($n=12$) kikelt lárvát kell tartalmaznia (tartályonként legfeljebb 20-at). Amennyiben nincs elég ivadék az összes kezelni szándékozott ismétlés feltöltéséhez, akkor arra kell törekedni, hogy a lehető legtöbb ismétlés tartalmazzon 12 ivadékokat. Az ivadékok biztonságos kezelését vastag üveg pipettával lehet biztosítani. A létszám feletti ivadékokat érzéstelenítővel humánus módon elaltatják. A tenyészpárok kialakítását megelőző néhány hétben fel kell jegyezni az egyes ismétléseknél megfigyelt első ívási esemény napját.

Tenyészpárok kialakítása

Úszók bevágása és a genotípusos ivar megállapítása

40. Az úszók genotípusos ivar meghatározására szolgáló bevágására a megtermékenyítés utáni 9–10. héten (pl. az F1 generáció esetében a vizsgálat 12–13. hetében) kerül sor. A tartályban lévő valamennyi halat – jóváhagyott módszerek, pl. IACUC használatával – elaltatják, majd az egyedek genotípusos ivarának meghatározásához kis méretű szövetmintát vesznek minden hal farokúszójának háti vagy hasi csúcsából (29). Az egy ismétlésből származó halak tárolhatók a tartályban elhelyezett kis ketrecekben, lehetőleg egyenként. Egy ketrecben tárolható két hal is, amennyiben megkülönböztethetők egymástól. Megkülönböztethetőségük biztosítható például úgy, hogy a szövetmintavétel során más-más részét vágják le a farokúszónak (pl. az egyiknél a háti csúcsát, a másiknál a hasi csúcsát).
41. A fogasponty genotípusos ivarát az Y-kromoszómán található azonosított gén (*dmy*) alapján határozzák meg. A *dmy* jelenléte a fenotípustól függetlenül XY egyedet jelez, míg a *dmy* hiánya a fenotípustól függetlenül XX egyedet jelez (30); (31). Minden levágott úszóból kivonják a dezoxiribonukleinsavat (DNS-t), majd polimeráz láncreakciót (PCR) alkalmazó módszerekkel megállapítják a *dmy* jelenlétét vagy hiányát (lásd e melléklet C.41. fejezetének 9. függelékét, vagy a (29) 3. és a 4. függelékét).

Tenyészpárok létrehozása

42. A genotípusos ivarról kapott információk alapján kialakítják az XX-XY tenyészpárokat, a fenotípus külső jeleitől függetlenül, amelyeket módosíthatott a vizsgálati vegyi anyaggal való kezelés. Az egyedek genotípusos ivarának megállapítását követő napon minden replikátumtartályból véletlenszerűen kiválasztanak két XX és két XY halat, és létrehoznak két XX-XY tenyészpárt. Amennyiben valamely ismétlés nem tartalmaz két XX vagy két XY halat, a kezeléshez tartozó többi ismétlésből kell kiválasztani a megfelelő ivarú halakat. Arra kell törekedni, hogy a tenyészpárok ajánlott száma (12) minden kezelt és

kontrollként szolgáló tartályban biztosítva legyen (24). A nyilvánvaló rendellenességeket (pl. úszóhólyag problémákat, gerinc deformitást, szélsőséges méretbeli eltérést stb.) mutató halakból nem alakítanak ki tenyészpárokat. Az F1 generáció reprodukciós fázisában minden tartályban csak egyetlen tenyészpárt szabad elhelyezni.

Mintavétel ivarérés előtt álló halakból és a végpontok értékelése

Mintavétel nem tenyészpár halakból

43. A tenyészpárok kialakítását követően a további tenyésztés célja ki nem választott halakat a vizsgálat 12–13. hetében (F1) kíméletesen leölik, hogy megmérjük az ivarérés előtt álló halak végpontjait. Rendkívül fontos, hogy a halakat olyan módon kezeljék, hogy a tenyészpárok kiválasztásához meghatározott genotípusos ivart vissza lehessen vezetni az egyedekre. Az összegyűjtött adatokat ugyanis az adott egyed genotípusos ivarának fényében elemzik. Az egyes halakon számos végpont mérését végzik el, azon belül: meghatározzák a növendék/ivarérés előtt álló halak túlélési arányát (a vizsgálat 7–12./13. hetében, F1), a hossznövekedést (standard hossz mérhető, ha a genetikai ivar elemzéséhez történő mintavétel során lerövidítették a farokúszót. Teljes hossz mérhető, ha a *dmy* meghatározásához a farokúszónak csak a háti vagy hasi részéből vettek mintát), a testtömeget (nedves tömeg, szárazra itatva), a máj *vtg* mRNS (vagy VTG) szintjét és a farok alatti úszó papilláris nyúlványainak számát (lásd az 1. és a 2. táblázatot). A kezelt csoportok átlagos növekedésének kiszámításához szükség van a tenyészpárok testtömegére és testhosszára is.

Szövetmintavétel és a vitellogenin mérése

44. A májat preparálják, majd a *vtg* mRNS (vagy VTG) méréséig –70 °C-on vagy alacsonyabb hőmérsékleten tárolják. A halak farkát a farok alatti úszóval együtt megfelelő (például Davidson-féle) fixálószerben tartósítják, illetve lefénnyképezik, hogy később megszámlálhatók legyenek a farok alatti úszó papilláris nyúlványai. Ekkor szükség szerint más szövetmintákat is levehetnek és tartósíthatnak (pl. az ivarmirigyből). A máj VTG-koncentrációját homológ ELISA eljárással kell mérni (a fogasponty esetében ajánlott eljárásokat lásd a jelen melléklet C.48. fejezetének 6. függelékében). A *vtg* mRNS szintjének mérésére szolgáló módszereket – amelyek során a *vtg I* gén mRNS-ét kivonják a májmintából és kvantitatív polimeráz láncreakcióval meghatározzák a (teljes mRNS 1 ng-jában lévő) *vtg I* génekópiák számát – az U.S. EPA dolgozta ki (29). A kezelt és a kontrollcsoportok *vtg* génekópiáinak számszerű meghatározása helyett egy kevesebb erőforrást igénylő és technikailag egyszerűbben kivitelezhető módszer a kezelt és kontrollcsoportokban létrejövő *vtg I* expresszió relatív (valahányszoros) változásának meghatározása.

Másodlagos ivari jellegek

45. Rendes körülmények között csak ivarérett felnőtt hím fogaspontyok rendelkeznek papilláris nyúlványokkal, amelyek bizonyos farok alatti úszósugarak összekapcsolódott lemezein fejlődnek ki másodlagos ivari jellegként, potenciális biomarkert szolgáltatva az endokrin rendszert zavaró hatások felméréséhez. A farok alatti úszó papilláris nyúlványainak (papilláris nyúlványokkal rendelkező összekapcsolódott lemezek számának) meghatározási módszerét a 8. függelék tartalmazza. Emellett a farok alatti úszó papilláris nyúlványainak számát használják fel az adott egyed külsőleg fenotípusos hímként vagy nőtényként való besorolására, amelynek alapján meghatározzák az egyes ismétlések egyszerű ivararányát. A nullánál több papilláris nyúlvánnyal rendelkező fogaspontyok hímnak minősülnek; a papilláris nyúlvány nélküli fogaspontyok nőténynek minősülnek.

A fekunditás és a termékenység értékelése

46. A fekunditást és a termékenységet az F0 generáció tekintetében a vizsgálat 1–3. hetében, az F1 generáció tekintetében pedig a vizsgálat 15–17. hetében értékelik. Minden tenyészpár ikráit 21 egymást követő napon keresztül naponta begyűjtik. Az ikrákat reggelente óvatosan eltávolítják a hálóba fogott nőtényekről és/vagy szifonnal az akvárium aljáról. Az egyes ismétlésekben vizsgált tenyészpárokat illetően naponta feljegyzik a fekunditást és a termékenységet. A fekunditást a lerakott ikrák száma alapján, a termékenységet pedig a számlálás idején megtermékenyítettnek és életképesnek minősített ikrák száma alapján határozzák meg. A számlálást az ikrák begyűjtése után a lehető leghamarabb el kell végezni.
47. Az ismétléseknél mért fekunditást, vagyis a tenyészpáronkénti ikrák számát naponta feljegyzik, és az ismétlések átlaga alapján az ajánlott statisztikai eljárások szerint elemzik. Egy adott ismétlés termékenységét úgy határozzák meg, hogy a tenyészpár által termelt megtermékenyített ikrák összesített számát elosztják a tenyészpár által termelt ikrák összesített számával. Statisztikailag a termékenységet ismétlésenkénti arányszámként elemzik. Egy adott ismétlés kikelési arányának meghatározásához elosztják az ivadékok számát a betelepített embriók számával (ami általában 20). Statisztikailag a kikelési arányt ismétlésenkénti arányszámként elemzik.

Mintavétel felnőtt halakból és a végpontok értékelése

Mintavétel tenyészpár halakból

48. A vizsgálat 17. hetét követően (vagyis miután az F2 generációt sikerrel elindították), az F1 generáció felnőtt halait kíméletesen leölik, és értékelik a különböző végpontokat (lásd az 1.

és a 2. táblázatot). A farok alatti úszóról felvételt készítenek a farok alatti úszó papilláris nyúlványainak értékeléséhez (lásd a 8. függelék) és/vagy a farkat a végbélnyílás poszterior végétől eltávolítják és fixálják a papilláris nyúlványok későbbi megszámlálásához. Ekkor igény szerint a farokúszó egy részéből mintát vehetnek és eltárolhatják a genetikai ivar (*dmy*) ellenőrzéséhez. Szükség szerint szövetmintát lehet venni a *dmy* elemzésnek megismétléséhez, amelynek révén ellenőrizhető egy adott hal genetikai ivara. A testüreget felnyitják, hogy lehetővé tegyék a megfelelő (pl. Davidson-féle) fixálószer átáramlását, mielőtt az egész testet belemerítenék a fixálószerbe. Ha azonban a fixálás előtt gondoskodnak a megfelelő permeabilitásról, a testüreget nem szükséges felnyitni.

Kórszövettan

49. Minden halon szövettani vizsgálatot végeznek az ivarmirigyszövet kóros elváltozásainak megállapításához (30); (29). A 33. pontban említettek szerint a vizsgálat során értékelt más mechanisztikai végpontokat (pl. a VTG, a másodlagos ivari jellegek (SCC) és az ivarmirigyek kórszövettani elemzésével feltárható bizonyos hatások) befolyásolhatja szisztémás vagy más jellegű toxicitás. Következésképpen a máj és a vese részletes kórszövettani értékelésével elősegíthető a mechanisztikus végpontoknál jelentkező válaszok jobb megértése. Ha ilyen részletes értékelésekre nem kerül sor, a kórszövettani vizsgálat során tapasztalt súlyos rendellenességeket akkor is fel kell jegyezni és fel kell tüntetni a jegyzőkönyvben. Fontolóra vehető a (kontrollhoz képest) legmagasabb koncentrációval kezelt csoporttól a hatás nélküli koncentrációval kezelt csoportig lefelé lépegető vizsgálat, bár ajánlatos tanulmányozni a kórszövettani iránymutatást (29). Általában feldolgoznak minden mintát, illetve metszetet készítenek belőlük, amelyeket a kórboncnok elemez. Megjegyzendő, hogy lefelé haladó megközelítés alkalmazásánál a Rao–Scott Cochrane–Armitage by Slices (RSCABS) eljárás azon a feltevésen alapul, hogy a dózisszintek növelésével párhuzamosan növekszik a biológiai (patológiai) hatás. Ezért a statisztikai erő csökkenésével kell számolni, ha egyetlen magas dózist vizsgálnak közbeeső dózisok nélkül. Amennyiben nincs szükség statisztikai elemzéshez annak megállapítására, hogy a magas dózis nem fejt ki hatást, akkor ez a megközelítés elfogadható lehet. Az értékelés során megállapítják az ivari fenotípust.

Egyéb észrevételek

50. A fogaspontyon végzett kibővített egygenerációs vizsgálatból származó adatok felhasználhatók (pl. bizonyíték súlyán alapuló megközelítés keretében) arra, hogy egyidejűleg értékeljenek legalább két, reprodukciós károsodást okozó általános káros kimeneti út típust: a) a hipotalamusz-hipofízis-gonád (HPG) endokrin tengely károsodását előidéző, endokrin rendszer által közvetített utakat; és b) nem az endokrin rendszer által

közvetített toxicitás révén a túlélés, a növekedés (testhossz és testtömeg), valamint a szaporodás visszaesését okozó utakat. Ez a vizsgálat magában foglalja a jellemzően a krónikus toxicitási vizsgálatokban, például a teljes életciklussal és a korai életszakasszal kapcsolatos vizsgálatokban mért végpontokat, amelyek felhasználhatók mind a nem endokrin rendszer által közvetített toxikus hatásmechanizmusok, mind az endokrin rendszer által közvetített toxicitási utak jelentette veszélyek értékelésére. A vizsgálat során naponta meg kell figyelni a halak viselkedését, és a szokatlan viselkedési formákat fel kell jegyezni. Emellett fel kell jegyezni az elhalálozásokat, valamint ki kell számolni a halaknak a vizsgálat 6./7. hetében bekövetkező selejtezéséig megfigyelt túlélési arányát, a selejtezéstől az ivarérés előtt álló halakból történő mintavételig (a megtermékenyítés utáni 9–10. hét) megfigyelt túlélési arányát és a párok kialakításától a felnőtt halakból történő mintavételig megfigyelt túlélési arányát.

1. táblázat: A MEOGRT* végpontjainak áttekintése

Életszakasz	Végpont	Generáció
Embrió (megtermékenyítés utáni 2. hét)	Kikelés (% és a kikelésig eltelt idő)	F1, F2
Növendék (megtermékenyítés utáni 4. hét)	Túlélés	F1
Ivarérés előtt álló (megtermékenyítés utáni 9–10. hét)	Túlélés	F1
	Növekedés (testhossz és testtömeg)	
	Vitellogenin (mRNS vagy fehérje)	
	Másodlagos ivari jellegek (farok alatti úszó papilláris nyúlványai)	
	Külsőleg látható ivar aránya	
	1. ívásig eltelt idő	
Felnőtt (megtermékenyítés utáni 12–14. hét)	Szaporodás (fekunditás és termékenység)	F0, F1
Felnőtt (megtermékenyítés utáni 12–14. hét)	Túlélés	F1
	Növekedés	

utáni 15. hét)	(testhossz és testtömeg)	
	Másodlagos ivari jellegek (farok alatti úszó papilláris nyúlványai)	
	Kórszövetten (ivarmirigy, máj, vese)	

*Ezeket a végpontokat statisztikailag elemezni kell.

ÜTEMEZÉS

51. A fogaspontyon végzett kibővített egygenerációs vizsgálat (MEOGRT) 2. táblázatban illusztrált ütemterve bemutatja a vizsgálatot. A MEOGRT magában foglalja az F0 generáció felnőtt halainak 4 hetes kezelését, az F1 generáció 15 hetes kezelését és a második (F2) generáció expozíciós időszakát a kikelésig (megtermékenyítés utáni 2. hét). A MEOGRT során végzett tevékenységeket a 9. függelék foglalja össze.

2. táblázat: A MEOGRT során alkalmazott expozíció és végpontmérések ütemezése.

MEOGRT expozíciójának és végpontméréseinek ütemezése																				
F0	1	2	3	4																
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
F2																	1	2		
Vizsgálati hét	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
Életszakasz				Embrió					Lárva				Növendék				Ivarérés előtt álló		Felnőtt	
Végpontok																				
Fekunditás	F ₀													F ₁					• A kísérleti terv 7, ismétlésekből álló csoportot tartalmaz ○ 5 a vizsgálati vegyi anyaggal való kezelésekhöz ○ 2 a kontroll kezelésekhöz (oldószer alkalmazása esetén 4) • Csoporton belüli kialakítás ○ 12 ismétlés a szaporodás, a felnőtt patológia és az SCC méréséhez (10–18. h) ○ 6 ismétlés a kikelés, a túlélés, a Vtg, az ivarérés előtt álló egyedek SCC-jének és a növekedés méréséhez (1–9. h) SSC: másodlagos ivari jelek; H: hét; Vtg: vitellogenin	
Termékenység	F ₀													F ₁						
Kikelés					F ₁													F ₂		
Túlélés						F ₁						F ₁						F ₁		
Növekedés					F ₀							F ₁						F ₁		
Vitellogenin													F ₁							
Másodlagos ivar													F ₁					F ₁		
Kórszövetten																		F ₁		
Vizsgálati hét	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	

ADATSZOLGÁLTATÁS

Statisztikai elemzés

52. Mivel minden kísérleti hal esetében meghatározzák a genotípusos ivart, az adatokat a genotípusos ivar (vagyis XY hímek és XX nőstények) szerint külön kell elemezni. Ellenkező esetben az elemzések statisztikai ereje jelentősen csökken. Az adatok statisztikai elemzéséhez lehetőség szerint az „Aktuális megközelítések az ökotoxicitási adatok statisztikai elemzésében: alkalmazási útmutató” (32) című OECD-dokumentumban leírt eljárásokat kell követni. A statisztikai elemzéshez a 10. függelék nyújt további útmutatást.

53. A vizsgálati tervet úgy kell kialakítani és olyan statisztikai vizsgálatokat kell választani, hogy a biológiai szempontból fontos változásokat az olyan végpontokon, ahol megfigyelhető hatást nem okozó koncentrációt kell jelenteni, megfelelő statisztikai erővel lehessen észlelni (32). A releváns hatásos koncentrációk és paraméterek jegyzőkönyvezése a szabályozási kerettől függhet. Meg kell határozni a százalékos változást minden egyes

végponton, amelyet fontos kimutatni vagy megbecsülni. A vizsgálatot úgy kell kialakítani, hogy ez megoldható legyen. Nem valószínű, hogy a százalékos változás minden végponton megegyezik, és az sem valószínű, hogy olyan megvalósítható kísérletet lehet tervezni, amely minden végpont tekintetében megfelel a fenti feltételeknek, tehát a kísérlet megfelelő kialakítása során azokra a végpontokra kell összpontosítani, amelyek az adott kísérlet szempontjából lényegesek. A 10. függelék statisztikai folyamatábrát és útmutatást tartalmaz, amelyek segítséget nyújtanak az adatok kezeléséhez, valamint a legmegfelelőbb statisztikai vizsgálat vagy modell kiválasztásához. Alkalmazhatók más statisztikai megközelítések is, amennyiben azok használata tudományos szempontból indokolt.

54. Szükséges a párhuzamos eredmények közti eltérések varianciaanalízissel vagy kontingenciatáblázatos módszerrel való elemzése, és az elemzés alapján a megfelelő statisztikai elemző módszerek alkalmazása. Az egyedi koncentrációszinteknél és a kontrollcsoport koncentrációszintjeinél kapott eredmények közötti összetett összehasonlítás érdekében folytonos válaszok esetén ajánlatos lefelé lépegető eljárást (pl. Jonckheere–Terpstra-féle próbát) alkalmazni. Amennyiben az adatok nem jellemezhetők monoton koncentráció-vállasszal, Dunnett-féle vagy Dunn-féle próba alkalmazandó (szükség esetén az adatok megfelelő transzformálása után).
55. A fekunditás értékeléséhez az ikrákat naponta megszámlálják, az adatok azonban elemezhetők teljes ikraszámként vagy ismételt mérésenként. A 10. függelék részletesen ismerteti a végpont elemzési módját. A súlyosság szerint pontszámozott kórszövettani adatok értékeléséhez kifejlesztettek egy új statisztikai próbát, a Rao–Scott Cochran–Armitage by Slices (RSCABS) trendpróbát (33).
56. A vegyi anyaggal történő kezelés során megfigyelt, a megfelelő kontrolloktól jelentős mértékben eltérő végpontokat bele kell foglalni a jelentésbe.

Adatelemzési szempontok

Érvénytelen kezelési szintek használata

57. Számos tényezőt kell figyelembe venni annak eldöntésekor, hogy az ismétlés vagy a teljes kezelés nyilvánvaló toxicitást mutat-e, melynek következtében ki kell zárni az elemzésből. A nyilvánvaló toxicitás meghatározása: a megtermékenyítés utáni 3. és 9. hét között bármelyik ismétlésben tapasztalt 4-nél több elhullás, amely technikai hibával nem magyarázható. A nyilvánvaló toxicitás egyéb tünetei közé tartoznak a vérzés, a rendellenes viselkedés, a rendellenes úszásminták, az anorexia és bármely egyéb betegségre utaló klinikai tünet. A toxicitás szubletális jelei tekintetében kvalitatív értékelésre lehet szükség, amelyet mindig a (csak tiszta vizet tartalmazó) hígítóvízes kontrollcsoportéhoz viszonyítva

kell elvégezni. Amennyiben a legmagasabb koncentrációval végzett kezelés(ek)ben nyilvánvaló toxicitás figyelhető meg, ajánlatos ezeket a kezeléseket kizárni az elemzésből.

Oldószeres kontrolllok

58. Oldószer használatát csak a legvégső esetben szabad megfontolni, ha már minden egyéb kémiai bejuttatási lehetőséget számításba vettünk. Oldószer használata esetén párhuzamosan egy hígítóvízes kontrollt is kell futtatni. A vizsgálat befejezésekor értékelni kell az oldószer lehetséges hatásait. Ezt az oldószeres kontrollcsoport és a hígítóvízes kontrollcsoport statisztikai összehasonlítása útján végzik el. A legfontosabb vizsgálandó végpontok az elemzés során a növekedés meghatározói (tömeg), mivel az általános toxicitás ezeket tudja befolyásolni. Ha statisztikailag szignifikáns különbségeket mutatnak ki a hígítóvízes és az oldószeres kontrollcsoportok között e végpontok tekintetében, a legjobb szakmai megítélés alapján kell döntenie arról, hogy érvénytelennek tekinthető-e a vizsgálat. Amennyiben a két kontroll között eltérések tapasztalhatók, a vegyi anyaggal végzett kezeléseket az oldószeres kontrollal kell összevetni, kivéve ha ismert, hogy a hígítóvízzel való összehasonlítást részesítik előnyben. Amennyiben a két kontrollcsoport között nincs statisztikailag szignifikáns különbség, ajánlatos a vizsgálati vegyi anyaggal végzett kezeléseket az összevont oldószeres és hígítóvízes kontrollcsoportokkal összevetni, kivéve ha ismert, hogy csak a hígítóvízes vagy csak az oldószeres kontrollcsoporttal való összehasonlítást részesítik előnyben.

Vizsgálati jegyzőkönyv

59. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag: fizikai jelleg és adott esetben a fizikai-kémiai tulajdonságok;

- kémiai azonosító adatok.

Egy összetevőből álló anyag:

- fizikai megjelenés, vízzoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;
- kémiai azonosító adatok, például IUPAC- vagy CAS-név, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet, tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. (ideértve adott esetben a szervesszén-tartalmat).

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

- amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítójával (lásd fent), mennyiségi előfordulásával és releváns fizikai-kémiai tulajdonságaival jellemezve.

Vizsgálati fajok:

- tudományos név, törzs (ha meghatározható), forrás és a megtermékenyített peték begyűjtésének módja, valamint a későbbi kezelés.

Vizsgálati körülmények:

- megvilágítási időszak(ok);
- vizsgálati terv (pl. a kamra mérete, az anyagok és a víz mennyisége, a vizsgálati kamrák és az ismétlések száma, az ivadékok létszáma az ismétlésekben);
- a törzsoldat elkészítésének módszere és a vízcseré gyakorisága (az esetleg használt diszpergálószer nevét és koncentrációját meg kell adni);
- a vizsgálati vegyi anyag adagolásának módszere (például szivattyú, hígítási rendszerek);
- a módszer visszanyerési hatékonysága és a névleges vizsgálati koncentrációk, a meghatározási határ, a mért értékek átlaga és szórása a vizsgálati edényekben, az ilyen adatok megszerzésének módszerei és bizonyítékok annak alátámasztására, hogy a mérések a valódi oldatban lévő vizsgálati vegyi anyag koncentrációsintjeire vonatkoznak;
- a hígítóvíz jellemzői: pH-érték, keménység, hőmérséklet, oldottoxigén-koncentráció, maradéklór-tartalom (amennyiben mérik), teljes szervesszén-tartalom (amennyiben mérik), szuszpendált szilárd anyagok (amennyiben mérik), a vizsgálati közeg sótartalma (amennyiben mérik) és bármely más mérési adat;
- a névleges vizsgálati koncentrációk, a mért értékek átlaga és ezek standard deviációja;
- vízminőség a tesztedényekben: pH-érték, (napi) hőmérséklet és oldottoxigén-koncentráció;
- részletes információk a táplálékról (pl. a haltápok típusa, eredete, az adagolt mennyiség és az adagolás gyakorisága).

Eredmények:

- bizonyíték arra, hogy a kontrollok teljesítették az általános érvényességi kritériumokat;
- a kontroll (és alkalmazása esetén az oldószeres kontroll) és a kezelt csoportok következő adatai: az F1 és az F2 generáció kikelése (kikelési arány és a kikelésig eltelt idő), az F1 kikelést követő túlélési aránya, az F1 növekedése (hossz és testtömeg), az F1 genotípusos ivara és ivari differenciálódása (pl. a farok alatti úszó papilláris nyúlványai és az ivarmirigy szövettana alapján meghatározott másodlagos ivari jellegek), az F1 fenotípusos ivara, az F1 másodlagos ivari jellegei (farok alatti úszó papilláris nyúlványai), az F1 *vtg* mRNS (vagy VTG fehérje) szintje, az F1 kórszövettani értékelése (ivarmirigy, máj és

vese), valamint az F0 és F1 szaporodási képessége (fekunditás és termékenység); (lásd az 1. és a 2. táblázatot).

- a statisztikai elemzés során alkalmazott megközelítés (regressziós analízis vagy varianciaanalízis) és az adatok feldolgozása (az alkalmazott statisztikai vizsgálatok és modellek);
- megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC) minden egyes kiértékelt válaszreakcióra nézve;
- megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció (LOEC) minden egyes kiértékelt válaszreakcióra nézve ($p=0,05$ értéknél); EC_x adott esetben minden egyes kiértékelt válaszreakcióra nézve, konfidencia-intervallumok (például 90 vagy 95 %) és a számításhoz használt illesztett modell grafikonja, a koncentráció-válasz görbe meredeksége, a regressziós modell egyenlete, a modell becsült paraméterei és a becslés standard hibái;
- az e vizsgálati módszertől való eltérések, az elfogadhatósági kritériumoktól való eltérések, és a vizsgálat kimenetelére gyakorolt lehetséges hatásukkal kapcsolatos megfontolások.

60. A végpontmérések eredményeit illetően fel kell tüntetni az átlagértékeket és az azoktól való standard deviációt (lehetőség szerint az ismétlések és a koncentrációk alapján).

SZAKIRODALOM

- (1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (1) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K and Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. *Current Protocols in Toxicology* 39: 1-36.
- (2) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disruptors. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (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. Elérhető a következő címen: <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.), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (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) E melléklet C.15., Rövid távú toxicitási vizsgálat halembriókkal és hallárvákkal című fejezete.
- (21) E melléklet C.37., 21 napos halvizsgálat: Az ösztrogén- és androgénhatás, valamint az aromatázgátlás rövid távú szűrővizsgálata című fejezete.
- (22) E melléklet C.41., Halak ivari fejlődésének vizsgálata című fejezete.
- (23) E melléklet C.48., Halak rövid távú reprodukciós vizsgálata című fejezete.
- (24) E melléklet C.47., A halak korai életszakaszára vonatkozó toxicitási vizsgálat című fejezete.
- (25) E melléklet C.49., Halembriók akut toxicitási vizsgálata (FET) című fejezete.
- (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). Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (29) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Scharlt M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. *Genetics* 163: 245-251.
- (30) Shinomiya, A, Otake H, Togashi K, Hamaguchi S and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, *Zoological Science* 21: 613-619.
- (31) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

- (32) Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1108-1116.

1. FÜGGELÉK

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

ELISA: enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay).

Fekunditás = ikrák száma;

Termékenység = életképes ikrák száma/fekunditás;

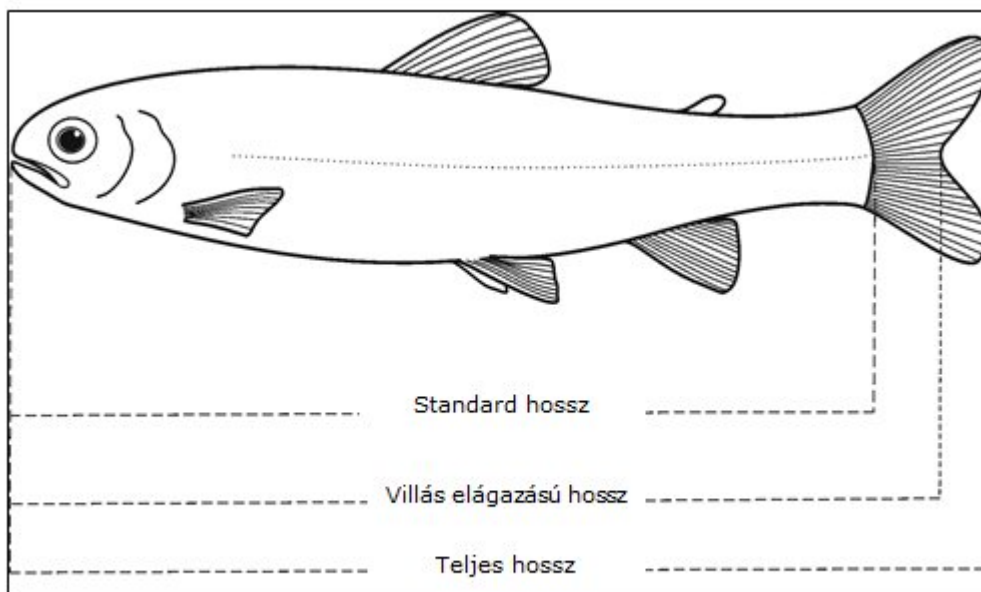
Villás elágazású hossz: a farok tövéig mért hossz az orrcsúcs és a farokúszó középső sugarának végpontja közötti távolság, és olyan halak esetében alkalmazandó, amelyeknél nehéz meghatározni, hogy a gerincoszlop hol ér véget (www.fishbase.org)

Kikelési arány = ivadékok/az inkubátorba helyezett embriók száma

IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee (Állatgondozással és -felhasználással foglalkozó intézményi bizottság).

Standard hossz: az orrcsúctól az utolsó csigolya poszterior végéig vagy a hipurális lemez mediolaterális részének poszterior végéig mért távolság. Leegyszerűsítve ez a mérés nem tartalmazza a farokúszó hosszát (www.fishbase.org).

Teljes hossz: az orrcsúcs és a farokúszó hosszabbik lebenyének csúcsa közötti távolság, amelyet általában a lebenyek középvonal mentén való összenyomásával mérnek. Ez egy egyenes vonalú mérés, nem követi a test görbületét (www.fishbase.org).



1. ábra: a használt különböző hosszúságok leírása.

ECx: (hatásos koncentráció x % hatás eléréséhez) az a koncentráció, amely valamely hatás x %-át okozza a vizsgálati szervezetekben egy adott expozíciós időn belül, a kontrollal összehasonlítva. Például az EC50 az a becsült koncentráció, amely a vizsgálat valamilyen végpontja tekintetében a kitett populáció 50 %-ában okoz hatást a meghatározott expozíciós idő alatt.

Átfolyásos vizsgálat: az expozíció során a vizsgálati oldat vizsgálati rendszeren történő folyamatos áramlása mellett folytatott vizsgálat.

HPG-tengely: hipotalamusz-hipofízis-gonád tengely.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (Elméleti és Alkalmazott Kémia Nemzetközi Uniója).

Betelepítési arány: a halak nedvesen mért tömege egységnyi mennyiségű vízben.

Megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció (LOEC): a vizsgálati vegyi anyag azon legalacsonyabb vizsgálati koncentrációja, amelynél a kontrollal összevetve még megfigyelhető a vegyi anyag statisztikailag szignifikáns hatása ($p < 0,05$). Azonban az LOEC-szint feletti valamennyi vizsgálati koncentrációnak olyan ártalmas hatást kell kifejtenie, amely legalább egyenlő az LOEC-szinten megfigyelttel vagy súlyosabb annál. Amennyiben e két feltétel nem teljesíthető, akkor kimerítő magyarázatot kell adni arra, hogy

hogyan történt az LOEC (és ennél fogva az NOEC) kiválasztása. Az 5. és 6. függelék útmutatást ad.

Medián letális koncentráció (LC50): a vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely a becslések szerint a vizsgálat időtartama alatt a vizsgálati szervezetek 50 %-ára nézve halálos.

Megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC): a közvetlenül az LOEC alatti vizsgálati koncentráció, amely – a kontrollcsoporttal való összevetésben – nem fejt ki statisztikailag szignifikáns hatást ($p < 0,05$) a meghatározott expozíciós időszak alatt.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification (molekulák egyszerűsített egy sorban történő beviteli rendszere).

Betelepítési sűrűség: a halak száma egységnyi mennyiségű vízben.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

UVCB: ismeretlen szerkezetű vagy változó összetételű, összetett reakcióban keletkezett vagy biológiai eredetű anyagok.

VTG: a vitellogenin a szikben található foszfo-, lipo- és glikoproteinek prekursora, amely alapesetben az ikrarakó fajok szexuálisan aktív nőstényeiben fordul elő.

WPF: a megtermékenyítéstől számított hetek száma.

2. FÜGGELÉK**AZ ELFOGADHATÓ MINŐSÉGŰ HÍGÍTÓVÍZ NÉHÁNY FONTOSABB KÉMIAI TULAJDONSÁGA**

Anyag	Határkoncentráció
Szálló por	5 mg/l
Teljes szervesszén-tartalom	2 mg/l
Nem ionizált ammónia	1 µg/l
Maradék klór	10 µg/l
Szerves foszfort tartalmazó növényvédő szerek összesen	50 ng/l
Szerves klórtartalmú peszticidek + poliklórozott bifenilek	50 ng/l
Összes szerves klór	25 ng/l
Alumínium	1 µg/l
Arzén	1 µg/l
Króm	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Réz	1 µg/l
Vas	1 µg/l
Ólom	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Cink	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Higany	100 ng/l
Ezüst	100 ng/l

3. FÜGGELÉK

A MEOGRT VIZSGÁLATI KÖRÜLMÉNYEI

1. Ajánlott fajok	Japán fogasponty (<i>Oryzias latipes</i>).
2. A vizsgálat típusa	Folyamatos vízcserét biztosító átfolyósos rendszer.
3. Vízhőmérséklet	A nominális vizsgálati hőmérséklet 25 °C. A vizsgálat teljes időtartama alatt az egyes tartályok átlaghőmérséklete 24–26 °C.
4. A megvilágítás minősége	Fluoreszcens izzók (széles spektrum és ~150 lumen/m ²) (~150 lux). 16 óra fény, 8 óra sötét.
6. Betelepítési arány	F0: 2 felnőtt/ismétlés; F1: kezdetben legfeljebb 20 ikra (embrió)/ismétlés, a kikelésnél lecsökkentve 12 embrió/ismétlésre, majd a megtermékenyítés utáni 9–10. héten 2 felnőttre (XX-XY tenyészpárra) a szaporodási fázishoz.
7. A vizsgálati kamra minimális hasznos térfogata	1,8 l (a vizsgálati kamra mérete például: 18x9x15 cm).
8. A vizsgálati oldatok térfogatának cseréje	Legalább napi 5 térfogatcsere és legfeljebb napi 16 térfogatcsere (vagy 20 ml/perc áramlás).
9. A vizsgált élőlények kora a vizsgálat kezdetén	F0: A megtermékenyítéstől számítva legalább 12, legfeljebb 16 hét.
10. Élőlények ismétlésenkénti száma	F0: 2 hal (egy hímből és egy nőtényből álló pár); F1: ismétlésenként legfeljebb 20 (F0 és F1 tenyészpároktól származó) hal (ikra).
11. Kezelések száma	5 vizsgálati vegyi anyaggal végzett kezelés plusz a megfelelő kontroll(ok).
12. Kezelésenkénti ismétlések száma	A vizsgálati vegyi anyag esetében legalább 6 ismétlés kezelésenként, a kontroll – és ha alkalmazzák, az oldószeres kontroll – esetében legalább 12 ismétlés (az F1 generáció reprodukciós fázisában az ismétlések számát megduplázzák).
13. Élőlények száma vizsgálatonként	Az F0 generációban legalább 84 hal, az F1 generációban 504 hal. (Oldószeres kontroll végzése esetén 108 hal az F0 generációban és 648 hal az F1 generációban). A számlálás egysége a szabad embrió utáni életszakaszban lévő egyedek.

14. Etetési rend
A halak *ad libitum* etethetők *Artemia* sórákkal (24 órás naupliusszal), szükség esetén kereskedelmi forgalomban kapható pelyhesített haleledellel kiegészítve (a megbízható szaporodást lehetővé tévő, megfelelő növekedést és fejlődést biztosító etetési rend egy példáját a 6. függelék ismerteti).
15. Levegőztetés
Nincs, kivéve ha az oldott oxigén koncentrációja megközelíti a < 60 %-os levegőteltettségi értéket.
16. Hígítóvíz
Tiszta felszíni víz, kútvíz, mesterséges víz vagy klórmentesített csapvíz.
17. Expozíciós időtartam
Alapvetően 19 hét (az F0 generációtól az F2 generáció kikeléséig).
18. Biológiai végpontok (elsődleges)
Kikelési arány (F1 és F2 generáció); túlélés (F1, kikeléstől a megtermékenyítés utáni 4. hétig (lárvakor vége/növendékkor eleje), a megtermékenyítés utáni 4. és 9. (vagy 10.) hét között (növendékkor elejétől az ivarérés előtti korig) és a megtermékenyítés utáni 9. és 15. hét között (ivarérés előtti kortól a felnőttek elpusztításáig)); növekedés (F1, hossz és tömeg a megtermékenyítés utáni 9. és 15. héten); másodlagos ivari jellegek (F1, farok alatti úszó papilláris nyúlványai a megtermékenyítés utáni 9. és 15. héten); vitellogenin (F1, *vtg* mRNS vagy VTG fehérje a megtermékenyítés utáni 15. héten); fenotípusos ivar (F1, ivarmirigy szövettani vizsgálatával a megtermékenyítés utáni 15. héten); szaporodás (F0 és F1, fekunditás és termékenység mérése 21 napig); az ivásig eltelt idő (F1); és kórszövetten (F1, ivarmirigy, máj és vese a megtermékenyítés utáni 15. héten).
19. A vizsgálat érvényességi kritériumai
Az oldott oxigén a levegőteltettségi érték legalább 60 %-a; a vizsgálat teljes időtartama alatt az átlagos víz hőmérséklet 24–26 °C; a kontroll(ok)ban a nőstények legalább 65 %-a sikeresen szaporodik; a kontroll(ok)ban az átlagos napi fekunditás legalább 20 ikra; a kontrollokban a kikelési arány (átlagosan) eléri a 80 %-ot (mind az F1, mind az F2 generációban); a kontrollokban (F1) a kikeléstől a megtermékenyítés utáni 3. hétig a túlélés átlagosan legalább 80 % és a megtermékenyítés utáni 3. héttől a generáció egyedeinek elpusztításáig átlagosan legalább 90 %, a vizsgálati vegyi anyag oldatban lévő koncentrációit az átlagos mért értékek ± 20 %-os tartományán belül sikerült tartani.

4. függelék

IRÁNYMUTATÁS A TIPIKUS KONTROLLÉRTÉKEKHEZ

Ezeket a kontrollértékeket korlátozott számú validálási tanulmány alapján határozták meg, ezért a további tapasztalatok fényében módosításra kerülhetnek.

Növekedés

A megtermékenyítés utáni 9. (vagy 10.) és 15. héten a mintavételhez használt minden halnak megméri a testtömegét és a hosszát. E protokoll betartása esetén a megtermékenyítés utáni 9. héten a hímek várt nedves tömege 85–145 mg, míg a nőstényeké 95–150 mg. A megtermékenyítés utáni 15. héten a hímek várt tömege 250–330 mg, a nőstényeké 280–350 mg. Bár az egyes halak testtömege jelentősen eltérhet a megadott tartománytól, ha a kontrollcsoport átlagos testtömege nagy mértékben kívül esik ezeken a tartományokon, különösen ha alacsonyabb, az a táplálással, hőmérséklet-szabályozással vagy vízminőséggel kapcsolatos problémára, betegségre, vagy e tényezők bármely kombinációjára utal.

Kikelés

A kontrollcsoportokban a kikelési sikeresség általában 90 % körül alakul, ugyanakkor esetenként lecsökkenhet akár 80 %-ig is. A 75 %-nál alacsonyabb kikelési sikeresség azt jelezheti, hogy nem mozgatják megfelelő mértékben a fejlődő ikrákat, vagy nem kezelik őket kellő odafigyeléssel, például nem távolítják el időben az elpusztult ikrákat, ami gombás fertőzéshez vezet.

Túlélés

A kontrollcsoportokban a túlélési arány a kikeléstől a megtermékenyítés utáni 3. hétig és ezt követően általában 90 % vagy magasabb, de nem nyugtalanító az sem, ha a korai életszakaszokban a kontrollok túlélési aránya 80 %-ig csökken. A kontrollcsoportok 80 %-nál alacsonyabb túlélési aránya aggodalomra adna okot és arra utalhat, hogy az akváriumok elégtelen tisztítása miatt betegségből vagy az alacsony oldotttoxigén-tartalom okozta fulladásból kifolyólag pusztulnak a lárvák. A halálozás további okai lehetnek a tartály tisztítása során a lárvákat ért sérülés és a tartály vízelvezető rendszerének tulajdonítható lárvapusztulás.

Vitellogenin gén

Bár a *vitellogenin* (*vtg*) gén – génkópiák/teljes mRNS ng-jában kifejezett – abszolút szintjei az alkalmazott eljárások vagy műszerek miatt jelentősen eltérhetnek az egyes laboratóriumok között, a *vtg* arányának a kontrollcsoport nőstényeiben 200-szor nagyobbak kell lennie, mint a hímekben. Nem szokatlanok az 1000–2000-szeres értékek,

ugyanakkor a 200-szorosnál alacsonyabb arányszámok gyanúsak és arra utalhatnak, hogy problémát okozott a minta fertőzöttsége, az alkalmazott eljárás és/vagy reagens.

Másodlagos ivari jellegek

A hímek esetében a másodlagos ivari jellegek normál tartománya, amelyet a farok alatti úszó papilláris nyúlványainak úszósugaraiban található összes szegmens száma alapján határoznak meg, a megtermékenyítés utáni 9–10. héten 40–80 szegmens. A megtermékenyítés utáni 15. héten a kontrollcsoport hímjeinél ez a tartomány 80–120 körül alakul, a nőstényeknél pedig 0. Ismeretlen okokból kifolyólag bizonyos hím egyedeknél ritkán előfordul, hogy a megtermékenyítés utáni 9. héten nincs papilláris nyúlványuk, de mivel a megtermékenyítés utáni 15. hétre minden kontroll hímen megjelennek papilláris nyúlványok, valószínűleg késleltetett fejlődésről van szó. Amennyiben a kontrollcsoport nőstényeinél megfigyelhetők papilláris nyúlványok, az arra utal, hogy a populációban vannak XX hímek.

XX hímek

Az XX hímek normál háttérbeli előfordulása a tenyészetekben 25 °C-on körülbelül 4 % vagy kevesebb, előfordulásuk a hőmérséklet emelkedésével párhuzamosan növekszik. Intézkedéseket kell tenni annak érdekében, hogy a populációban minél alacsonyabb legyen az XX hímek aránya. Miután az XX hímek előfordulása részben a genetikára vezethető vissza, ezért örökölhető, a tenyészállomány ellenőrzésével és annak biztosításával, hogy az XX hímek nem kerülnek felhasználásra a tenyészállomány szaporításához, hatékonyan csökkenthető az XX hímek populáción belüli előfordulása.

Ívási aktivitás

A fekunditás felmérését megelőzően a kontroll ismétlésekben naponta ellenőrizni kell az ívási aktivitást. Az ívási aktivitásról a kontrollcsoportban lévő tenyészpárok számának vizuális felmérésével lehet megbizonyosodni. A megtermékenyítés utáni 12–14. héten a kontrollcsoport legtöbb párjának már ívnia kell. Ha ebben az időszakban alacsony az ívó párok száma, az a halak egészségét, ivarérettségét vagy jólétét érintő potenciális problémákat jelez.

Fekunditás

Az egészséges, jól táplált, megtermékenyítés utáni 12–14. hétben járó fogaspontyok naponta ívnak, amelynek során napi 15–50 ikrát termelnek. Az ajánlott 24 kontrollként szolgáló tenyészpárból 16-nak (> 65 %) naponta és tenyészpáronként több mint 20 ikrát kell leraknia, de a napi ikramennyiség akár 40 körüli is lehet. Ennél kevesebb ikra arra utalhat, hogy a tenyészpárok nem ivarérettek, rosszul tápláltak vagy betegek.

Termékenység

A kontrollcsoport ivó párjainál a megtermékenyített ikrák aránya jellemzően körülbelül 90 %, de esetenként mérnek 95 % körüli vagy afeletti arányszámokat is. A kontrollcsoport ikráinak 80 %-nál alacsonyabb termékenységi arányai gyanúsak, és az egyedek betegségét vagy a tenyésztési körülmények ideálistól való elmaradását jelezhetik.

5. függelék

PÉLDA ETETÉSI RENDRE

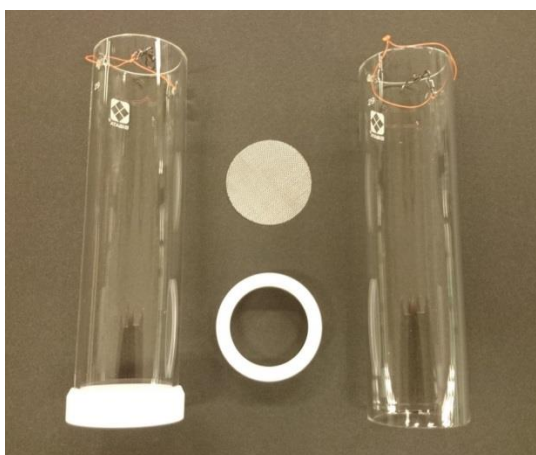
A megbízható szaporodást elősegítő, megfelelő növekedést és fejlődést biztosító etetési rend egy példáját az 1. táblázat ismerteti. Az etetési rendtől való eltérések elfogadhatók, de ajánlatos teszteléssel ellenőrizni, hogy elfogadható növekedést és szaporodást eredményeznek-e. A javasolt etetési rend betartásához a vizsgálatot megelőzően meg kell határozni a sóráknak a folyékony sórák egy egységére eső száraz tömegét. Ehhez lemérnek egy meghatározott térfogatú folyékony sórákot, amelyet előzetesen lemért tálba helyeztek, és 60 °C-on 24 órán keresztül szárítottak. A folyékony sórák sótartalmának tömegét úgy lehet megállapítani, hogy a folyékony sórákhoz használt sóoldattal azonos és megegyező mennyiségű sóoldatot szintén kiszáritanak. lemérnek, majd tömegét levonják a kiszáritott folyékony sórák tömegéből. Alternatív megoldásként a sórákot kiszáritás előtt leszűrhetik és desztillált vízzel átöblíthetik, így nem szükséges lemérni a „só vakoldat” tömegét. Az így kapott információval a sórák táblázatban feltüntetett száraz tömege alapján meghatározható a folyékony sórák halak etetéséhez használandó mennyisége. Ezenfelül javasolt a folyékony sórák alikvotjainak heti mérésével ellenőrizni az etetéshez használt sórák száraz tömegét.

1. táblázat: Az etetési rend példája

Időpont (kikelés utáni nap)	Sórák (mg száraz tömeg/hal/nap)
1. nap	0,5
2. nap	0,5
3. nap	0,6
4. nap	0,7
5. nap	0,8
6. nap	1,0
7. nap	1,3
8. nap	1,7
9. nap	2,2
10. nap	2,8
11. nap	3,5
12. nap	4,2
13. nap	4,5
14. nap	4,8
15. nap	5,2
16–21. nap	5,6
4. hét	7,7
5. hét	9,0
6. hét	11,0
7. hét	13,5
8. hét – elpusztítás	22,5

6. függelék**IKRAKELTETŐ INKUBÁCIÓS KAMRA PÉLDÁJA****A példa**

Ez az inkubátor egy bemetszett üveg centrifugacsőből áll, a csöveket egy rozsdamentes acél tartóhüvely köti össze egymással, és a centrifugacső felső csavaros kupakja tartja a helyükön. Egy, a kupakon áthaladó kis méretű üveg vagy rozsdamentes acél cső a centrifugacső kerek aljának közelében elhelyezkedve légbuborékok óvatos bejuttatásával lebegtetni az ikrákat, csökkentve az ikrák közötti szaprofita gombás fertőzések terjedését, ugyanakkor megkönnyíti a vegyi anyag inkubátor és tárolótartály közötti cseréjét.

B példa

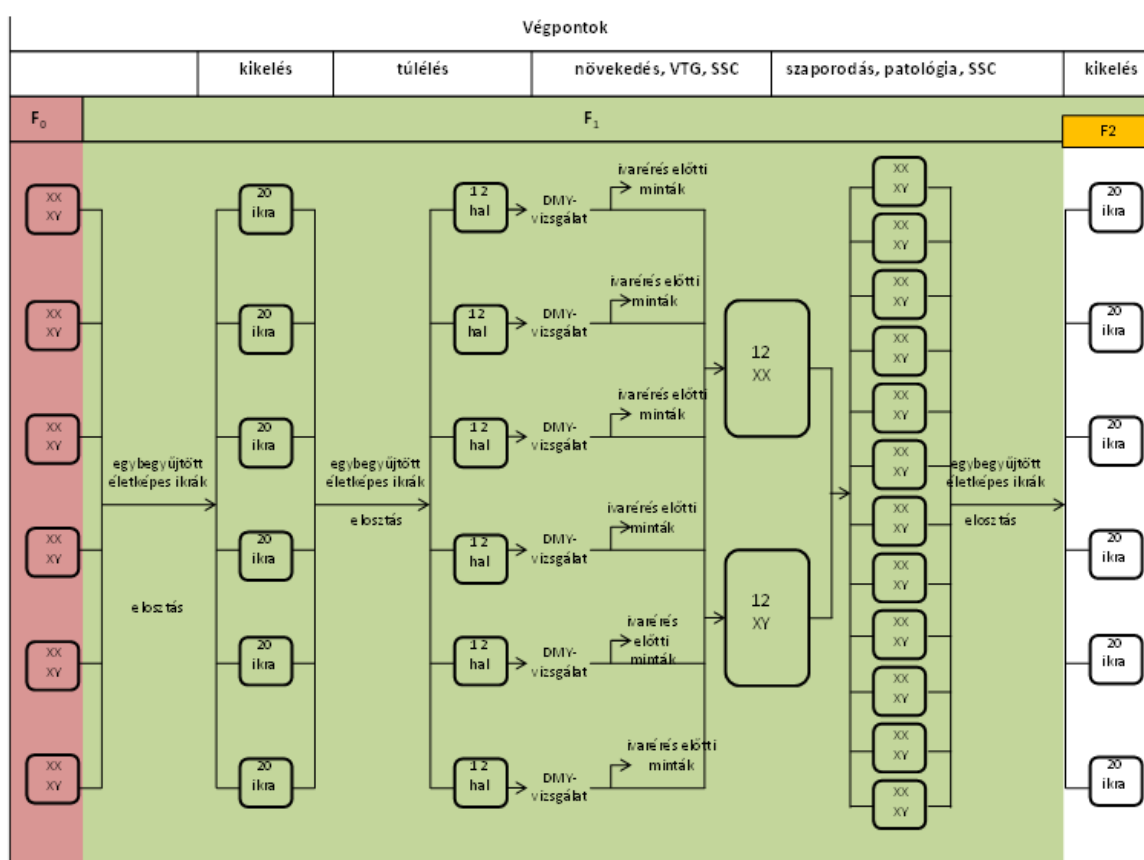


Ez az inkubátor egy (5 cm átmérőjű és 10 cm magas) üveg hengertestből és rozsdamentes dróthálóból (0,25 $\varnothing$ és 32 hálószem) áll, ez utóbbi egy PTFE gyűrűvel csatlakozik a hengertest aljához. Az inkubátorokat az emelőrúdnál fogva függesztik fel és rögzítik a tartályokhoz, és a fogaspontyikráknak megfelelő ciklusban (körülbelül 4 másodpercenként) függőlegesen rázatják őket (mintegy 5 cm-es kilengéssel).

7. FÜGGELÉK

SEMATIKUS ÁBRA A MEOGRT VIZSGÁLATI MÓDSZERBEN ALKALMAZOTT ISMÉTLÉSEK EGYEDEINEK EGYBEGYÜJTÉSÉHEZ ÉS SZÉTOSZTÁSÁHOZ

1. ábra: Az ismétlések egyedeinek egybegyűjtése és szétosztása a MEOGRT során. A számok egy kezelésre vagy egy ½ kontrollvizsgálatra vonatkoznak. A halak egybegyűjtése miatt az egyes ismétlések a vizsgálat teljes ideje alatt nem ugyanazokat az egyedeket tartalmazzák. Az ikra kifejezés az életképes, megtermékenyített ikrákra (vagyis az embriókra) utal.



Kezelések és ismétlések

A vizsgálati módszer technikai tisztaságú anyagok használatával végzett, öt vizsgálati vegyi anyaggal való kezelést és egy negatív kontrollt javasol. A MEOGRT során a kezelésenkénti ismétlések száma változó, a kontrollvizsgálatban pedig kétszer annyi ismétlést használnak, mint egy vizsgálati vegyi anyaggal történő kezelésben. Az F₀ generáció esetében a vizsgálati vegyi anyaggal zajló kezelésnél hat ismétlést, a negatív kontrollvizsgálatban pedig 12 ismétlést használnak. Oldószerek használata nem ajánlott, ha mégis sor kerül

használatukra, a MEOGRT jelentésébe bele kell foglalni az oldószer alkalmazásának és választásának indokolását. Oldószer használata esetén ráadásul két típusú kontrollvizsgálatra van szükség: a) oldószeres kontrollra és b) negatív kontrollra. E két kontrollcsoport mindegyikének a MEOGRT vizsgálat minden szakaszában tartalmaznia kell az ismétlések teljes számát. Az ismétlések fentiekben ismertetett száma változatlan marad a kísérleti élőlények F1 generációjának teljes fejlődése alatt (és az F2 generáció fejlődése során a kikelésig). Ugyanakkor a felnőtt stádiumban, amikor az F1 generáció tenyészpárjait kialakítják, optimális esetben kezelésként megduplázzák a tenyészpárokkal zajló ismétlések számát; ezért a vizsgálati vegyi anyaggal történő egyes kezelések során legfeljebb 12 párt (vagyis ismétlést), míg a kontrollcsoportban 24 párt vizsgálnak (és szükség szerint további 24 párt az oldószeres kontrollban). Az F1 generáció párjaitól származó embriók kikelését ugyanannyi ismétlésben mérik, mint az F0 generáció párjaitól származó embriók esetében, vagyis vizsgálati vegyi anyaggal végzett kezelést hat ismétlésben végeznek, és 12 ismétlést vizsgálnak a kontrollcsoport(ok)ban.

8. FÜGGELÉK

A FAROK ALATTI ÚSZÓ PAPILLÁRIS NYÚLVÁNYAINAK MEGSZÁMLÁLÁSA

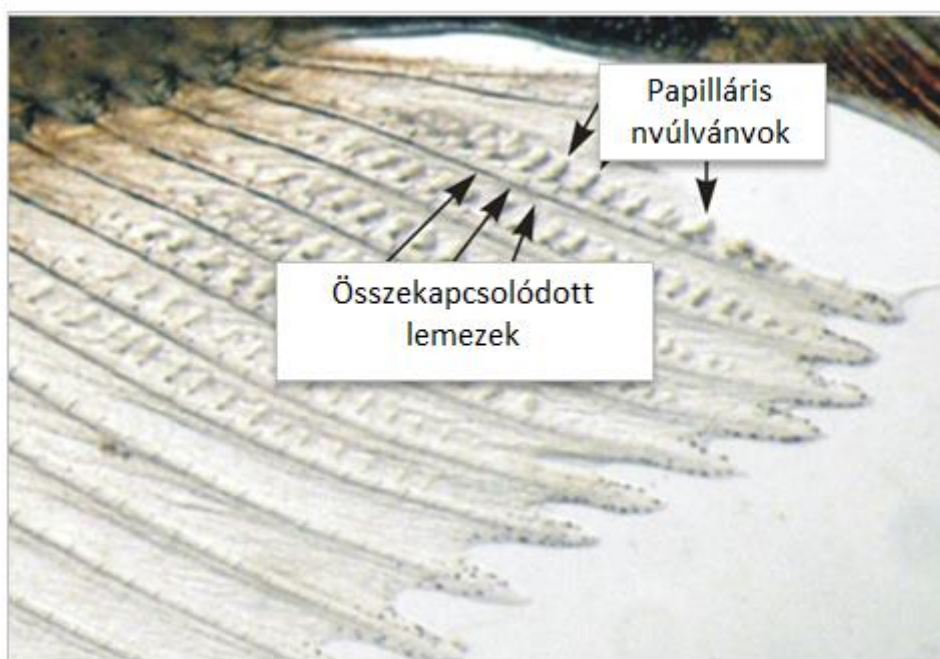
Főbb anyagok és reagensek

- Preparálómikroszkóp (opcionálisan fényképezőgéppel felszerelve)
- Fixálószer (pl. Davidson-féle, a Bouin-féle használata nem ajánlott), ha nem felvétel alapján végzik a számlálást

Eljárások

A boncolást követően a farok alatti úszóról felvételt kell készíteni, ez lehetővé teszi a farok alatti úszó papilláris nyúlványainak kényelmes megszámlálását. Bár a felvét elkészítés az ajánlott módszer, a farok alatti úszó körülbelül 1 percig fixálható Davidson-féle vagy más megfelelő fixálószerben. A fixálás során a farok alatti úszót síkban kell tartani, mert ez megkönnyíti a papilláris nyúlványok megszámlálását. A hal teste a farok alatti úszóval együtt vizsgálatukig tárolható Davidson-féle vagy más megfelelő fixálószerben. Ezt követően megszámlálható az összekapcsolódott lemez hátsó szélénél kiálló papilláris nyúlványokat tartalmazó összekapcsolt lemezek száma (lásd az **1. ábrát**).

1. ábra: Farok alatti úszó papilláris nyúlványai



9. függelék

A MEOGRT RÉSZLETES ÜTEMEZÉSE

1–3. vizsgálati hét (F0)

A kiválasztási kritériumoknak (lásd a 16–20. pontot) megfelelő F0 generációs ívó halakat három hétig kezelik, amelynek során a fejlődésben lévő ivarsejteket és ivari szöveteket kiteszik a vizsgálati vegyi anyagnak. Mindegyik tartály (ismétlés) egyetlen tenyészpárt (XX nőtény-XY hím tenyészpárt) tartalmaz. A lerakott ikrákat az 1. vizsgálati naptól kezdve 21 egymást követő napon át begyűjtik, megszámlálják és meghatározzák, hogy megtermékenyültek-e.

4. vizsgálati hét (F0 és F1)

Törekedni kell arra, hogy a megtermékenyített és életképes ikrákat (embriókat) egy napon belül gyűjtsék össze; elégtelen embriószám esetén azonban két napon keresztül is gyűjthetik az embriókat. Amennyiben az embriókat két napon át gyűjtik, az egyes kezeléseken belül az első napon begyűjtött embriókat egybegyűjtik a második napon begyűjtött embriókkal. Ezt követően az egyes kezeléseknél egybegyűjtött összes embriót huszasával véletlenszerűen elosztják az egyes inkubátorokba (ismétlésekbe). A megtermékenyített ikrák (embriók) mortalitását naponta ellenőrizni és rögzíteni kell. Az elpusztult ikrákat eltávolítják az inkubátorokból (a megtermékenyített ikrák elpusztulását jelzi – különösen a korai szakaszokban – az áttetszőség jelentős csökkenése és színbeli elváltozás, amit a fehérjék koagulációja és/vagy kicsapódása okoz, ami fehér opálos színt eredményez; OECD 210).

Megjegyzés: ha valamely kezelés esetében szükség van az ikrák második napon történő begyűjtésére, minden kezelés során (a kontrollvizsgálatokban is) követni kell ezt az eljárást. Amennyiben valamely kezelésben a második begyűjtési napot követően sincs elegendő számú embrió ahhoz, hogy az inkubátorokba 20 embriót lehessen telepíteni, akkor az adott kezelésen belül a betelepített embriók számát inkubátoronként 15-re kell csökkenteni. Ha nem áll rendelkezésre kellő számú embrió ahhoz, hogy az egyes inkubátorokba 15 embriót lehessen telepíteni, akkor csökkenteni kell az inkubátorok számát, amíg inkubátoronként 15 embriót el lehet helyezni. Emellett további tenyészpárok adhatók hozzá az F0 generáció kezelési és kontrollcsoportjaihoz, hogy több ikrát termeljenek az ismétlésenként javasolt 20 ikra eléréséhez.

A 24. vizsgálati napon az F0 generáció tenyészpárjait kíméletesen leölik, az egyedek tömegét és hosszát feljegyzik. Az F1 generáció újbóli létrehozása érdekében szükség esetén az F0 generáció tenyészpárjai további 1–2 napig fenntarthatók.

5-6. vizsgálati hét (F1)

A kikelés várható kezdete előtt egy-két nappal a kikelés elősegítése érdekében le kell állítani

vagy csökkenteni kell az inkubált ikrák mozgását. Ahogy az embriók kikelnek az egyes napokon, az ivadékokat kezelésként egybegyűjtik, és szisztematikusan szétosztják az adott kezelésen belüli, lárvák elhelyezésére szolgáló tartályok (ismétlések) között, legfeljebb 12 ivadékot telepítve a tartályokba. Ehhez véletlenszerűen kiválasztják az ivadékokat, és válogatás nélkül sorban elhelyezik őket az ismétlésekben, meghatározott sorrendben haladva az adott kezelés ismétlései között, amíg a kezelés összes ismétlésébe be nem telepítettek 12 ivadékot. Amennyiben nincs elég ivadék az összes ismétlés feltöltéséhez, akkor arra kell törekedni, hogy a lehető legtöbb ismétlés tartalmazzon 12 ivadékot az F1 fázis megkezdéséhez.

Azokat az ikrákat, amelyek nem keltek ki a kontroll átlagos kikelési napjának kétszereséig, életképtelennek tekintik és eltávolítják. Az ivadékok számát feljegyzik, és minden ismétlés esetében meghatározzák a kikelés sikerességét (a kikelési arányt).

7-11. vizsgálati hét (F1)

A lárvák túlélését minden ismétlés tekintetében naponta ellenőrzik és rögzítik. A 43. vizsgálati napon feljegyzik az egyes ismétlések túlélő halainak számát, valamint a tartályba helyezett ivadékok induló létszámát (nominálisan tizenkettő). Ez teszi lehetővé a túlélési arány meghatározását a kikeléstől az ivarérés előtti állapotig.

Vizsgálati hetek (F1)

A 78–85. vizsgálati napon az egyedek genotípusos ivarának meghatározásához kis méretű mintát vesznek minden hal farokúszójából (úszók bevágása). Az így kapott információk alapján alakítják ki a tenyészpárokat.

Az egyedek genotípusos ivarának megállapítását követő három napon belül véletlenszerűen létrehoznak 12 tenyészpárt az egyes kezelésekhöz és 24 tenyészpárt az egyes kontrollvizsgálatokhoz. Minden ismétlésből véletlenszerűen kiválasztanak két XX és két XY halat, ivar szerint egybegyűjtik őket, majd véletlenszerűen tenyészpárokat (XX-XY párokat) alakítanak belőlük. A vegyi anyaggal végzett kezeléshez legalább 12, a kontrollvizsgálathoz legalább 24 ismétlést hoznak létre, ismétlésként egy-egy tenyészpárral. Amennyiben valamely ismétlésben nem áll rendelkezésre két XX vagy két XY példány a halak egybegyűjtéséhez, akkor a kezeléshez tartozó többi ismétlésből kell biztosítani a megfelelő genotípusos ivarú halakat.

A fennmaradó halakat (ismétlésként legfeljebb 8-at) humánus módon leölik, és mintákat vesznek tőlük a különböző ivarérés előtti végpontok értékeléséhez. Az ivarérés előtti halakból származó minták *dmy* génre vonatkozó adatait (XX vagy XY) megőrzik, mert ezáltal biztosítható, hogy a végpontokra vonatkozó adatokat az egyes halak genetikai ivarával összefüggésben értelmezzék.

13-14. vizsgálati hét (F1)

A kezelés az ivarérés előtti tenyészpárok felnőtté válása alatt is folytatódik. A vizsgálati 98. napján (vagyis az ikrák begyűjtésének kezdete előtti napon) az ikrákat eltávolítják az akváriumokból és a nőtényekről.

15-17. vizsgálati hét (F1)

A lerakott ikrákat 21 egymást követő napon át naponta begyűjtik minden ismétlésből, és értékelik fekunditás és termékenység szempontjából.

18. vizsgálati hét (a 4. vizsgálati hét ismétlése) (F1 és F2)

A 120. vizsgálati nap reggelén minden tartályból (ismétlésből) begyűjtik az ikrákat. A begyűjtött ikrákat értékelik, majd az összes tenyészpár megtermékenyített ikráit kezelésként egybegyűjtik (az ikrafonalat eltávolítják), és szisztematikusan szétosztják az ikrakeltető inkubációs kamrákba, legfeljebb 20 megtermékenyített ikrát telepítve egy inkubátorba. A inkubátorok elhelyezhetők különálló, az egyes kezelésekhöz felállított inkubátor tartályokba, vagy azokba a tartályba, amely a kikelést követően otthont adnak majd a kikelt lárváknak. Törekedni kell arra, hogy az embriókat egy napon belül gyűjtsék össze; elégtelen embriószám esetén azonban két napon keresztül is gyűjthetik őket. Amennyiben az embriókat két napon keresztül gyűjtik be, az egyes kezeléseken belül az első napon begyűjtött embriókat egybegyűjtik a második napon begyűjtött embriókkal. Ezt követően az egyes kezeléseknél során egybegyűjtött összes embriót huszasával véletlenszerűen elosztják az egyes inkubátorokba (ismétlésekbe). Megjegyzés: ha valamely kezelés esetében szükség van az ikrák második napon történő begyűjtésére, minden kezelés során (a kontrollvizsgálatokban is) követni kell ezt az eljárást. Amennyiben valamely kezelés esetén a második begyűjtési napot követően sincs elegendő számú embrió ahhoz, hogy az inkubátorokba 20 embriót lehessen telepíteni, az adott kezelésen belül a betelepített embriók számát inkubátoronként 15-re kell csökkenteni. Ha nem áll rendelkezésre kellő számú embrió ahhoz, hogy az egyes inkubátorokba 15 embriót lehessen telepíteni, akkor csökkenteni kell az inkubátorok számát, amíg inkubátoronként 15 embriót el lehet helyezni.

A 121. vizsgálati napon (vagy a 122. vizsgálati napon, ha biztosítani kívánják az F2 generáció megfelelő indulását) az F1 generáció tenyészpárjait kíméletesen leölik és a felnőtt végpontok szerint elemzik. Az F2 generáció újbóli létrehozása érdekében szükség esetén az F1 generáció tenyészpárjai további 1–2 napig fenntarthatók.

19-20. vizsgálati hét (F2)

A kikelés várható kezdete előtt egy-két nappal a kikelés elősegítése érdekében le kell állítani vagy csökkenteni kell az inkubált ikrák mozgását. Amennyiben a vizsgálatot az F2 generáció kikelését követően lezárják, az ivadékokat minden nap megszámolják és eltávolítják. (Azokat az embriókat, amelyek nem keltek ki a meghosszabbított inkubációs idő alatt, vagyis a kontroll átlagos kikelési napjának kétszereséig, életképtelennek tekintik).

10. függelék

STATISZTIKAI ELEMZÉS

A MEOGRT során létrehozott biológiai adatok típusai nem csak e vizsgálatra jellemzőek, és a patológiai adatok kivételével számos megfelelő statisztikai módszertant dolgoztak ki a hasonló adatok helyes elemzésére attól függően, hogy milyen jellegű adatok állnak rendelkezésre, ideértve a normál eloszlást és a szóródáshomogenitást, illetve azt, hogy a tanulmány kialakításából fakadóan hipotézisvizsgálat vagy regressziós analízis, parametrikus vagy nem paraméteres vizsgálatok alkalmazhatók. Általánosan érvényes, hogy a javasolt statisztikai elemzések az OECD ökotoxicitási adatokra vonatkozó ajánlásait követik (OECD 2006), a 2. ábra pedig bemutatja a MEOGRT adatelemzésével kapcsolatos döntési folyamatábrát.

Az adatbázis feltételezhetően többnyire monoton válaszokkal jellemezhető. Emellett mérlegelni kell, hogy egyoldalú vagy kétoldalú statisztikai vizsgálatot érdemes végezni. Amennyiben nem lehet biológiai érvekkel alátámasztani az egyoldalú vizsgálat alkalmatlanságát, akkor javasolt egyoldalú vizsgálatot végezni. Az alábbi rész ajánlást tartalmaz bizonyos statisztikai vizsgálatok használatára, ha azonban léteznek megfelelőbb és/vagy hatékonyabb statisztikai módszerek a MEOGRT során létrehozott egyedi adatok elemzésére, akkor azokat kell használni, hogy ki lehessen aknázni az általuk biztosított előnyöket.

A MEOGRT során kapott adatokat genotípusos ivaronként kell elemezni. A fordított ivarú halak (XX hímek vagy XY nőstények) adatainak elemzésére két stratégia alapján kerülhet sor: 1) a fordított ivarú halakról a vizsgálat során szerzett valamennyi adat törlése, az egyes ismétlésekben előforduló ivarváltás gyakoriságára vonatkozó adatokat kivéve; 2) a fordított ivarú halakról gyűjtött adatok megtartása és genotípus szerinti elemzése.

Kórszövettani adatok

A jelentésben súlyosság szerint pontszámozott kórszövettani adatok értékelését egy újonnan kifejlesztett statisztikai eljárás, a Rao–Scott Cochran–Armitage by Slices (RSCABS) trendpróba alapján végzik (Green és munkatársai, 2014). A *Rao-Scott*-féle módosítás megtartja a vegyi anyaggal kezelt ismétlések adatait; a *by Slices* eljárás pedig figyelembe veszi azt a biológiai elvárást, hogy a kezelés során alkalmazott koncentrációk növelése magával vonja a súlyossági pontszámok emelkedését. Az RSCABS eredménye minden diagnózis esetében meghatározza, hogy a kontrollokhoz képest melyik kezelésnél gyakoribbak a patológias elváltozások, és azok milyen súlyossági szintet képviselnek.

Fekunditási adatok

A fekunditási adatok elemzése lefelé lépegető Jonckheere–Terpstra-féle próbával vagy Williams-féle próbával történik, amelynek során meghatározzák a kezelés által kiváltott

hatásokat, ha az adatok összhangban vannak egy monoton jellegű koncentráció-válással. A lefelé lépegető próbák során minden összevetést a 0,05-ös szignifikanciaszinten végeznek el, és az eredményt nem igazítják ki az összevetések száma alapján. A várakozások szerint az adatok monoton koncentráció-válással jellemezhetők, ez ellenőrizhető az adatok szemrevételezésével, illetve úgy is, hogy az adatok rangsorba rendezését követően létrehozzák a kezelés átlagértékeinek lineáris vagy kvadrátikus kontrasztjait. Ha a kvadrátikus kontraszt szignifikáns, a lineáris kontraszt pedig nem az, a trendpróba lezárható. Ellenkező esetben, ha az adatok normál eloszlásúak homogén szórással, a kezelés által kiváltott hatásokat a Dunnett-féle próbával határozzák meg. Amennyiben ezek a feltételek nem teljesülnek, a Dunn-féle próba Bonferroni–Holm módosítását alkalmazzák. Az említett próbákat általános F-próbától vagy Kruskal–Wallis-féle próbától függetlenül kell elvégezni. Minderről további részletek az OECD 2006 dokumentumban találhatók.

Más módszerek is használhatók, például általánosított lineáris modellek Poisson-hibaeloszlással az ikrák számlálásához (az adatok transzformálása nélkül), ha statisztikailag indokolható (Cameron és Trividi, 2013). Alternatív megközelítés alkalmazása esetén statisztikai tanácsadás igénybevétele ajánlott.

Napi ikraszámlálás egy generáción belül

Az ANOVA modell a következő képletben alapul: $Y = \text{Idő} * \text{Idő} + \text{Kezelés} + * \text{Kezelés} + \text{Idő} * \text{Kezelés} + * \text{Idő} * \text{Kezelés}$, az Ismétlés(Generáció*Kezelés) és az Idő*Ismétlés(Kezelés) véletlen hatással, amely lehetővé teszi mindkét típusú egyenlőtlen varianciakomponens generációkon keresztüli elemzését. A képletben az Idő az ikraszámlálás gyakoriságára utal (pl. napi vagy heti). Ez egy ismételten méresekben alapuló elemzés, az egy adott ismétlésre vonatkozó megfigyelések között korrelációk jelentik azt, hogy az adatok ismételten mérésből származnak.

A kezelés fő hatásait a Dunnett-féle (vagy Dunnett-Hsu-féle) próbával vizsgálják, amely az összevetések száma szerint kiigazítja az eredményt. A generáció vagy az idő okozta fő hatást ki kell igazítani, mivel e két tényező esetében nem áll rendelkezésre kontrollszint, és az egyes szignifikanciaszinten minden pár összevetése érdekes lehet. E két fő hatás tekintetében ha az F-próbával vizsgált fő hatás szignifikáns 0,05-ös szinten, akkor az adott tényező különböző szignifikanciaszinten történő páronkénti összevetése a 0,05-ös szinten további kiigazítás nélkül vizsgálható.

Mivel a modell két és három tényező kölcsönhatását vizsgálja, előfordulhat, hogy például az idő fő hatása nem lesz szignifikáns, pedig az idő jelentősen befolyásolja az eredményeket. Ha tehát egy két vagy három tényezős kölcsönhatás, amelynek egyik tényezője az idő, 0,05-ös szinten szignifikáns, akkor elfogadható a különböző időszintek 0,05-ös szignifikanciaszinten történő korrekció nélküli összevetése.

Azután F-próbákkal mérhető a kezelés adott időn belüli szignifikanciája, ezek az úgynevezett F-próbarészek az ANOVA-táblázatban. Ha például az F1 generáció 12.

idősávon belüli kezelését magában foglaló F-próbarész szignifikáns a 0,05-ös szinten, akkor az F1 generáció 12. idősávon belüli kezelésének páronkénti összevetése a 0,05-ös szinten további kiigazítás nélkül vizsgálható. Hasonló megállapítások vonatkoznak azokra a vizsgálatokra, amelyek az időt mérik az F1 generációval és a kezeléssel való összefüggésben, illetve a generációt az idővel és a kezeléssel való összefüggésben.

Végezetül pedig a fenti kategóriák egyikébe sem sorolható összehasonlítások esetén az összevetéseket a p-értékek Bonferroni–Holm-féle korrekciója szerint kell kiigazítani. Az ilyen jellegű modellek elemzéséről további részletekkel Hocking (1985), valamint Hochberg és Tamhane (1987) szolgál.

Alternatív megoldásként a nyers adatokat feljegyzik és a vizsgálati jegyzőkönyvben ismétlésekenkénti napi fekunditásként (ikraszámként) tüntetik fel. Ezután kiszámítják az ismétlések nyers adatainak átlagát, majd négyzetgyök transzformációt alkalmaznak. Ezt követően az ismétlések transzformált átlagértékén egyoldali varianciaanalízist (ANOVA) végeznek, majd meghatározzák a Dunnett-féle kontrasztokat. Szintén hasznos lehet az egyes kezelések és/vagy ismétlések fekunditási adatainak vizuális ellenőrzése egy, az adatokat az idő függvényében ábrázoló szórásdiagrammal. Ez lehetővé teszi az idővel jelentkező potenciális hatások informális értékelését.

Minden egyéb biológiai adat

A statisztikai elemzések abból az alapfeltevésből indulnak ki, hogy megfelelő dóziszválasztás esetén az adatok monoton jellegűek lesznek. Az adatok tehát feltételezhetően monoton jellegűek, monotonitásuk formális értékelését lineáris és kvadratus kontrasztokkal végzik. Amennyiben az adatok valóban monoton jellegűek, (az OECD 2006 ajánlása szerint) az ismétlések mediánértékét elemző Jonckheere–Terpstra-féle trendpróba elvégzése javasolt. Ha a kvadratus kontraszt szignifikáns, a lineáris kontraszt pedig nem az, az adatok nem monoton jellegűek.

Ha az adatok nem monoton jellegűek, különösen ha azért, mert a legnagyobb vagy második legnagyobb dózissal végzett kezelés korlátozott választ vált ki, akkor fontolóra kell venni az adatbázis csökkentését, hogy az elemzést e kezelések nélkül lehessen elvégezni. Döntést szakmai megítélésre kell alapozni, továbbá figyelembe kell venni az összes rendelkezésre álló adatot, főképp azokat az adatokat, amelyek e dózisszintek nyilvánvaló toxicitását jelzik.

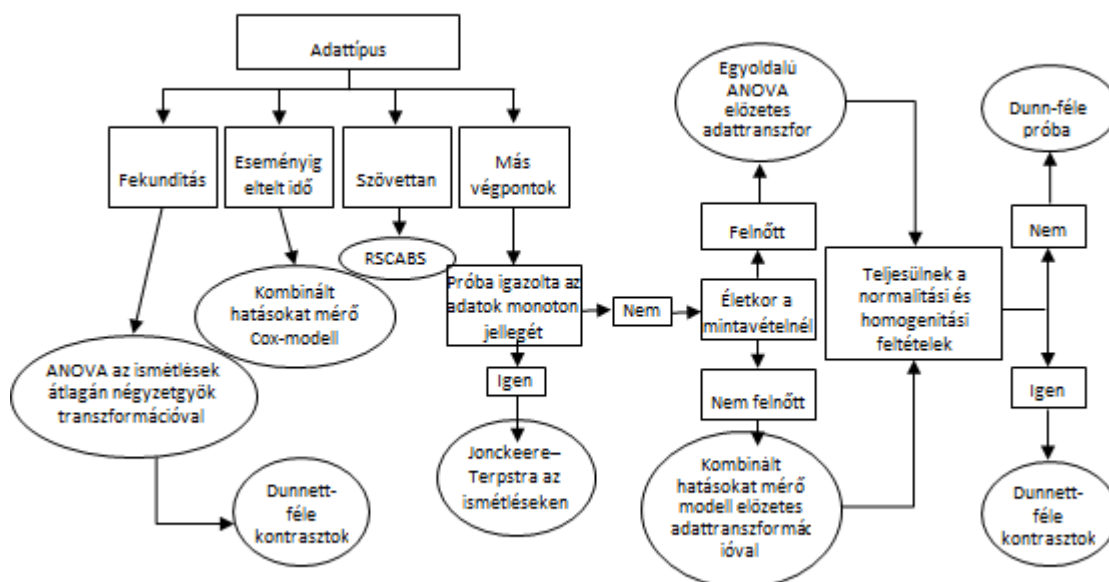
A testtömegre és a testhosszra vonatkozó adatokat nem ajánlatos transzformálni, bár esetenként szükséges lehet. A vitellogeninre vonatkozó adatokon azonban ajánlatos logaritmikus transzformációt, a másodlagos nem jellegre (farok alatti úszó papilláris nyúlványaira) vonatkozó adatokon négyzetgyök transzformációt, a kikelési arányra, a túlélési arányra, az ivararányra és a termékeny ikrák arányára vonatkozó adatokon pedig négyzetgyök arkusz-színusz transzformációt végezni. A kikelésig eltelt időt és az első ívásig eltelt időt „eseményig eltelt időt” jelző adatként kell kezelni, és felső határt átlépő adatként ki kell zárni az azokra az embriókra vonatkozó adatokat, amelyek nem keltek ki a megadott

időszak alatt és azokra az ismétlésekre vonatkozó adatokat, amelyekben nem történt ívás. A kikelésig eltelt időt az egyes ismétlések átlagos kikelési napja alapján kell meghatározni. Ezeket a végpontokat a kombinált hatásokat mérő Cox-féle arányos kockázati modellel kell elemezni.

A felnőtt mintákból származó biológiai adatokat ismétlésenként egy mérésből nyerik, amelynek során az egyes akváriumokban (ismétlésekben) egy XX hal és egy XY hal található. Ezért az ismétlések átlagát egyoldalú varianciaanalízissel (ANOVA) érdemes vizsgálni. Amennyiben az ANOVA feltételezései (az ANOVA maradékain a Shapiro–Wilk-féle próbával mért normál eloszlás és a Levene-féle próbával mért szóródáshomogenitás) beigazolódnak, a kontrollétől eltérő eredményt adó kezeléseket Dunnett-féle kontrasztokkal kell meghatározni. Ha azonban az ANOVA feltételezései nem igazolódnak be, a Dunn-féle próbával kell meghatározni, hogy mely kezelések eredményei tértek el a kontrollétől. Hasonló eljárást érdemes alkalmazni az arányszámban megadott adatoknál (termékenység, kikelés és túlélés).

Az ivarézés előtti álló halak mintáiból származó biológiai adatokat ismétlésenként 1–8 mérés során szerzik, így változó egyedszám képezheti az egyes genotípusos ivarok ismétlésenkénti átlagának alapját. Ezért érdemes kombinált hatásokat mérő ANOVA-modellt használni, majd Dunnett-féle próbával meghatározni a kontrasztokat, amennyiben beigazolódtak a (kombinált hatásokat mérő ANOVA maradékain mért) normál eloszlásra és a szóródáshomogenitásra vonatkozó feltételezések. Ha nem igazolódtak be a feltételezések, a Dunn-féle próbával kell meghatározni, hogy mely kezelések eredményei tértek el a kontrollétől.

2. ábra: A MEOGRT adatelemzéséhez ajánlott statisztikai eljárások folyamatábrája.



Szakirodalom

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

C.53. KÉTÉLTŰ LÁRVÁK NÖVEKEDÉSI ÉS FEJLŐDÉSI VIZSGÁLATA (LAGDA)

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 241. vizsgálati iránymutatásában (2015) leírt módszerrel. A kétéltű fajok toxikus vegyi anyagokkal szembeni kitettségéből fakadó káros következmények kimutatására és jellemzésére alkalmas vizsgálat kifejlesztése és validálása iránti igény azokból az aggodalmakból ered, hogy egyes vegyi anyagok a környezetben előforduló mennyiségben káros hatással lehetnek az emberekre és az élővilágra egyaránt. A Kétéltű lárvák növekedési és fejlődési vizsgálata (LAGDA) című OECD-iránymutatás által leírt, kétéltű fajokon végezhető toxicitási vizsgálat a megtermékenyítéstől a korai növedékkorig tartó időszak alatti növekedéssel és fejlődéssel foglalkozik. A jellemzően 16 héten át tartó vizsgálat a korai fejlődést, az átalakulást, a túlélést, a növekedést és részlegesen a reprodukív rendszer érését értékeli. Emellett lehetővé teszi egy sor másik végpont mérését is, amelyek segítségével elvégezhető az endokrin rendszert feltételezhetően károsító vegyi anyagok, valamint a fejlődési és reprodukációs toxicitást okozó egyéb típusú anyagok diagnosztikus értékelése. Az ebben a vizsgálati módszerben ismertetett eljárást az Egyesült Államok Környezetvédelmi Ügynöksége (U.S. EPA) által és Japán támogató közreműködésével az afrikai karmosbékán (*Xenopus laevis*) végzett validálási munka alapján dolgozták ki (1). Bár valószínűleg más kétéltű fajokra is kidolgozható olyan növekedési és fejlődési vizsgálati protokoll, amelynek egyik fontos eleme a genetikai ivar megállapításának képessége, az e vizsgálati módszerben részletezett egyedi eljárások és megfigyelt végpontok kizárólag a *Xenopus laevis*-re alkalmazhatók.
2. A LAGDA egy magasabb szintű kétéltű vizsgálatként alkalmazható a káros hatásokra vonatkozó átfogóbb koncentráció-válasz adatok gyűjtésére, amelyek alkalmasak arra, hogy ökológiai kockázatfelmérés keretében azonosítsák és jellemezzék a veszélyeket. A vizsgálat az OECD endokrin rendszert károsító anyagok vizsgálatára és értékelésére vonatkozó fogalmi keretének 4. szintjén helyezkedik el, ahol az in vivo vizsgálatok az endokrin rendszer releváns végpontjaira gyakorolt káros hatásokról is szolgáltatnak adatokat (2). Az általános kísérleti terv alapján az *X. laevis* embriókat a Nieuwkoop és Faber (NF) szerinti 8–10. stádiumban (3) a vizsgálati vegyi anyag legalább négy különböző koncentrációjával kezelik (az egyes koncentrációkat általában legalább fél logaritmikus osztásköz választja el egymástól) és kontrollvizsgálat(ok)at is végeznek egészen a kontroll NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges átlagos időtartamát követő 10 hétig, egy közbenső részmintát vesznek az NF szerinti 62. stádiumban (a

megtermékenyítés utáni 45. napján nem később, többnyire a megtermékenyítés után 45. nap körül). Minden egyes vizsgálati koncentráció esetében négy ismétlést javasolnak, kontrollként szolgáló nyolc ismétléssel kiegészítve. A kezelés során (a közbenső részmintavételnél és a vizsgálat lezárásakor végzett végső mintavételnél) értékelt végpontok közé tartoznak az általános toxicitást jelző végpontok: a mortalitás, a rendellenes viselkedés, a növekedést meghatározó tényezők (testhossz és testtömeg), valamint azok a végpontok, amelyek révén jellemezhetők az ösztrogén, az androgén vagy a pajzsmirigy által közvetített fiziológiai folyamatokat célzó konkrét endokrin toxicitási hatásmechanizmusok. A módszer elsődleges célja a populációnál esetlegesen fellépő releváns hatások (vagyis a túlélésre, a fejlődésre, a növekedésre és a reprodukív fejlődésre gyakorolt káros hatások) meghatározása, amelyek alapján kiszámítható a megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC) vagy egy hatásos koncentráció, amely a mért végpontban x % változást okoz (ECx). Ugyanakkor megjegyzendő, hogy az ECx megállapításán alapuló megközelítések ritkán alkalmazhatók az ilyen nagy léptékű vizsgálatokra, ahol a vizsgált koncentrációk számának a kívánt ECx meghatározásához szükséges növelése kivitelezhetetlen lehet. Az is megjegyzendő, hogy ez a módszer magával a reprodukciós fázissal nem foglalkozik. Az e vizsgálati módszerben használt fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatók.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

3. Miután e meglehetősen összetett vizsgálat validálását korlátozott számú vegyi anyagon és korlátozott számú laboratórium bevonásával végezték el, és ez idáig a laboratóriumok közötti reprodukálhatóságot sem dokumentálták kísérleti adatokkal, várható, hogy amikor elegendő számú vizsgálat áll rendelkezésre ezen új vizsgálati terv hatásának megállapítására, az OECD 241. vizsgálati iránymutatását a szerzett tapasztalatok fényében felül fogják vizsgálni, és szükség szerint átdolgozzák. A LAGDA egy fontos vizsgálat, amely a vegyi anyagok által az érzékeny lárvastádiumban kiváltott hatások értékelésével felméri a kételtű populáció hanyatlásához potenciálisan hozzájáruló tényezőket, a lárvastádiumban ugyanis a túlélésre és a fejlődésre, azon belül a szaporítószervek rendes fejlődésére gyakorolt hatások hátrányosan érinthetik a populációkat.
4. A vizsgálat az endokrin és nem endokrin mechanizmusok által előidézett apikus hatás(ok) észlelésére szolgál, és magában foglal olyan diagnosztikus végpontokat, amelyeket részben befolyásolnak az endokrin rendszerre ható mechanizmusok. A LAGDA kidolgozása előtt nem állt rendelkezésre olyan validált vizsgálat, ami ilyen szerepet töltött volna be a kételtűek vizsgálatában.

5. A vizsgálat megkezdése előtt információkat kell szerezni a vizsgálati vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságairól, különösen annak érdekében, hogy stabil oldatokat lehessen készíteni a vegyi anyagból. Emellett szükség van egy, a vizsgálati vegyi anyag koncentrációinak ellenőrzésére alkalmas, megfelelő érzékenységű elemzési módszerre. A mintegy 16 hétig tartó vizsgálatához összesen 480 állatot, vagyis *X. laevis* embriót (illetve oldószeres kontroll használata esetén 640 embriót) kell alkalmazni ahhoz, hogy kellő statisztikai erőt képviseljenek a szaporodáshoz kapcsolódó végpontok, úgymint a növekedés, a fejlődés és a reprodukció értékeléséhez.
6. A vizsgálati módszernek adott keverék szabályozási célú vizsgálatára történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az elfogadható eredményeket biztosít-e a szándékolt szabályozási célra. Megjegyzendő továbbá, hogy ez a vizsgálat nem értékeli közvetlenül a fekunditást, ezért az OECD endokrin rendszert károsító anyagok vizsgálatára és értékelésére vonatkozó fogalmi keretnek 4. szintjénél magasabb szinten történő használatra feltehetően nem alkalmas.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER TUDOMÁNYOS ALAPJA

7. A kétéltűek biológiájával kapcsolatos jelenlegi ismereteink jó része az *X. laevis* laboratóriumi modellfaj használatából származnak. Ez a faj rutinszerűen tenyészthető laboratóriumban, ovulációja kiváltható humán koriogonadotropinnal (hCG-vel), a törzstenyészet állatai pedig tenyésztőktől kereskedelmi forgalomban könnyen beszerezhetők.
8. Mint minden gerinces élőlény esetében, a kétéltűek szaporodását is a hipotalamusz-hipofízis-gonád (HPG) tengely szabályozza (4). Az ösztrogének és az androgének közvetítő szerepet töltenek be ebben az endokrin rendszerben, irányítva az ivari ketalakúságot mutató szövetek fejlődését és fiziológiáját. Ez a tengely különösen a kétéltűek életciklusának három elkülönülő fázisában aktív: (1) a lárva szakaszban az ivarmirigyek differenciálódása során, (2) a növekedés szakaszban a másodlagos ivari jellegek kifejlődése és az ivarmirigyek érése során, valamint (3) a kifejlett példányok funkcionális szaporodása során. E három fejlődési szakasz mindegyike vélhetően érzékenyen reagál bizonyos vegyi anyagok, például az ösztrogén és az androgén endokrin rendszert zavaró hatására, ami végső soron az élőlények szaporodási képességének csökkenéséhez vezet.
9. Az ivarmirigyek a bipotenciális ivarredő első megjelenésekor, az NF szerinti 43. stádiumban kezdenek fejlődni. Az ivarmirigyek differenciálódása az NF szerinti 52. stádiumban veszi kezdetét, amikor az elsődleges csírasejtek vagy a medulláris szövethez

migrálnak (hímeknél) vagy a fejlődő ivarmirigyek kérges régiójában maradnak (nőstényeknél) (3). Először az 1950-es években számoltak be arról, hogy a *Xenopus* ivarmirigyeinek nemi differenciálódási folyamata érzékeny a vegyi anyagok módosító hatására (5) (6). Az ivarmirigy e differenciálódási szakaszában ösztradiollal kezelt ebihalak esetében a hímek ivara megfordul, és felnőttkorukra teljes funkciójú nőstényekké válnak (7) (8). A nőstények ivara is átalakulhat hím ivarrá, erről a hereszövet ebihalakba való átültetését követően számoltak be (9). Bár az aromatazgatókkal szembeni kitettség is az ivari funkciók megfordulását eredményezi az *X tropicalis*-ban (10), ezt a jelenséget nem mutatták ki az *X. laevis*-ban. A múltban a toxikus anyagok ivarmirigyek differenciálódására gyakorolt hatását az átalakulás fázisában lévő ivarmirigyek szövettani vizsgálata alapján határozták meg, az ivarok megfordulását pedig kizárólag az ivararányok elemzése révén tudták megállapítani. Egészen a közelmúltig nem létezett módszer a *Xenopus* genetikai ivarának közvetlen meghatározására. Az *X. laevis* ivari markereinek közelmúltbeli létrehozása lehetővé teszi a genetikai ivar meghatározását és a megfordult ivarú állatok közvetlen azonosítását (11).

10. A hímeknél a növedékek fejlődésének előrehaladtával a vér tesztoszteronszintje a másodlagos ivari jellegek kialakulásával és a herék fejlődésével párhuzamosan növekszik. A nőstényeknél a petefészkek által termelt ösztadiol hatására vitellogenin (VTG) jelenik meg a plazmában, vitellogenikus petesejtek a petefészkekben és petevezetékek fejlődnek ki (12). A petevezetékek női másodlagos ivari jellegek, amelyek a szaporodás során a petesejtek érésében játszanak szerepet. A petevezetéken áthaladó petesejtek külsejére nyálkás bevonat kerül, majd megtermékenyítésre készen összegyűlnek a petetömlőben. Úgy tűnik, hogy a petevezeték fejlődését az ösztrogén szabályozza, mivel fejlődése korrelál az *X. laevis* (13) és az *X. tropicalis* (12) vérében mért ösztadiolszintekkel. Beszámolók szerint poliklórozott bifenil vegyületekkel (14) és 4-terc-oktilfenollal (15) való kezelést követően a hímeknél petevezeték fejlődött ki.

A VIZSGÁLAT ELVE

11. A vizsgálati terv alapján az *X. laevis* embriókat az NF szerinti 8–10. stádiumban víz közvetítésével a vizsgálati vegyi anyag négy különböző koncentrációjával kezelik és kontrollvizsgálat(ok)at is végeznek egészen a kontroll NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges átlagos időtartamát követő 10 hétig, egy közbenső részmintát vesznek az NF szerinti 62. stádiumban. Bár a táplálékon keresztül elvileg a nagymértékben víztaszító vegyi anyagok adagolása is megoldható, ez idáig csekély tapasztalatot szereztek ennek az expozíciós útnak e vizsgálat keretében való alkalmazásáról. Minden vizsgálati koncentrációt négy ismétlésben és minden kontrollt nyolc ismétlésben vizsgálnak. A

kezelés során értékelt végpontok közé tartoznak az általános toxicitást jelző végpontok (vagyis a mortalitás, a rendellenes viselkedés és a növekedést meghatározó tényezők (testhossz és testtömeg)), valamint azok a végpontok, amelyek révén jellemezhetők az ösztrogén, az androgén vagy a pajzsmirigy által közvetített fiziológiai folyamatokat célzó konkrét endokrin toxicitási hatásmechanizmusok (vagyis a pajzsmirigy kórszövettana, az ivarmirigy és az ivarmirigy-vezeték kórszövettana, a rendellenes viselkedés, a vérplazma vitellogenin szintje (választható) és a genotípusos/fenotípusos ivararányok).

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGI KRITÉRIUMAI

12. A vizsgálat érvényességéhez az alábbi kritériumoknak kell teljesülniük:

- a vizsgálat során az oldott oxigén koncentrációjának mindvégig el kell érnie a levegőtelítettség érték 40 %-át;
- a vízhőmérsékletet a 21 ± 1 °C-os tartományban kell tartani, az ismétlések és a kezelések közötti különbség nem haladhatja meg az 1,0 °C-ot;
- a vizsgálati oldat pH-értékét 6,5 és 8,5 között kell tartani, az ismétlések és a kezelések közötti különbség nem haladhatja meg a 0,5-öt;
- bizonyítékkal kell alátámasztani, hogy a vizsgálati vegyi anyag oldatban lévő koncentrációit az átlagos mért értékek ± 20 %-os tartományán belül sikerült tartani;
- az expozíciós időszak alatt a mortalitás egyik kontrollismétlésben sem haladhatja meg a 20 %-ot;
- a vizsgálat elindításához kiválasztott íváson belül az életképességnek legalább 70 %-osnak kell lennie;
- a kontrollokban az NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges átlagos időtartam legfeljebb 45 nap lehet;
- a kontrollokban és az oldószeres kontrollokban (ha végeztek ilyet) a vizsgált élőlények átlagos testtömegének az NF szerinti 62. stádiumban el kell érnie az $1,0 \pm 0,2$ g-ot, a vizsgálat végén pedig a $11,5 \pm 3$ g-ot.

13. Bár ez nem érvényességi kritérium, ajánlatos legalább három – három érvényes ismétlést bevonó – kezelési szintnek rendelkezésre állnia az elemzéshez. Kezelést érvénytelenítő túlzott mortalitásról akkor lehet szó, ha legalább két ismétlésben tapasztalnak 4-nél több (vagyis 20 %-ot meghaladó) elhullást, amely technikai hibával nem magyarázható. Az elemzéshez legalább három – nyilvánvaló toxicitást nem mutató – kezelési szintnek kell rendelkezésre állnia. Nyilvánvaló toxicitásra utaló jel lehet – a teljesség igénye nélkül –, ha

az élőlény a víz felszínén lebeg, a tartály alján fekszik, fordítva vagy szabálytalanul úszik, nem emelkedik fel a felszínre, nem reagál az ingerekre, illetve morfológiai rendellenességeket (pl. végtagdeformitások), haemorrhagiás léziókat vagy hasi ödémát mutat.

14. Az érvényességi kritériumoktól való eltérés esetén a vizsgálati adatok megbízhatóságára gyakorolt következményeket mérlegelni kell, az eltéréseket és a mérlegelt következményeket bele kell foglalni a jegyzőkönyvbe.

A VIZSGÁLATI MÓDSZEREK LEÍRÁSA

Berendezés

15. Normál laboratóriumi felszerelés és különösen az alábbiak:

- a) hőmérséklet-szabályozó készülék (pl. 21 ± 1 °C-ra beállítható fűtőtestek vagy hűtőberendezések);
- b) hőmérő;
- c) binokuláris preparálómikroszkóp és bonceszközök;
- d) legalább 4 megapixel felbontású és mikrofunkcióval rendelkező digitális fényképezőgép (ha szükséges);
- e) 0,001 mg-ig vagy 1 µg-ig mérni képes analitikai mérleg;
- f) oldottoxigénkoncentráció-mérő és pH-mérő;
- g) lux egységek mérésére képes fényerősségmérő.

Víz

Eredet és minőség

16. Bármely olyan helyben elérhető hígítóvíz (pl. forrásvíz vagy aktív szénen szűrt csapvíz) használható, amelyben az *X. laevis* lárvák normálisan növekednek és fejlődnek, és rendelkezésre állnak az adott vízben való normális növekedést alátámasztó bizonyítékok. Mivel a helyi vízminőség területenként lényegesen eltérhet, a víz minőségét elemezni kell, különösen ha nem állnak rendelkezésre korábbi adatok a víz kételtű lárvák tenyésztésére való alkalmasságáról. Nehézfémek (pl. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), főbb anionok és kationok (pl. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), növényvédő szerek, összes szerves szén és szuszpendált szilárd anyag mérését el kell végezni a vizsgálat megkezdése előtt és/vagy például félélénte, amennyiben a hígítóvíz ismerten viszonylag állandó minőségű. Az elfogadható minőségű hígítóvíz néhány kémiai tulajdonságának felsorolása a 2. függelékben található.

A vizsgálati víz jodidkoncentrációja

17. Annak érdekében, hogy a pajzsmirigy pajzsmirigyhormonok szintetizálásával biztosítani tudja a normál átalakulást, elegendő jodidnak kell elérhetőnek lennie a lárvák számára a vízben és a táplálékforrásokban. A megfelelő fejlődést biztosító minimális jodidkoncentráció tekintetében jelenleg sem a táplálékra, sem a vízre vonatkozólag nem állnak rendelkezésre empirikus iránymutatások. A jodid elérhetősége hatással lehet a pajzsmirigynek a pajzsmirigyre ható anyagokkal szembeni válaszkészségére, és ismert az is, hogy a jodid módosítja a pajzsmirigy alapaktivitását, amit figyelembe kell venni a pajzsmirigy kórszövettani eredményeinek értelmezésénél. A korábbi munkák alapján a vizsgálat bizonyítottan jól működik, ha a hígítóvíz jodid- (I^-) koncentrációja 0,5 és 10 $\mu\text{g/l}$ között van. Ideális esetben a vizsgálat teljes időtartama alatt a hígítóvíz (nátrium vagy kálium só formájában hozzáadott) jodidkoncentrációja legalább 0,5 $\mu\text{g/l}$. Ha a vizsgálati víz ioncserélt vízből mesterségesen készített víz, legalább 0,5 $\mu\text{g/l}$ koncentrációban jódot kell hozzáadni. A vizsgálati jegyzőkönyvbe bele kell foglalni a vizsgálati víz (a hígítóvíz) mért jodidkoncentrációját, valamint azt, ha adott esetben a vizsgálati vizet jóddal vagy más sóval egészítették ki. Nem csak a vizsgálati víz, hanem a táplálék jódtartalma is mérhető.

Expozíciós rendszer

18. A vizsgálatot átfolyósos hígítórendszer használatával dolgozták ki. A rendszer vízzel érintkező elemeinek üvegből, rozsdamentes acélból és/vagy más kémiaiilag semleges anyagból kell készülnie. Expozíciós tartályként üvegből vagy rozsdamentes acélból készült akváriumot kell használni, 4,0 és 10,0 liter közötti hasznos tartálytérfogattal (10–15 cm minimális vízmélységgel). A rendszernek képesnek kell lennie valamennyi expozíciós koncentráció, a kontroll és szükség esetén az oldószeres kontroll számára megfelelő feltételeket biztosítani, kezelésenként négy, kontrollonként nyolc ismétlésben. Az egyes tartályok áramlási sebességének állandónak kell lennie a biológiai feltételek, valamint a vegyi anyaggal történő expozíció fenntartása érdekében. Az áramlási sebességet ajánlatos úgy meghatározni (pl. naponta legalább 5 vízforgatás), hogy a vegyi anyag koncentrációja ne csökkenhessen a vizsgált élőlények és az akváriumban jelen lévő vízi mikroorganizmusok metabolikus aktivitása, abiotikus lebomlási utak (hidrolízis, fotolízis) vagy távozás (elillanás, szorpció) miatt. Az expozíciós rendszeren belül a kezelési tartályokat véletlenszerűen kell egy-egy térbeli pozícióhoz rendelni, hogy csökkenteni lehessen a pozícióból fakadó lehetséges hatásokat, köztük a hőmérséklet, a fényerő stb. enyhe eltéréseit. Az átfolyósos expozíciós rendszerek felállítására vonatkozó további információkért olvassa el az ASTM „Vizsgálati anyagok akut toxicitási vizsgálata halakon, makroszkopikus gerincteleneken és kétéltűeken” című standard útmutatóját (16).

A vegyi anyag bejuttatása: a vizsgálati oldatok elkészítése

19. A vizsgálati oldatok expozíciós rendszerbe juttatásához a vizsgálati vegyi anyag törzsoldatát megfelelő szivattyúval vagy más készülékkel adagolják az expozíciós rendszerbe. Az expozíciót megelőzően a törzsoldat áramlási sebességét a vizsgálati oldatok analitikus módszerrel való megerősítésével összhangban kalibrálják, az áramlási mennyiséget pedig a vizsgálat során rendszeresen ellenőrzik. Az egyes kamrákba juttatott vizsgálati oldatot legalább napi 5 térfogatcsere révén megújítják.
20. A vizsgálati vegyi anyag rendszerbe történő bejuttatására alkalmazott módszer a vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságaitól függően változhat. Ezért a vizsgálat megkezdése előtt be kell gyűjteni a vegyi anyagra vonatkozó, a vizsgálhatóság meghatározása szempontjából releváns alapinformációkat. Az vizsgálati vegyi anyag tulajdonságaival kapcsolatos hasznos információk többek között a szerkezeti képlet, a molekulatömeg, a tisztaság, a vízben és a fény hatására tanúsított stabilitás, a pK_a és a K_{ow} , a vízdékonyság (lehetőleg a vizsgálati közegben), a gőznyomás, továbbá az azonnali biológiai lebonthatóságra irányuló vizsgálat eredményei (C.4. vizsgálati módszer (17) vagy C.29. vizsgálati módszer (18)). A vízdékonyságból és a gőznyomásból meghatározható a Henry-állandó, amely megmutatja, hogy előfordulhat-e a vizsgálati vegyi anyag párolgás miatt eltávozása. Alaposan mérlegelni kell, hogy a fenti információk hiányában elvégezhető-e a vizsgálat, mivel a vizsgálat kialakítása függ a vizsgálati vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságaitól, így ezen adatok nélkül a vizsgálat eredménye nehezen értelmezhető vagy semmitmondó lehet. Olyan megbízható analitikai módszerrel kell rendelkezni a vizsgálati oldatokban lévő vizsgálati vegyi anyag számszerűsítésére, amelynek pontossága és érzékelési határa ismert és dokumentált. A vízben oldódó vizsgálati vegyi anyagokat fel lehet oldani a hígítóvíz alikvot részeiben olyan koncentrációban, amely lehetővé teszi a vegyi anyag kívánt vizsgálati koncentrációban történő bejuttatását az átfolyósos rendszerbe. A szobahőmérsékleten folyékony vagy szilárd és vízben közepesen oldódó vegyi anyagokat folyadék:folyadék vagy folyadék:szilárd telítési módszerek (pl. üveggyapot oszlopszaturátorok) használatával lehet bejuttatni (19). Bár a táplálékon keresztül elvileg a nagymértékben víztaszító vegyi anyagok adagolása is megoldható, csekély tapasztalat áll rendelkezésre ennek az expozíciós útnak e vizsgálat keretében való alkalmazásáról.
21. A kiválasztott koncentrációjú vizsgálati oldatok a törzsoldat hígításával készíthetők el. A törzsoldatot lehetőleg a vizsgálati vegyi anyagnak a hígítóvízbe, mechanikai eszközök (pl. keverő és/vagy ultrahang) segítségével történő bekeverésével vagy megmozgatásával kell elkészíteni. Telítési oszlopok/rendszerek vagy passzív adagolási módszerek (20) is alkalmazhatók a megfelelő koncentrációjú törzsoldat elkészítéséhez. Előnyben kell részesíteni a hordozómentes vizsgálati rendszereket; a különböző vizsgálati vegyi anyagok

azonban változatos fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek, ami valószínűleg eltérő megközelítést igényel a vegyi anyagoknak való expozíciót szolgáló víz elkészítése során. Minden erőfeszítést meg kell tenni az oldószerek vagy hordozók elkerülése érdekében, mivel: (1) bizonyos oldószerek maguk is toxicitást és/vagy nem kívánatos vagy nem várt válaszokat idézhetnek elő, (2) a vegyi anyagoknak a vízzoldhatóságuk határán túli vizsgálata (ami gyakran előfordul oldószerek használata esetén) a hatásos koncentráció pontatlan meghatározását eredményezheti, és (3) hosszabb távú vizsgálatok során az oldószerek használata jelentős mértékű „biofilmképződést” eredményezhet, amely mikrobiális tevékenységgel jár együtt, ami befolyásolhatja a környezeti feltételeket és a vizsgált koncentrációk fenntartásának képességét, valamint (4) oldószer használata esetén olyan dokumentált adatok hiányában, amelyek igazolják, hogy az oldószer nem befolyásolja a vizsgálat kimenetelét, oldószeres kontrollként szolgáló kezelést kell végezni, aminek jelentős állatjóléti következményei vannak, mivel a vizsgálat lefolytatása további állatok bevonását igényli. A nehezen vizsgálható vegyi anyagoknál legvégső esetben oldószert lehet alkalmazni, és a legjobb módszer meghatározása érdekében tanulmányozni kell „A nehezen vizsgálható anyagok és keverékek vízi toxikológiai vizsgálata” című OECD-iránymutatást (21). A megfelelő oldószert a vizsgálati vegyi anyag kémiai tulajdonságai és az oldószer használatára vonatkozó dokumentált kontrolladatok rendelkezésre állása határozzák meg. Dokumentált adatok hiányában az oldószer megfelelőségét a végleges vizsgálat lefolytatása előtt meg kell határozni. Amennyiben elkerülhetetlen az oldószer használata, és mikrobiális tevékenység (biofilmképződés) figyelhető meg, ajánlatos a vizsgálat során (legalább hetente) feljegyezni/jelentésbe foglalni a tartályonkénti biofilmképződést. Ideális esetben az oldószer koncentrációját állandó értéken tartják az oldószeres kontroll és a vizsgálati vegyi anyaggal történő minden kezelés során. Amennyiben az oldószer koncentrációját nem tartják állandó értéken, az oldószeres kontrollban a vizsgálati kezelés során alkalmazott legmagasabb oldószer-koncentrációt kell vizsgálni. Oldószerhordozó használata esetén az oldószer legmagasabb koncentrációja nem haladhatja meg a 100 µl/l vagy 100 mg/l értéket (21), és az oldószer koncentrációját a lehető legalacsonyabb szinten (pl. 20 µl/l alatt) javasolt tartani annak érdekében, hogy elkerülhetők legyenek az oldószer esetleges hatásai a mért végpontokra (22).

Kísérlethez felhasznált állatok

A vizsgálathoz használt fajok

22. A vizsgálatban alkalmazott faj az *X. laevis*, mert: (1) világszerte rutinszerűen tenyésztik a laboratóriumokban, (2) könnyen beszerezhető kereskedelmi forgalomban is és (3) genetikai ivara meghatározható.

A felnőtt állatok gondozása és tenyésztése

23. Az *X. laevis* megfelelő gondozásáról és tenyésztéséről egy szabványosított iránymutatás nyújt tájékoztatást (23). Az *X. laevis* tartását és gondozását Read is ismerteti (24). A párosodás kiváltása érdekében három–öt felnőtt nőtény és hím pár hasüregébe humán koriogonadotropint (hCG-t) fecskendeznek be. A nőtény példányokba körülbelül 800–1000 NE, a hím példányokba körülbelül 500–800 NE 0,6–0,9 %-os sóoldatban (vagy béka Ringer-oldatban, egy kétéltűekkel való használatra kifejlesztett izotóniás sóoldatban; www.hermes.mbl.edu/biologicalbulletin/compendium/comp-RGR.html) feloldott hCG-t injektálnak. A befecskendezett térfogatnak megközelítőleg 10 µl/g testtömegarányúnak kell lennie (~1000 µl). Ezt követően az indukált tenyészpárokat az amplexus elősegítése érdekében nagy tartályokban, zavartalan, statikus körülmények között tartják. A tenyésztőtartályok alján (pl. 1,25 cm-es nyílásokkal rendelkező) rozsdamentes acél hálóból készült álfeneknek kell lennie, amely lehetővé teszi, hogy a peték a tartály aljára essenek. A késő délután hCG-vel beinjektált békák a petéik többségét általában a következő nap délelőttjére rakják le. Miután elegendő mennyiségű petét raktak le és termékenyítettek meg, a felnőtt példányokat el kell távolítani a tenyésztőtartályokból. Ezután begyűjtik a petéket, a kocsonyás bevonatot pedig L-ciszteinnel végzett kezeléssel eltávolítják (23). Elkészítenek egy 2 %-os L-cisztein oldatot, a pH-t 1 M NaOH hozzáadásával 8,1 értékre állítják be. Ezt a 21 °C-os oldatot beleöntik egy 500 ml-es, egy ívásból származó petéket tartalmazó Erlenmeyer-lombikba, egy-két percen keresztül óvatosan kavargatják, majd 21 °C-os tenyésztővízben 6–8 alkalommal alaposan átöblítik. Ezt követően a petéket áthelyezik egy kristályosító csészébe, majd megállapítják, hogy az életképesség meghaladja-e a 70 %-ot, és a sejtosztódás fázisában lévő embriók minimális rendellenességet mutatnak-e.

VIZSGÁLATI TERV

Vizsgálati koncentrációk

24. A vegyi anyagot ajánlatos legalább négy koncentrációban vizsgálni a megfelelő kontrollokkal együtt (szükség esetén oldószeres kontrollokkal). A koncentrációk közötti távolság meghatározásához általában ajánlatos legfeljebb 3,2-es osztótényezőt használni.
25. A kétéltűekre vonatkozó korábbi vizsgálatok eredményeit a lehetőségekhez mérten fel kell használni a vizsgálatban alkalmazandó legmagasabb vizsgált koncentráció meghatározásához, hogy elkerülhető legyen a nyilvánvalóan toxikus koncentrációk használata. E legmagasabb koncentráció megállapításához hozzájárulhatnak például a meglévő kétéltűvizsgálatokból, úgymint a C.38. vizsgálati módszerből, vagyis a kétéltű-átalakulási vizsgálatból (25), a *Xenopus* fajt alkalmazó békaembrió teratogenezis

vizsgálatból (23) és/vagy a halakon végzett vizsgálatokból – például a C.48., C.41. és C.49. vizsgálati módszerből (26) (27) (28) – származó mennyiségi szerkezetaktivitási összefüggések, kereszthivatkozások és adatok. A LAGDA lefolytatása előtt végezhető dózisbehatároló kísérlet. A dóziskereső kísérletben a kezelést ajánlatos a megtermékenyítést követő 24 órán belül elkezdni és 7–14 napon keresztül (vagy szükség esetén még tovább) folytatni, a vizsgálati koncentrációkat pedig úgy kell megállapítani, hogy a köztük lévő távolságot legfeljebb 10-es tényezővel határozzák meg. A dózisbehatároló kísérlet eredményei alapján kell meghatározni a LAGDA során alkalmazott legmagasabb vizsgálati koncentrációt. Amennyiben a vizsgálat során oldószert kell használni, az oldószert megfelelőségét (vagyis hogy hatással van-e a vizsgálat kimenetelére) meg lehet határozni a dózisbehatároló vizsgálat részeként.

Vizsgálati csoportok és kontrollok ismételései

26. Vizsgálati koncentrációnként legalább négy tartályt (ismétlést), a kontrollhoz (és szükség esetén az oldószeres kontrollhoz) pedig legalább nyolc ismétlést kell használni (vagyis a megfelelő statisztikai erő biztosítása érdekében a kontrollnak és az esetleges oldószeres kontrollnak kétszer annyi ismétlést kell tartalmaznia, mint az egyes kezelt csoportoknak). Az egyes ismétlések legfeljebb 20 állatot tartalmazhatnak. A vizsgálat állatok minimális száma 15 (az NF szerinti 62. stádiumban végzett részmintavétel során 5 a növényedek esetében 10). Mivel számolni kell az esetleges mortalitással, minden ismétléshez további állatokat adnak hozzá, miközben fenntartják a kritikus egyedszámot, azaz 15 egyedet.

ELJÁRÁS

A vizsgálat áttekintése

27. A vizsgálatot újszülött (az NF szerinti 8–10. stádiumban lévő) embriókkal kezdik meg és a növényedekkor fejlődésig folytatják. Az állatokat naponta ellenőrzik, hogy felmérjék a mortalitást és a rendellenes viselkedés jeleit. Az NF szerinti 62. stádiumban a lárvák egy részmintáját (ismétlésenként legfeljebb 5 állat) begyűjtik, és megvizsgálják a különböző végpontokat (1. táblázat). Miután az összes állat elérte az NF szerinti 66. stádiumot, vagyis lezárult az átalakulási fázis (illetve a vizsgálat kezdetétől számított 70. nap után, amelyik előbb bekövetkezik), véletlenszerű selejtezéssel (részmintavétel nélkül) az állatok számát tartályonként 10-re csökkentik (lásd a 43. pontot), a fennmaradó állatokat pedig tovább kezelik a kontroll NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges átlagos időtartamát követő 10 hétig. A vizsgálat végén a növényedek mintáján további méréseket végeznek (1. táblázat).

Expozíciós körülmények

28. A vizsgálati paraméterek teljes összefoglalása a 3. függelékben található. Az expozíciós időszak alatt naponta mérni kell a vizsgálati oldatok oldottoxigén-koncentrációját, hőmérsékletét és pH-értékét. Az oldatok vezetőképességét, lúgosságát és keménységét havonta mérik. A vizsgálati oldatok vízhőmérsékletét illetően az ismétlések és a kezelések közötti (egy napon belüli) különbség nem haladhatja meg az 1,0 °C-ot. A vizsgálati oldatok pH-értéke tekintetében az ismétlések és a kezelések közötti különbség nem haladhatja meg a 0,5-öt.
29. Az el nem fogyasztott táplálék és az ürülék eltávolítása érdekében az expozíciós tartályokat naponta lehet szifonnal tisztítani, ügyelve a tartályok közötti keresztszennyeződés elkerülésére. Gondoskodni kell róla, hogy az állatokat a lehető legkisebb stressz és trauma érje, különösen az akváriumok mozgatása és takarítása, valamint az állatok kezelése közben. Kerülni kell a stresszhatást kiváltó körülményeket/tevékenységeket, mint például a hangos és/vagy szakadatlan zajt, az akváriumok kopogtatását és a tartályokban okozott rezgést.

A vizsgálati vegyi anyagnak való kezelés időtartama

30. A kezelést újszülött (az NF szerinti 8–10. stádiumban lévő) embriókkal kezdik meg és a kontrollcsoportban az NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges átlagos időtartamot (a vizsgálat kezdetétől számítva legfeljebb 45 nap) követő 10 hétig folytatják. A LAGDA időtartama általában 16 hét (legfeljebb 17 hét).

A vizsgálat elindítása

31. A vizsgálat elindításához olyan szülőket kell használni, amelyekről korábban kimutatták, hogy az utódaik genetikai ivara meghatározható (5. függelék). A felnőttek ivását követően begyűjtik az embriókat, kocsonyás bevonatuk eltávolítása érdekében ciszteinnel kezelik őket, majd egy szűrővizsgálat keretében meghatározzák életképességüket (23). A ciszteines kezelésre azért van szükség, hogy a szűrővizsgálat során az embriók ne ragadjanak hozzá a különböző felületekhez. A szűrővizsgálatot preparálómikroszkóp alatt végzik, megfelelő méretű szemcseppentővel eltávolítva a nem életképes embriókat. Lehetőség szerint egyetlen, 70 %-nál nagyobb életképességet mutató ivásból származó egyedeket használnak a vizsgálatához. Az NF szerinti 8–10. stádiumban lévő embriókat véletlenszerűen szétosztják a megfelelő mennyiségű hígítóvízzel feltöltött expozíciós kezelési tartályok között, úgy, hogy minden egyes tartály 20 embriókat tartalmazzon. Az embriókat az áthelyezés során óvatosan kell kezelni a kezeléssel járó stressz minimalizálása és a sérülések elkerülése érdekében. A megtermékenyítés utáni 96. órára az ebihalaknak már keresztül kellett jutniuk a vízoszlopon és el kellett kezdeniük feltapadni a tartály oldalára.

Etetési rend

32. A LAGDA protokoll fontos része a táplálék és a táplálékmennyiség változtatása az *X. laevis* különböző életszakaszai során. A lárva fázis során a táplálék túladagolása jellemzően megnöveli a gerincferdülés (scoliosis) gyakoriságát és súlyosságát (8. függelék), amit kerülni kell. Ezzel szemben a lárva fázis során az elégtelen mennyiségű táplálék rendkívül eltérő fejlődési ütemet eredményez a kontrollok között, ami csökkentheti a statisztikai erőt vagy zavarhatja a vizsgálati eredményeket. A 4. függelék tájékoztatást nyújt az átfolyásos körülmények között nevelt *X. laevis* lárvák és növényedékek ajánlott táplálékáról és etetési rendjéről, alternatív megoldások is alkalmazhatók, amennyiben biztosítják a vizsgálati élőlények kielégítő növekedését és fejlődését. Fontos megjegyezni, hogy az endokrin rendszerrel kapcsolatos végpontok mérése esetén a tápláléknak nem szabad az endokrin rendszerre ható anyagokat, például szójalisztet tartalmaznia.

A lárvák etetése

33. A lárvák ajánlott tápláléka tenyésztővízzel (vagy hígítóvízzel) összekevert ivadékindító pisztrángtápból, *Spirulina* algakorongokból és pehely formájú aranyhaltápból (pl. TetraFin[®] pelyhek, Tetra, Németország) tevődik össze. Ezt a keveréket hétköznap napi három alkalommal, hétvégén naponta egyszer adagolják az állatoknak. Az ebihalakat a megtermékenyítés utáni 8. naptól kezdve etetik élő *Artemia* sórakkal, vagyis 24 órás naupliusszal is, munkanapokon naponta kétszer, hétvégén naponta egyszer. A lárvák etetésének, amelyet minden vizsgálati edényben azonos módon kell elvégezni, lehetővé kell tennie a vizsgált állatok megfelelő növekedését és fejlődését, biztosítva ezáltal a vizsgálat eredményeinek reprodukálhatóságát és átvihetőségét: (1) a kontrolloknál az NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges átlagos időtartam legfeljebb 45 nap lehet, és (2) a kontrolloknál az NF szerinti 62. stádiumban az átlagos testtömegnek ajánlatos az $1,0 \pm 0,2$ g tartományban lennie.

A növényedékek etetése

34. Az átalakulási fázis lezárultát követően a táplálék prémium minőségű süllyedő békátápból áll, például Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, FL, USA) (4. függelék). A békaporontyok (fiatal növényedékek) számára a pelleték méretét csökkenteni kell, ehhez rövid ideig kávédarálóban vagy turmixgépben őrlik, illetve mozsárban mozsártörővel apróra zúzzák a pelleteket. Amint a növényedékek megfelelő méretűre nőnek ahhoz, hogy el tudják fogyasztani az egész pelleteket, nincs többé szükség azok őrlésére vagy apróra zúzására. Az állatokat naponta egyszer kell táplálni. A növényedékek etetésének biztosítani kell az élőlények megfelelő növekedését és fejlődését: a vizsgálat végén a kontrollnövényedékek átlagos testtömegének ajánlatos a $11,5 \pm 3$ g tartományban lennie.

Analitikai kémia

35. A vizsgálat megkezdése előtt például a meglévő információk és ismeretek alapján meg kell határozni a vizsgálati vegyi anyag stabilitását (pl. oldhatóságát, lebonthatóságát és illékonyágát), valamint az összes elemzési módszert. Amennyiben az adagolás hígítóvízben történik, a rendszer működésének ellenőrzése céljából javasolt az egyes vizsgálati koncentrációkat tartalmazó tartályokba (ismétlésekbe) helyezett vizsgálati oldatokat a vizsgálat kezdete előtt analizálni. Az expozíciós időszak során a vizsgálati vegyi anyag koncentrációit megfelelő időközönként – lehetőleg minden heten – meghatározzák az egyes kezelt csoportok egyik tartályában, az adott kezelt csoporton belül minden héten másik tartályt vizsgálva. Az eredményeket célszerű a ténylegesen mért koncentrációértékekre alapozni. Amennyiben azonban az oldatban lévő vizsgálati vegyi anyag koncentrációját sikerült a vizsgálatok során mindvégig a névleges koncentráció $\pm 20\%$ -os tartományán belül tartani, akkor az eredményeket a névleges vagy a mért értékekre is lehet alapozni. Emellett a vizsgálat teljes időtartama alatt az egy kezelésen belül mért vizsgálati koncentrációk variációs koefficiense (CV) minden koncentrációban legfeljebb 20% lehet. Amennyiben a mért koncentrációértékek nem maradnak a névleges koncentrációértékek $80\text{--}120\%$ -án belül (például biológiaiag nagyon könnyen lebontható vagy nagymértékben abszorbeáló vegyi anyagok esetében), a hatásos koncentrációkat átfolyásos vizsgálatok esetében a számtani átlaghoz viszonyítva kell meghatározni és kifejezni.
36. A hígítóvíz és a törzsoldat áramlási sebességét az expozíciós időszak alatt mindvégig megfelelő időközönként (pl. hetente háromszor) ellenőrizni kell. Olyan vegyi anyagok esetében, amelyeket néhány vagy egyetlen névleges koncentrációban sem lehet kimutatni (például mert gyorsan lebomlanak vagy abszorbeáló a vizsgálati edényekben, vagy mert jelentős részben felhalmozódnak a kezelt állatok szervezetében), javasolt a kísérleti oldat megújítási arányát minden kamrában úgy meghatározni, hogy a vizsgálati koncentrációk a lehető legállandóbbak legyenek.

Megfigyelések és végpontmérések

37. A kezelés során értékelt végpontok közé tartoznak a toxicitást jelző végpontok, azon belül a mortalitás, a rendellenes viselkedés, úgy mint a betegség és/vagy az általános toxicitás klinikai tünetei és a növekedést meghatározó tényezők (testhossz és testtömeg), valamint azok a patológiás végpontok, amelyek egyaránt reagálhatnak az általános toxicitásra és az ösztrogén, az androgén vagy a pajzsmirigy által közvetített útvonalakat célzó endokrin hatásmechanizmusokra. Emellett a vizsgálat végén igény szerint mérhető a vérplazma VTG-koncentrációja. A VTG mérése hozzájárulhat a vizsgálati eredményeknek az endokrin rendszert feltehetően zavaró anyagok endokrin mechanizmusaival

összefüggésben történő értelmezéséhez. A végpontokat és mérésük ütemtervét az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat: A LAGDA végpontjainak áttekintése

Végpontok*	Naponta	Közbenső mintavétel (lárvák mintái)	Vizsgálat vége (növényedékek mintái)
Mortalitás és rendellenességek	X		
Az NF szerinti 62. stádiumig eltelt idő		X	
(Kór)szövetten (pajzsmirigy)		X	
Morfometria (testtömeg és testhossz növekedése)		X	X
Hepato-szomatikus index (LSI)			X
Genetikai/fenotípusos ivararány			X
Kórszövetten (ivarmirigyek, reprodukció vezetői, vese és máj)			X
Vitellogenin (VTG) (választható)			X

* Az összes végpontot statisztikailag elemzik.

Mortalitás és napi megfigyelések

38. Naponta ellenőrizni kell, hogy a vizsgálati tartályokban vannak-e elpusztult állatok, és a mortalitást minden tartály esetében fel kell jegyezni. Az elhullott állatokat észrevételüket követően azonnal el kell távolítani a vizsgálati tartályból. Az elhullott állatok fejlődési stádiumát a következők szerint kell kategorizálni: NF szerinti 58. stádium előtt (mellső végtagok megjelenése előtti időszak), NF szerinti 58.–NF szerinti 62. stádium, NF szerinti 63.–NF szerinti 66. stádium (az NF szerinti 62. stádium és a farok teljes felszívódása közötti időszak) és NF szerinti 66. stádium után (lárvakor utáni időszak). A 20 %-ot meghaladó mortalitási arány egyaránt jelezhet nem megfelelő vizsgálati körülményeket vagy a vizsgálati vegyi anyag nyilvánvaló toxikus hatását. Az állatok általában az ívást követő fejlődési szakasz első néhány napján és az átalakulás tetőpontján a legérzékenyebbek a nem vegyi anyagok által kiváltott, mortalitást okozó eseményekre. Az ilyen jellegű mortalitást kitűnik a kontrolladatokról.
39. Ezenfelül fel kell jegyezni a megfigyelt abnormális viselkedést, szabad szemmel látható fejlődési rendellenességeket (pl. a gerincferdülést) vagy léziókat. A gerincferdüléssel eseteket meg kell számlálni (gyakoriság) és súlyosság szerint osztályozni kell (pl. nem észrevehető – NR, enyhe – 1, mérsékelt – 2, súlyos – 3; 8. függelék). A vizsgálat teljes időszaka alatt erőfeszítéseket kell tenni annak érdekében, hogy korlátozzák (pl. a

kontrollokban 10 % alá szorítsák) a mérsékelt és a súlyos gerincferdülés előfordulását, ugyanakkor a kontrollcsoportban megfigyelt rendellenességek gyakoribb előfordulása nem feltétlenül ad okot a vizsgálat leállítására. A lárva fázisban lévő állatok normális viselkedését a következők jellemzik: az állatok a vízoszlopban lebegnek, farkuk a fejük fölé emelkedik, a farokúszójuk egyenletesen, ritmikusan mozog, időszakonként a felszínre emelkednek, a kopolyúfedőjük mozog, és reagálnak az ingerekre. Kóros viselkedés például ha az állat a víz felszínén lebeg, a tartály alján fekszik, fordítva vagy szabálytalanul úszik, nem emelkedik fel a felszínre, vagy nem reagál az ingerekre. Az átalakulási fázison átesett állatok esetében a fenti rendellenes viselkedések mellett fel kell jegyezni a táplálékfogyasztásban a kezelések között mutatkozó jelentős eltéréseket is. A jelentős fejlődési rendellenességek és elváltozások közé tartoznak többek között a morfológiai rendellenességek (pl. végtagdeformitások), a haemorrhagiás léziók, a hasi ödéma és a bakteriális vagy gombás fertőzések. A növendékek fején, az orrlyukak hátulsó részén látható léziók elégtelen páratartalomra utalhatnak. Ezek minőségi megállapítások, amelyeket a betegségek vagy stressz okozta klinikai tünetekhez hasonlóan kell mérlegelni, és a kontrollállatokkal összehasonlításban kell megtenni. Ha a rendellenességek előfordulási aránya nagyobb az expozíciós tartályokban, mint a kontrollokban, akkor ezt a nyilvánvaló toxicitás bizonyítékának kell tekinteni.

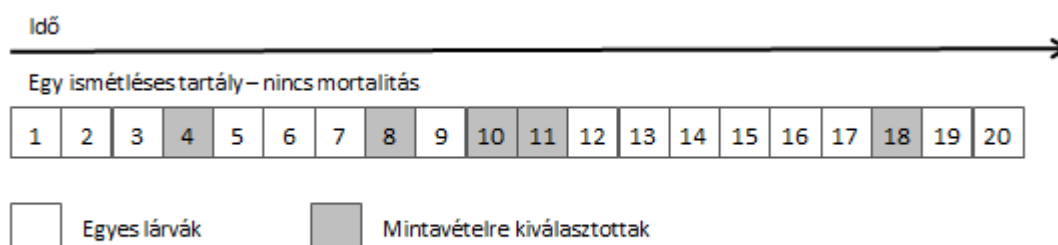
Részmintavétel lárva szakaszban

A lárva szakaszban végzett részmintavétel sémája:

40. Az NF szerinti 62. stádiumot elért ebihalakat eltávolítják a tartályokból, és vagy felhasználják őket a mintavételhez, vagy a kezelés következő szakaszában való részvételhez új tartályba helyezik, illetve egy elválasztó segítségével ugyanazon tartályon belül fizikailag elkülönítik a többi ebihaltól. Az ebihalakat naponta ellenőrzik, és feljegyzik a vizsgálat azon napját, amelyen az egyes ebihalak elérték az NF szerinti 62. stádiumot. Ezt az időpontot a fej alakja alapján határozzák meg. Amint a fej mérete oly mértékben csökkent, hogy szemmel láthatóan körülbelül ugyanolyan széles, mint az ebihal törzse, és a mellső végtagok a szív középső részével egy vonalban helyezkednek el, az egyedek úgy tekinthetők, hogy elérték az NF szerinti 62. stádiumot.
41. Arra kell törekedni, hogy tartályonként (ismétlésenként) összesen öt NF szerinti 62. stádiumban lévő ebihaltól vegyenek mintákat. A mintavételt véletlenszerűen kell végrehajtani, viszont előre ki kell jelölni az ebihalakat. Egy adott tartályban végzett mintavétel elméleti példája látható az **1. ábrán**. Amennyiben valamely tartály 20 túlélő ebihalt tartalmaz abban az időpontban, amikor az első egyed eléri az NF szerinti 62. stádiumot, véletlenszerűen meg kell határozni 5 egy és húsz közé eső számot. Az 1. ebihal

az első egyed, amelyik elérte az NF szerinti 62. stádiumot, a 20. ebihal pedig az az egyed, amelyik a tartályban utolsóként érte el az NF szerinti 62. stádiumot. Hasonlóképpen, ha 18 túlélő lárva van egy adott tartályban, akkor véletlenszerűen meg kell határozni 5 egy és tizenhét közé eső számot. Ezt a műveletet minden egyes tartály esetén el kell végezni, amikor az első vizsgált egyed eléri az NF szerinti 62. stádiumot. Amennyiben az NF szerinti 62. stádiumban zajló mintavétel során hullanak el egyedek, a maradék minták pozícióját véletlenszerűen meg kell változtatni attól függően, hogy hány lárva nem érte még el az NF szerinti 62. stádiumot és még hány mintára van szükség az adott ismétlés összesen öt mintájának eléréséhez. Azon a napon, amikor egy ebihal eléri az NF szerinti 62. stádiumot, az elkészített mintavételi terv alapján meg kell határozni, hogy a szóban forgó egyed fel kell használni a mintavételhez, vagy a további kezelés céljából fizikailag el kell különíteni a többi ebihaltól. Az 1. ábrán szereplő példa alapján az NF szerinti 62. stádiumot elsőként elért egyed (amelyet az 1. mező jelez) fizikailag elkülönítik a többi lárvától, hogy továbbra is részt vegyen a kezelésben, és feljegyzik a vizsgálat azon napját, amikor elérte az NF szerinti 62. stádiumot. Ezt követően (ugyanezen példa alapján) a 2. és a 3. számú egyeddel hasonlóképpen járnak el, mint az 1. számúval, majd a 4. számú egyed kiválasztják mintavételre, hogy megvizsgálják növekedését és pajzsmirigy szöveteit. Ezt az eljárást addig folytatják, amíg a 20. egyed be nem sorolják az NF szerinti 62. stádiumot elért többi egyed vagy a mintavételhez használt egyedek közé. Az alkalmazott véletlenszerű eljárásnak biztosítania kell, hogy minden vizsgálatban részt vevő szervezet egyenlő valószínűséggel legyen kiválasztható. Ez bármely randomizálási eljárással elérhető, feltéve, hogy az NF szerinti 62. stádium részmintavételi időszaka során hálónba fogják az összes ebihalat.

1. ábra: Az NF szerinti 62. stádiumban végzett mintavételi eljárás egy tartályra vonatkozó elméleti példája.



42. A lárva szakaszban zajló részmintavétel során a következő végpontokat értékelik: (1) az NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges idő (azaz a megtermékenyítés és az NF

szerinti 62. stádium elérése között eltelt napok száma), (2) külső rendellenességek, (3) morfometria (pl. testtömeg és testhossz) és (4) pajzsmirigy szövettan.

Az ebihalak humánus elpusztítása

43. Az NF szerinti 62. stádiumban lévő ebihalak részmintáját (ismétlésenként 5 egyed) el kell altatni, úgy, hogy 30 percre megfelelő mennyiségű (pl. 500 ml) érzéstelenítő oldatba (pl. 0,3 %-os MS-222 oldat, trikain-metán-szulfonát, CAS-száma: 886-86-2) merítik őket. Az MS-222 oldatot nátrium-hidrogénkarbonáttal pufferelni kell, hogy az oldat pH-értéke körülbelül 7,0 legyen, mert a nem pufferelt MS-222 oldat savassága irritálja a béka bőrét, ami gyenge abszorbanciához vezet, az pedig az élőlényeket szükségtelen további stressznek teszi ki.
44. A vizsgálati kamrából merítőhálózattal eltávolítanak egy ebihalat, és áthelyezik a végleges elaltatást biztosító oldatba. Az állat akkor kerül megfelelően elaltatott és boncolásra kész állapotba, amikor nem reagál az olyan külső ingerekre, mint hátsó végtagjának fogóval való megfogása.

Morfometria (testtömeg és testhossz)

45. A nedves tömeget (a legközelebbi mg-ra kerekítve) és a farok nélküli testhosszt (a legközelebbi 0,1 mm-re kerekítve) minden ebihal esetében közvetlenül azután kell mérni, hogy az állat az altatás következtében elveszti reakcióképességét (2a. ábra). A farok nélküli testhossz mérhető fénykép alapján is, képelemző szoftver használatával. Az ebihalakról a mérés előtt szárazra itatással el kell távolítani a rájuk tapadt felesleges vizet. A testméret (testsúly és farok nélküli testhossz) meghatározását követően fel kell jegyezni az esetleges jelentős morfológiai rendellenességeket és/vagy a toxicitás klinikai tüneteit, például a gerincferdülést (lásd a 8. függelék), a petechiákat és a vérzést, digitális fénykép készítése ajánlott. A petechiák a véredényekből származó apró vörös vagy lila vérömlenyek.

A szövetek gyűjtése és fixálása

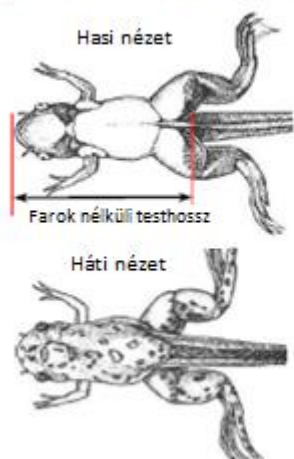
46. A lárva szakaszban zajló részmintavétel során értékelik a pajzsmirigy szöveteket. A törzs alsó, mellső végtagok mögötti részét eltávolítják. A csonkolt testet Davidson-féle fixálószerben fixálják. Az edénybe helyezett fixálószer mennyisége legalább 10-szerese legyen a szövetek közelítőleges térfogatának. A vizsgálat tárgyát képező szövetek megfelelő fixálása érdekében a fixálószeret kellő mértékben kevergetni vagy keringetni kell. Az összes szövet legalább 48, legfeljebb 96 órán át Davidson-féle fixálószerben tartják, ezt követően ionmentesített vízben átmossák és 10 %-os semleges pufferelt formalinba helyezik őket (1) (29).

Pajzsmirigy szövetvizsgálata

47. A lárva szakaszból származó mintákon (fixált szöveteken) el kell végezni a pajzsmirigyek szövettani értékelését, vagyis diagnózist kell felállítani és meg kell határozni a súlyossági fokot (29) (30).

2. ábra: A LAGDA során a farok nélküli testhossz méréséhez használt jellemzők az NF szerinti 62. stádiumban a) és a növendék békáknál b). Az NF szerinti 62. stádium megállapításához használt jellemzők a): a fej a törzzsel megegyező szélességű, a szaglóideg hossza rövidebb a szaglógyűrű átmérőjénél (háti nézet), és a mellő végtagok a szívvel egy vonalban helyezkednek el (hasi nézet). A képek Nieuwkoop és Faber (1994) művéből származnak.

a. Részmintavétel lárvakorban (NF szerinti 62.



b. Mintavétel



A lárvák kezelésének vége

48. Az ebihalak kezdeti számát figyelembe véve várhatóan az egyedek egy kisebb hányada nem fog normálisan fejlődni, és észszerű időn belül nem fejezi be az átalakulást (az NF szerinti 66. stádium). A kezelés lárva szakasza nem lépheti túl a 70 napot. Az ezen időszak végéig fennmaradó ebihalakat el kell altatni (lásd a 43. pontot), meg kell mérni nedves tömegüket és farok nélküli testhosszukat, Nieuwkoop és Faber, 1994 leírása szerint meg kell határozni stádiumukat, és fel kell jegyezni esetlegesen tapasztalt fejlődési rendellenességeiket.

Az NF szerinti 66. stádium utáni selejtezés

49. Az NF szerinti 66. stádiumtól (a farok teljes felszívódásától) tartályonként tíz egyed folytatja a vizsgálatot a kezelés végéig. Ezért miután valamennyi állat elérte az NF szerinti 66. stádiumot vagy 70 nap után (amelyik hamarabb bekövetkezik), selejtezést végeznek.

Az NF szerinti 66. stádiumot elért állatok közül véletlenszerűen választják ki azokat, amelyek nem vesznek részt a további kezelésben.

50. Azokat az állatokat, amelyeket nem választják ki a vizsgálatban való további részvételre, elaltatják (lásd a 43. pontot). Minden állat esetében meghatározzák a fejlődési stádiumát, nedves tömegét és fark nélküli testhosszát (2b. ábra), továbbá makroszkópos boncolást végeznek rajtuk. Az ivarmirigy morfológiája alapján megállapított fenotípusos ivart – amely lehet nőstény, hím vagy meghatározhatatlan – feljegyzik.

Mintavétel növendék szakaszban

A növendék szakaszban végzett mintavétel sémája

51. A fennmaradó állatok kezelését folytatják a hígítóvizés kontroll (és/vagy oldószeres kontroll, ha végeztek ilyet) NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges, átlagos időtartamát követő 10 hétig. Az expozíciós időszak végén a fennmaradó állatokat (ismétlésenként legfeljebb 10 békát) elaltatják, majd a különböző végpontokat megméri vagy értékeli és feljegyzik: (1) morfometria (testtömeg és testhossz), (2) fenotípusos/genotípusos ivararányok, (3) a máj tömege (hepato-szomatikus index), (4) kórszövettan (ivarmirigyek, reproduktív vezetékek, máj és vese), valamint opcionálisan (5) a vérplazma VTG-szintje.

A békák humánus elpusztítása

52. A növendék mintákat, az átalakuláson átesett békákat hasüregbe adott érzéstelenítő injekcióval – pl. 10 % MS-222-tartalmú, megfelelő foszfátpuffert tartalmazó oldat – elaltatják. A békákat azután lehet mintavételhez felhasználni, hogy elveszítették reakcióképességüket (általában a befecskendezés után kb. 2 perccel, ha 10 %-os MS-222-t használnak békánként 0,01 ml/g koncentrációban). Bár a növendék békákat be lehetne méríteni egy magasabb koncentrációjú érzéstelenítőbe (MS-222), a tapasztalat azt mutatja, hogy ezzel a módszerrel hosszabb ideig tart az érzéstelenítés, és ez az időtartam nem mindig megfelelő mintavételhez. A befecskendezés hatékony és gyors eutanáziát biztosít a mintavétel előtt. A mintavétel nem kezdhető meg az előtt, hogy ellenőrizték a békák reakcióhiányát, ezáltal biztosítható ugyanis, hogy az állatok ténylegesen halottak legyenek. Ha a békákon jelentős mértékű szenvedésre utaló jelek figyelhetők meg és elhullásközei állapotban vannak (súlyosan szenvednek és az elhullásukat megbízhatóan előre lehet jelezni), az állatokat érzésteleníteni kell és el kell altatni, és adatelemzés szempontjából mortalitásként kell kezelni. A betegség miatt elaltatott békákat fel kell jegyezni és fel kell tüntetni a jegyzőkönyvben. Attól függően, hogy a békákat a vizsgálat mely szakaszában altatják el, a békákon kórszövettani elemzést végezhetnek (a békákat fixálhatják az esetleges kórszövettani elemzéshez).

Morfometria (testtömeg és testhossz)

53. A nedves tömeget és farok nélküli testhosszt (2b. ábra) a lárva szakaszban zajló részmintavétellel azonos módon mérik.

A vérplazma VTG-szintje (választható)

54. A VTG egy széles körben elfogadott biomarker, amely ösztrogénhatású vegyi anyagokkal szembeni kitettség következtében jelenik meg. A LAGDA során a vérplazma VTG-szintje a növedék mintákban igény szerint mérhető (ez különösen a gyaníthatóan ösztrogén vizsgálati vegyi anyagok esetében lehet releváns).
55. Az elaltatott növedék hátsó végtagjait lemetszik, és a vért heparinnal kezelt kapilláriscsővel felfogják (bár alkalmasak lehetnek más vérvételi módszerek is, például a szívpunkció). A vért mikrocentrifuga csőbe töltik (pl. 1,5 ml mennyiségben) és a vérplazma kinyeréséhez centrifugálják. A plazmamintákat a VTG-szint megállapításáig – 70 °C-on vagy alacsonyabb hőmérsékleten tárolják. A vérplazma VTG-koncentrációja mérhető enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálati (ELISA) eljárással (6. függelék) vagy egy alternatív módszerrel, például tömegspektrometriával (31). A nagyobb érzékenység miatt fajspecifikus ellenanyagok használata ajánlott.

Genetikai ivarmeghatározás

56. Az egyes növedék békák genetikai ivarának felmérése a Josimoto és munkatársai által kifejlesztett markereken alapul (11). A genetikai ivar meghatározásához a boncolás során eltávolított egyik hátsó végtag (vagy bármely más szövet) részét vagy egészét begyűjtik és egy mikrocentrifuga csőben tárolják (békák esetében bármely szövetből vehető szövetminta). A szövet a dezoxiribonukleinsav (DNS) izolálásig –20 °C-on vagy alacsonyabb hőmérsékleten tárolható. A DNS kereskedelmi forgalomban kapható kitékkel izolálható a szövetekből, a marker jelenlétének vagy hiányának elemzése pedig egy polimeráz láncreakciót (PCR) alkalmazó módszerrel végezhető el (5. függelék). A kontrollcsoportokban a növedékektől történő mintavétel időpontjában az állatok szövetminta alapján meghatározott ivara és genotípusa általában 95 % feletti egyezést mutat.

Szövetek gyűjtése és fixálása kórszövettani vizsgálatához

57. Az utolsó mintavétel során a szövettani elemzéshez begyűjtik az ivarmirigyeket, a reproduktív vezetékeket, a vesét és a májat. A hasüreget felnyitják, a májat kimetszik és megméri a tömegét. Ezt követően az alhasból óvatosan eltávolítják az emésztőszerveket (pl. a gyomrot, a beleket), így feltárulnak az ivarmirigyek, a vesék és a reproduktív vezetékek. Az ivarmirigyek jelentős morfológiai rendellenességeit fel kell jegyezni. Végül

eltávolítják a hátsó végtagokat, ha a vérvételhez korábban még nem távolították el őket. A begyűjtött májat és a testet a helyükön hagyott ivarmirigyekkel haladéktalanul Davidson-féle fixálószerbe kell helyezni. Az edénybe helyezett fixálószer mennyisége legalább 10-szerese legyen a szövetek közelítőleges térfogatának. Az összes szövet legalább 48, legfeljebb 96 órán át Davidson-féle fixálószerben tartják, ezt követően ionmentesített vízben átmossák és 10 %-os semleges puffertelt formalinba helyezik őket (1) (29).

Kórszövettan

58. Az egyes növendékmintákon szövettani vizsgálatot végeznek az ivarmirigyek, a reproduktív vezetékek, a vese és a máj szövetein jelentkező kóros elváltozások megállapításához, vagyis diagnózist kell felállítani és meg kell határozni a súlyossági fokot (32). Az értékelés során meghatározzák az ivari fenotípust is (pl. petefészek, here, interszexualitás alapján), és az egyedek genetikai ivarát meghatározó mérésekkel együtt ezek a megfigyelések felhasználhatók a fenotípusos/genotípusos ivararányok kiszámításához.

ADATSZOLGÁLTATÁS

Statisztikai elemzés

59. A LAGDA során három statisztikai elemzésnek alávetett adattípus keletkezik: (1) kvantitatív folytonos adatok (testtömeg, fark nélküli testhossz, máj szomatikus index, VTG), (2) a fejlődési ütemre vonatkozó, „eseményig eltelt időt” jelző adatok (vagyis a vizsgálat kezdetétől az NF szerinti 62. stádium eléréséig eltelt napok) és (3) a kórszövettani vizsgálatokból származó sorrendi adatok, azaz a súlyossági pontszámok és a fejlődési stádiumok.
60. Ajánlatos a vizsgálati tervet úgy kialakítani és olyan statisztikai vizsgálatot választani, hogy a biológiai szempontból fontos változásokat az olyan végpontokon, ahol megfigyelhető hatást nem okozó koncentrációt vagy ECx koncentrációt kell jelenteni, megfelelő statisztikai erővel lehessen észlelni. Az adatok (általában az ismétlések átlagán nyugvó) statisztikai elemzéséhez lehetőség szerint az „Aktuális megközelítések az ökotoxicitási adatok statisztikai elemzésében: alkalmazási útmutató” (33) című dokumentumban leírt eljárásokat kell követni. A vizsgálati módszer 7. függeléke tartalmazza a javasolt statisztikai elemzési folyamatábrát, és útmutatást nyújt az adatok kezeléséhez, valamint a LAGDA során alkalmazandó legmegfelelőbb statisztikai vizsgálat vagy modell kiválasztásához.

61. Mivel minden béka esetében meghatározzák a genotípusos ivart, a növendékmintákból nyert adatokat (pl. növekedés, máj szomatikus index) genotípusos ivaronként külön kell elemezni.

Adatelemzési szempontok

Érvénytelen ismétlések és kezelések használata

62. A nyilvánvaló toxicitásból, betegségből vagy technikai hibából fakadó túlzott mértékű mortalitás érvénytelenné teheti az ismétléseket és kezeléseket. Amennyiben valamely kezelés betegség vagy technikai hiba következtében érvénytelenné válik, legalább három – három érvényes ismétlést bevonó – kezelésnek rendelkezésre állnia az elemzéshez. Ha a legmagasabb dózisú kezelés(ek)nél nyilvánvaló toxicitás tapasztalható, az elemzéshez lehetőség szerint biztosítani kell legalább három, három érvényes ismétléssel rendelkező kezelési szintet (összhangban az OECD vizsgálati iránymutatásainak legnagyobb elviselhető koncentrációra vonatkozó megközelítésével (34)). A mortalitáson túl nyilvánvaló toxicitásra utaló jelek lehetnek a viselkedést érintő hatások (pl. az élőlény a víz felszínén lebeg, a tartály alján fekszik, fordítva vagy szabálytalanul úszik, nem emelkedik fel a felszínre), a morfológiai léziók (pl. haemorrhagiás léziók, hasi ödéma), illetve a normál táplálkozási válaszreakciók gátlása a kontrollállatokkal való kvalitatív összevetésben.

Oldószeres kontroll

63. Oldószer alkalmazása esetén a vizsgálat befejezésekor értékelni kell az oldószer lehetséges hatásait. Ezt az oldószeres kontrollcsoport és a hígítóvízes kontrollcsoport statisztikai összehasonlítása útján végzik el. A legfontosabb vizsgálandó végpontok az elemzés során a növekedés meghatározói (tömeg és hossz), mivel az általános toxicitás ezeket tudja befolyásolni. Ha statisztikailag szignifikáns különbségeket mutatnak ki a hígítóvízes és az oldószeres kontrollcsoportok között e végpontok tekintetében, a legjobb szakmai megítélés alapján kell dönteni arról, hogy érvénytelennek tekinthető-e a vizsgálat. Amennyiben a két kontroll között eltérések tapasztalhatók, a vegyi anyaggal végzett kezeléseket az oldószeres kontrollal kell összevetni, kivéve ha ismert, hogy a hígítóvízzel való összehasonlítást részesítik előnyben. Amennyiben a két kontrollcsoport között nincs statisztikailag szignifikáns különbség, ajánlatos a vizsgálati vegyi anyaggal végzett kezeléseket az összevont oldószeres és hígítóvízes kontrollcsoportokkal összevetni, kivéve ha ismert, hogy a hígítóvízes vagy az oldószeres kontrollcsoporttal való összehasonlítást részesítik előnyben.

Vizsgálati jegyzőkönyv

64. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag:

- fizikai jelleg és adott esetben a fizikai és kémiai tulajdonságok,
- Egy összetevőből álló anyag:

fizikai megjelenés, vízdékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

kémiai azonosító adatok, például IUPAC- vagy CAS-név, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet, tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. (ideértve adott esetben a szervesszén-tartalmat).
- Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítójával (lásd fent), mennyiségi előfordulásával és releváns fizikai-kémiai tulajdonságaival jellemezve.

Vizsgálati fajok:

- tudományos név, törzs (ha meghatározható), forrás és a megtermékenyített peték begyűjtésének módja, valamint a későbbi kezelés;
- a gerincferdülés előfordulása az alkalmazott törzstenyészet dokumentált kontrolljaiban.

Vizsgálati körülmények:

- megvilágítási időszak(ok);
- vizsgálati terv (pl. a kamra mérete, az anyagok és a víz mennyisége, a vizsgálati kamrák és az ismétlések száma, a vizsgált élőlények létszáma az ismétlésekben);
- a törzsoldat elkészítésének módszere és a vízcseré gyakorisága (az esetleg használt diszpergálószer nevét és koncentrációját meg kell adni);
- a vizsgálati vegyi anyag adagolásának módszere (például szivattyú, hígítási rendszerek);
- a módszer visszanyerési hatékonysága és a névleges vizsgálati koncentrációk, a meghatározási határ, a mért értékek átlaga és szórása a vizsgálati edényekben, az ilyen adatok megszerzésének módszerei és bizonyítékok annak alátámasztására, hogy a mérések a valódi oldatban lévő vizsgálati vegyi anyag koncentrációsintjeire vonatkoznak;
- a hígítóvíz jellemzői: pH-érték, keménység, hőmérséklet, oldottoxigén-koncentráció, maradéklór-tartalom (amennyiben méri), összes jód, teljes szervesszén-tartalom

(amennyiben mérik), szuszpendált szilárd anyagok (amennyiben mérik), a vizsgálati közeg sótartalma (amennyiben mérik) és bármely más mérési adat;

- a névleges vizsgálati koncentrációk, a mért értékek átlaga és ezek standard deviációja;
- vízminőség a tesztedényekben: pH-érték, (napi) hőmérséklet és oldottoxigén-koncentráció;
- részletes információk a táplálékról (pl. a haltápok típusa, eredete, az adagolt mennyiség és az adagolás gyakorisága).

Eredmények:

- Bizonyíték arra, hogy a kontrollok teljesítették az érvényességi kritériumokat;
 - a kontroll (és alkalmazása esetén az oldószeres kontroll) és a kezelt csoportok következő adatai: a megfigyelt mortalitás és rendellenességek, az NF szerinti 62. stádium eléréséig szükséges idő, a pajzsmirigy szövettani vizsgálata (csak a lárvamintáknál), növekedés (tömeg és hossz), máj szomatikus index (csak a növedékmintáknál), genetikai/fenotípusos ivararányok (csak a növedékmintáknál), az ivarmirigyek, a reprodukív vezetékek, a vese és a máj kórszövettani vizsgálatának eredményei (csak a növedékmintáknál) és a vérplazma VTG-szintje (csak a növedékmintáknál, ha végeztek ilyen mérést);
 - a statisztikai elemzés és az adatok feldolgozása során alkalmazott megközelítés (az alkalmazott statisztikai vizsgálat vagy modell);
 - megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC) minden egyes kiértékelt válaszreakcióra nézve;
 - megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció (LOEC) minden egyes kiértékelt válaszreakcióra nézve ($\alpha = 0,05$ értéknél); EC_x adott esetben minden egyes kiértékelt válaszreakcióra nézve, konfidencia-intervallumok (például 95 %) és a számításhoz használt illesztett modell grafikonja, a koncentráció–hatás görbe meredeksége, a regressziós modell egyenlete, a modell becsült paraméterei és a becslés standard hibái.
 - a vizsgálati módszertől való eltérések, az elfogadhatósági kritériumoktól való eltérések, és a vizsgálat kimenetelére gyakorolt lehetséges hatásukkal kapcsolatos megfontolások.
65. A végpontmérések eredményeit illetően fel kell tüntetni az átlagértékeket és az azoktól való standard deviációt (lehetőség szerint az ismétlések és a koncentrációk alapján).
66. A kontrolloknál az NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges átlagos időtartamot az ismétlések átlaga és szórása alapján kell kiszámolni és bemutatni. Hasonlóképpen a

kezelések esetén egy adott kezelés átlagát az ismétlések átlaga és szórása alapján kell kiszámolni és bemutatni.

SZAKIRODALOM

- (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) Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (3) Nieuwkoop PD and Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.
- (4) Kloas W and Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1130: 16-27.
- (5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. Journal of the Royal Society of Medicine 93: 140-144.
- (6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 237: 1565.
- (7) Villalpando I and Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. International Journal of Developmental Biology 34: 281-285.
- (8) Miyata S, Koike S and Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335-340.
- (9) Mikamo K and Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.
- (10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K and Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143-150.
- (11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T and Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

- (12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S and Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.
- (13) Tobias ml, Tomasson J and Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: 441-448.
- (14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR and Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321-327.
- (15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A and Degitz SJ. (2011). Effects of 4-Tert-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159-169.
- (16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, USA.
- (17) E melléklet C.4., Gyors biológiai lebonthatóság című fejezete.
- (18) E melléklet C.29., Gyors biológiai lebonthatóság: szén-dioxid-vizsgálat légmentesen zárt edényekben (a gőztér CO₂-tartalmának vizsgálata) című fejezete.
- (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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69-92.

- (23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, USA.
- (24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84 pp.
- (25) E melléklet C.38., Kétéltű-átalakulási vizsgálat című fejezete.
- (26) E melléklet C.48., Halak rövid távú reprodukciós vizsgálata című fejezete.
- (27) E melléklet C.41., Halak ivari fejlődésének vizsgálata című fejezete.
- (28) E melléklet C.49., Halembriók akut toxicitási vizsgálata (FET) című fejezete.
- (29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (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.

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Apikális végpont: populációszintű hatás előidézése.

Vegyí anyag: anyag vagy keverék.

ELISA: enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay).

EC_x: (hatásos koncentráció x % hatás eléréséhez) az a koncentráció, amely valamely hatás x %-át okozza a vizsgálati szervezetekben egy adott expozíciós időn belül, a kontrollal összehasonlítva. Például az EC₅₀ az a becsült koncentráció, amely a vizsgálat valamilyen végpontja tekintetében a kitett populáció 50 %-ában okoz hatást a meghatározott expozíciós idő alatt.

d_{pf}: a megtermékenyítés utáni napok száma.

Átfolyásos vizsgálat: az expozíció során a vizsgálati oldat vizsgálati rendszeren történő folyamatos áramlása mellett folytatott vizsgálat.

HPG-tengely: hipotalamusz-hipofízis-gonád tengely.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (Elméleti és Alkalmazott Kémia Nemzetközi Uniója).

Megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció (LOEC): a vizsgálati vegyi anyag azon legalacsonyabb vizsgálati koncentrációja, amelynél a kontrollal összevetve még megfigyelhető a vegyi anyag statisztikailag szignifikáns hatása ($p < 0,05$). Azonban az LOEC-szint feletti valamennyi vizsgálati koncentrációnak olyan ártalmas hatást kell kifejtenie, amely legalább egyenlő az LOEC-szinten megfigyelttel vagy súlyosabb annál. Amennyiben e két feltétel nem teljesíthető, akkor kimerítő magyarázatot kell adni arra, hogy hogyan történt az LOEC (és ennél fogva az NOEC) kiválasztása. A 7. függelék útmutatást ad.

Medián letális koncentráció (LC₅₀): a vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely a becslések szerint a vizsgálat időtartama alatt a vizsgálati szervezetek 50 %-ára nézve halálos.

Megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC): a közvetlenül az LOEC alatti vizsgálati koncentráció, amely – a kontrollesoporttal való összevetésben – nem fejt ki statisztikailag szignifikáns hatást ($p < 0,05$) a meghatározott expozíciós időszak alatt.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification (molekulák egyszerűsített

egy sorban történő beviteli rendszere).

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

UVCB: ismeretlen szerkezetű vagy változó összetételű, összetett reakcióban keletkezett vagy biológiai eredetű anyagok.

VTG: a vitellogenin a szikben található foszfo-, lipo- és glikoproteinek prekursora, amely alapesetben az ikrarakó fajok szexuálisan aktív nőstényeiben fordul elő.

2. függelék**AZ ELFOGADHATÓ MINŐSÉGŰ HÍGÍTÓVÍZ NÉHÁNY FONTOSABB KÉMIAI TULAJDONSÁGA**

Anyag	Határkoncentráció
Szálló por	5 mg/l
Teljes szervesszén-tartalom	2 mg/l
Nem ionizált ammónia	1 µg/l
Maradék klór	10 µg/l
Szerves foszfort tartalmazó növényvédő szerek összesen	50 ng/l
Szerves klórtartalmú peszticidek + poliklórozott bifenilek	50 ng/l
Összes szerves klór	25 ng/l
Alumínium	1 µg/l
Arzén	1 µg/l
Króm	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Réz	1 µg/l
Vas	1 µg/l
ólom	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Cink	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Higany	100 ng/l
Ezüst	100 ng/l

3. függelék

A LAGDA VIZSGÁLATI KÖRÜLMÉNYEI

1. A vizsgálathoz használt fajok *Xenopus laevis*
2. A vizsgálat típusa Folyamatos vízcserét biztosító átfolyósos rendszer.
3. Vízhőmérséklet A névleges vízhőmérséklet 21 °C. A vizsgálat időtartama alatt az átlagos vízhőmérséklet 21 ± 1 °C (az ismétlések és a kezelések közötti különbség nem haladhatja meg az 1,0 °C-ot).
4. A megvilágítás minősége Fluoreszcens izzók (széles spektrum) 600–2 000 lux (lumen/m²) a víz felszínén.
5. Megvilágítási időszak 12 óra fény, 12 óra sötét.
6. Vizsgálati oldat mennyisége és vizsgálóedény (tartály) 4–10 l (legalább 10–15 cm-es vízmélység).
Üveg- vagy rozsdamentes acél tartály.
7. A vizsgálati oldatok térfogatának cseréje Állandó, a biológiai körülmények fenntartása és a vegyi anyag koncentrációja szerint (pl. napi 5 térfogatcsere).
8. A vizsgált élőlények kora a vizsgálat kezdetén Nieuwkoop és Faber (NF) szerinti 8–10. stádium.
9. Élőlények ismétlésenkénti száma 20 állat (embrió)/tartály (ismétlés) a kezelés elindításakor és 10 állat (növendék)/tartály (ismétlés) az NF szerinti 66. stádiumtól a kezelés végéig.
10. Kezelések száma Legalább 4 vizsgálati vegyi anyaggal végzett kezelés plusz a megfelelő kontroll(ok).
11. Kezelésenkénti ismétlések száma 4 ismétlés a vizsgálati vegyi anyaggal végzett kezelések és 8 ismétlés a kontroll(ok) esetén.
12. Élőlények száma vizsgálati koncentrációként Legalább 80 állat a vizsgálati vegyi anyaggal végzett kezelések és legalább 160 állat a kontroll(ok) esetén.
13. Hígítóvíz Bármely víz, amely lehetővé teszi az *X. laevis* normál növekedését és fejlődését (pl. forrásvíz vagy aktív szénen szűrt csapvíz)
14. Levegőztetés Nem szükséges, ha viszont az oldottoxigén-tartalom az ajánlott határértékek alá esik, és az áramoltatott vizsgálati oldatban maximális szinten van jelen, akkor szükség lehet a tartályok levegőztetésére.

15. A vizsgálati oldat oldottoxigén-Oldott oxigén: a levegőteltettségi érték legalább 40 %-a vagy legalább tartalma 3,5 mg/l
16. A vizsgálati oldat pH-értéke 6,5–8,5 (az ismétlések és a kezelések közötti különbség értéke nem haladhatja meg a 0,5-öt).
17. A vizsgálati oldat keménysége 10–250 mg CaCO₃/l és lágossága
18. Etetési rend (Lásd a 4. függelék).
19. Expozíciós időtartam Az NF szerinti 8–10. stádiumtól a vizes és/vagy oldószeres kontrollcsoportban az NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges átlagos időtartamot követő 10 hétig (legfeljebb 17 hét).
20. Biológiai végpontok Mortalitás (és rendellenes külső megjelenés), az NF szerinti 62. stádium eléréséig szükséges idő (lárvamintáknál), a pajzsmirigy szövettani vizsgálata (lárvamintáknál), növekedés (tömeg és hossz), hepato-szomatikus index (növekedésmintáknál), genetikai/fenotípusos ivararányok (növekedésmintáknál), az ivarmirigyek, a reproduktív vezetékek, a vese és a máj kórszövettani eredményei (növekedésmintáknál) és a vérplazma vitellogeninszintje (növekedésmintáknál, választható).
21. A vizsgálat érvényességi kritériumai Az oldott oxigén szintjének meg kell haladnia a levegőteltettségi érték 40 %-át; az átlagos vízhőmérsékletnek a 21 ±1 °C-os tartományban kell lennie, az ismétlések és a kezelések közötti különbség nem haladja meg az 1,0 °C-ot; a vizsgálati oldat pH-értékének 6,5 és 8,5 között kell lennie; a kontrollok minden ismétlésében a mortalitás legfeljebb 20 %-os lehet, a kontrollnál az NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges átlagos időtartam legfeljebb 45 nap lehet; a kontrollokban és az oldószeres kontrollokban (ha végeztek ilyet) a vizsgált élőlények átlagos testtömegének az NF szerinti 62. stádiumban el kell érnie az 1,0 ±0,2 g-ot, a vizsgálat végén pedig a 11,5 ±3 g-ot; bizonyítékkal kell alátámasztani, hogy a vizsgálati vegyi anyag oldatban lévő koncentrációit az átlagos mért értékek ±20 %-os tartományán belül sikerült tartani.

4. függelék

ETETÉSI REND

Megjegyzendő, hogy bár ez az ajánlott etetési rend, alternatív megoldások is alkalmazhatók, amennyiben biztosítják a vizsgálati élőlények megfelelő ütemű növekedését és fejlődését.

A lárvák etetése

A lárvák táplálékának előkészítése

- A. 1 : 1 térfogatszázalék arányban ivadékindító pisztrángtáp: alga/TetraFin® (vagy ezzel egyenértékű táp);
1. Ivadékindító pisztrángtáp: turmixoljunk össze 50 g (apró szemcsés vagy porított) ivadékindító pisztrángtápot és 300 ml kellően átszűrt vizet 20 percen keresztül egy magas fokozatra állított turmixgépben.
 2. Alga/TetraFin® (vagy ezzel egyenértékű) keverék: turmixoljunk össze 12 g spirulina algakorongot és 500 ml szűrt vizet 40 másodpercig egy magas fokozatra állított turmixgépben, turmixoljunk össze 12 g Tetrafin® (vagy ezzel egyenértékű) tápot 500 ml szűrt vízzel, majd a két keveréket összeöntve 1 liternyi 12 g/l spirulina algát és 12 g/l Tetrafin® (vagy ezzel egyenértékű) tápot tartalmazó keveréket kapunk.
 3. Öntsünk össze azonos mennyiségű összeturmixolt ivadékindító pisztrángtápot és alga/TetraFin® (vagy ezzel egyenértékű) keveréket.

B. Sórak:

Keltessünk ki 15 ml sórákpetét 1 liter sós vízben (amelyet úgy készíthetünk el, hogy 1 liter ionmentesített vízhez hozzáadunk 20 ml NaCl-ot). Miután folyamatos világítás mellett szobahőmérsékleten 24 órán keresztül levegőztettük a vizet, begyűjthetjük a kikelt sórákokat. Ehhez 30 percre állítsuk le a levegőztetést, hogy a sórákok leülepedjenek az edény aljára. A sórákpeték edény tetején lebegő burkát leöntjük és eltávolítjuk, a sórákokat pedig a megfelelő szűrőkkel leszűrjük és 30 ml szűrt vízzel a felszínre hozzuk.

Etetési protokoll

Az 1. táblázat támpontot nyújt a kezelés lárvá stádiumaiban használandó táplálék típusához és mennyiségéhez. Az állatokat hétfőtől péntekig napi három alkalommal, hétvégén napi egy alkalommal kell etetni.

1. táblázat: Átfolyósos körülmények között nevelt *X. laevis* lárvák etetési rendje

Időszak* (a)	Ivadékindító pisztrángtáp: alga/TetraFin® (vagy ezzel egyenértékű táp)	Sórak
-----------------	---	-------

megtermékenyítéstől számítva)	Hétköznapi (napi 3 alkalommal)	Hétfvégén (napi egy alkalommal)	Hétköznapi (napi két alkalommal)	Hétfvégén (napi egy alkalommal)
4–14. nap (0–1. hét)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (8–15. nap)	0,5 ml (8–15. nap)
2. hét	0,67 ml	2,4 ml	1 ml (a 16. naptól)	1 ml (a 16. naptól)
3. hét	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
4. hét	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
5. hét	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
6. hét	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
7. hét	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
(8–10. hét)	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

* A 0. nap a hCG injekció beadásának napja.

Áttérés a lárvák táplálásáról a növedékek táplálására

Az átalakulás folyamata során a lárvák az alábbiakban ismertetett módon áttérnek a növedékek étrendjére. Az átmeneti időszak során a lárvák táplálék csökkentésével párhuzamosan növelni kell a növedék táplálék mennyiségét. Ennek megvalósításához fokozatosan csökkentik a lárvák táplálékot, miközben fokozatosan növelik a növedék táplálékot abban az időszakban, amikor az öt ebihalból álló egyes csoportok elhagyják az NF szerinti 62. stádiumot és közelednek az átalakulás NF szerinti 66. stádiumban bekövetkező végéhez.

A növedékek etetése

Növedékek étrendje

Az átalakulási fázis lezárultát követően (66. stádium) a táplálék kizárólag 3/32 hüvelykes prémium minőségű süllyedő békátápból (Xenopus Express™, FL, USA) vagy ezzel egyenértékű tápból áll.

Zúzott pelleték készítése a növedékké alakuló lárvák számára

A süllyedő békátáp pelletdarabjait rövid ideig kávédarálóban vagy turmixgépben őrlik, illetve mozsárban mozsártörővel apróra zúzzák, hogy a pelleték méretét körülbelül az 1/3-ára csökkentsék. A túl hosszú ideig való őrlés vagy zúzás poríthatja a pelletéket, amit el kell kerülni.

Etetési protokoll

A **2. táblázat** támpontot nyújt a növendék és a felnőtt életszakaszban használandó táplálék típusához és mennyiségéhez. Az állatokat naponta egyszer kell táplálni. Megjegyzendő, hogy az állatok az átalakulási időszak alatt továbbra is megkapják sórakadagjuk egy részét, amíg az állatok több mint 95 %-a át nem alakult.

A vizsgálat utolsó napján az állatokat már nem szabad etetni, hogy a táplálék ne befolyásolja a mért testtömeget.

2. táblázat: Átfolyásos körülmények között nevelt *X. laevis* növendékek etetési rendje. Fontos megjegyezni, hogy az át nem alakult állatok, köztük azok, amelyek átalakulását a vegyi anyaggal való kezelés késlelteti, nem tudják elfogyasztani a teljes méretű pelletdarabokat.

Időszak (Az átlagos átalakulási nap utáni hetekben)	Zúzott pellet mennyisége (mg/békaporonty)	Teljes méretű pellet mennyisége (mg/békaporonty)
Az állatok átalakulási időszaka	25	0
0–1. hét	25	28
2–3. hét	0	110
4–5. hét	0	165
6–9. hét	0	220

* A 0. hét első napja a kontrollállatok átlagos átalakulási napja.

5. függelék

A GENETIKAI IVAR MEGHATÁROZÁSA (NEMEK GENETIKAI ÚTON TÖRTÉNŐ MEGHATÁROZÁSA)

A *Xenopus laevis* nemének genetikai úton történő meghatározása a Josimoto és munkatársai (2008) által kidolgozott módszeren alapul. A genotípus meghatározásának részletes eljárása igény szerint tanulmányozható ebben a publikációban. Alkalmasnak ítélt egyéb módszerek (pl. nagy áteresztőképességű kvantitatív polimeráz láncreakció) is használhatók.

X. laevis primerek

DM-W marker

Forward: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Reverse: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Pozitív kontroll

Forward: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Reverse: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

DNS-tisztítás

Az izom- vagy bőrszövetből a DNS tisztítható pl. Qiagen DNeasy Blood and Tissue kittel (kat.szám: 69506) vagy hasonló termékkel, a kithez mellékelt útmutató alapján. Amennyiben a polimeráz láncreakcióhoz koncentráltabb mintákra van szükség, a DNS kevesebb puffer használatával is elulálható a forgóoszlopokból. A DNS meglehetősen stabil, ezért ügyelni kell arra, hogy elkerüljék a keresztszennyeződést, ami a hímek és a nőstények helytelen azonosításához vezethet.

Polimeráz láncreakció

Az **1. táblázat** ismerteti a Sigmától beszerezhető JumpStart™ Taq használatán alapuló mintaprotokollt.

1. táblázat: A Sigmától beszerezhető JumpStart™ Taq használatán alapuló mintaprotokoll

Reakciókeverék	1x (μl)	[Végző]
NFW	11	-
10X puffer	2,0	-
MgCl ₂ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP-k (egyenként 10 mM)	0,4	200 μM
Forw. primer markere (8 μM)	0,8	0,3 μM
Rev. primer markere (8 μM)	0,8	0,3 μM
Forw. primer kontrollja (8 μM)	0,8	0,3 μM
Rev. primer kontrollja (8 μM)	0,8	0,3 μM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 egység/μl
DNS-templát	1,0	~200 pg/μl

Megjegyzés: A reakciókeverékek készítésekor érdemes plusz mennyiségről is gondoskodni, amivel pótolni lehet a pipetázás során bekövetkezett veszteséget (például: 24 reakcióhoz 25x-ös mennyiséget készíteni).

Reakció:

Reakciókeverék 19,0 μl

Templát 1,0 μl

Összesen 20,0 μl

Hőciklus profilja:

1. lépés 94 °C 1 min
2. lépés 94 °C 30 s
3. lépés 60 °C 30 s
4. lépés 72 °C 1 min
5. lépés Térjen vissza a 2. lépéshez. 35 ciklus
6. lépés 72 °C 1 min
7. lépés 4 °C tárolás

A polimeráz láncreakció termékei azonnal felhasználhatók gélben, vagy tárolhatók is 4 °C-

on.

Agarózgél-elektroforézis (3 %) (mintaprotokoll)

50X TAE

Tris	24,2 g
Jégecet	5,71 ml
Na ₂ (EDTA)·2H ₂ O	3,72 g
Vízzel egészítsük ki 100 ml-re	

1X TAE

H ₂ O	392 ml
50X TAE	8 ml

3 : 1 Agaróz

3 rész NuSieve™ GTG™ agaróz

1 rész alacsony elektroendozmózisú (EEO) Fisher agaróz

Elkészítési mód

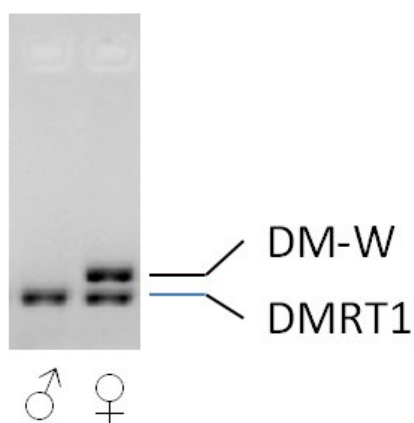
1. 1,2 g agarózkeverék 43 ml 1X TAE-hez való hozzáadásával készítsünk egy 3 %-os gél.
Kavarással oldjuk fel a nagyobb csomókat.
2. A csomók teljes feloldásához mikrohullámban melegítsük az agarózkeveréket (forralni nem szabad). Hagyjuk kissé lehűlni a keveréket.
3. Adjunk hozzá 1,0 µl etídium-bromidot (10 mg/ml). Keverjük össze a lombik tartalmát. Az etídium-bromid mutagén hatású, ezért amennyiben technikailag megoldható, a dolgozókra leselkedő egészségügyi veszélyek minimalizálása érdekében¹ ebben a lépésben alternatív vegyi anyagokat kell használni.

¹ A munkájuk során rákkeltő anyagokkal és mutagénekkel kapcsolatos kockázatoknak kitett munkavállalók védelméről szóló, 2004. április 29-i 2004/37/EK európai parlamenti és tanácsi irányelv (hatodik egyedi irányelv a 89/391/EGK tanácsi irányelv 16. cikkének (1) bekezdése értelmében) 4.1. cikke értelmében (HL L 158., 2004.4.30., 50. o.).

4. Öntsük a gélt egy barázdált formába. Hagyjuk teljesen lehűlni.
5. Öntsük bele a gélt a készülékbe. A gélre helyezünk 1X TAE-t.
6. A polimeráz láncreakcióból származó termék minden 10 µl mennyiségéhez adjunk hozzá 1 µl 6x-os töltőfestéket.
7. Pipettával helyezzük a mintákat a barázdákba.
8. Végezzük el az elektroforézist 160 V állandó feszültségen mintegy 20 percig.

Az **1. ábrán** látható agaróz gél kép mutatja azokat a sávmintákat, amelyek jelzik a hím és a nőstény egyedek ivarát.

1. ábra: Agaróz gél kép, amely mutatja a hím (♂) egyedre jellemző sávmintát (egy sáv, ~203 bp: DMRT1) és a nőstény (♀) egyedre jellemző sávmintát (két sáv: ~259 bp: DM-W és 203 bp:DMRT1).



SZAKIRODALOM

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.

6. függelék

A VITELLOGENIN MÉRÉSE

A vitellogenin (VTG) mérése enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálati (ELISA) eljárással történik, amelyet eredetileg az amerikai cselle VTG mérésére fejlesztettek ki (Parks és munkatársai, 1999). Jelenleg kereskedelmi forgalomban nem kaphatók ellenanyagok az *X. laevis*-hez. Figyelembe véve azonban, hogy a VTG fehérjére vonatkozólag bőséges ismeretek állnak rendelkezésre és az ellenanyagok kereskedelmi forgalomban költséghatékonyan beszerezhetők, a laboratóriumok könnyen kidolgozhatnak egy ELISA-eljárást ehhez a méréshez (Olmstead és munkatársai, 2009). Szintén Olmstead és munkatársai (2009) közzétették a vizsgálat *X. tropicalis* VTG-szintjének mérésére alkalmas, alábbiakban ismertetett módosított változatát. A módszer az *X. tropicalis* VTG-vel szemben termelt ellenanyagot használ, amelyről ismert, hogy az *X. laevis* VTG-vel szemben is alkalmazható. Megjegyzendő, hogy nem kompetitív ELISA tesztek is használhatók, ugyanakkor ezek az alábbiakban ismertetett módszernél alacsonyabb kimutathatósági határértékekkel rendelkezhetnek.

Anyagok és reagensek

- Előadszorbeált 1. ellenanyag szérum

Keverjünk össze 1 rész *X. tropicalis* VTG-vel szemben termelt 1. ellenanyag szérumot 2 rész kontrollhímből származó vérplazmával, hagyjuk a keveréket szobahőmérsékleten kb. 75 percig, helyezzük jégre 30 percig, centrifugáljuk 20 000 x g-vel 1 órán keresztül 4 °C-on, távolítsuk el a felülúszót, osszuk szét alikvotokra és tároljuk –20 °C-on.

- 2. ellenanyag

HRP-konjugált anti-nyúl kecske IgG (pl. Bio-Rad 172-1019)

- VTG szabvány

tisztított *X. laevis* VTG 3,3 mg/ml.

- TMB (3,3',5,5' Tetrametil-benzidin) (pl. KPL 50-76-00; vagy Sigma T0440)
- Normál kecske szérum (NGS) (pl. Chemicon® S26-100 ml)
- 96 lyukú EIA polisztirol mikrotiterlemez (pl. ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher: 07-200-35)
- 37 °C hibridizáló inkubátor (vagy gyors légkiegyenlítő inkubátor) a lemezekhez, vízfürdő a csövekhez
- Egyéb szokásos laboratóriumi műszerek, vegyi anyagok és felszerelések.

Receptek

Felvívő puffer (50 mM karbonát puffer, pH 9,6):

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

10X PBS (0,1 M foszfát, 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
víz	810 ml

Mosópuffer (PBST):

10X PBS	100 ml
víz	900 ml

Állítsuk be a pH-t 7,3 értékre 1 M HCl-dal, majd adjunk hozzá 0,5 ml Tween-20-t

Vizsgálati puffer:

Normál kecske szérum (NGS)	3,75 ml
Mosópuffer	146,25 ml

Mintagyűjtés

A vért heparinnal kezelt mikrohematokrit csőbe gyűjtik és jégre helyezik. Miután 3 percen keresztül centrifugálták, a csövet értékelik, felnyitják és a vérplazmát 0,13 egység liofilizált aprotinint tartalmazó 0,6 ml-es mikrocentrifuga csövekbe töltik. (Ezeket a csöveket előre elkészítik: megtöltik a megfelelő mennyiségű aprotininnel, lefagyasztják, majd gyors vákuumszáritóban alacsony hőmérsékleten száradásig lipofizálják.) A vérplazma az elemzésig –80 °C-on tárolható.

Eljárás egy lemezhez

Felvitel a lemezre

Keverjünk össze 20 µl tisztított VTG-t 22 ml karbonát pufferrel (3 µg/ml végső koncentrációban). Helyezzünk a keverékből 200 µl-t egy 96 lyukú lemez összes lyukába. Takarjuk le a lemezt tapadós zárófóliával, és inkubáljuk 2 órán keresztül 37 °C-on (vagy egy éjszakán keresztül 4 °C-on).

A lemez blokkolása

A blokkoló oldat elkészítéséhez adjunk hozzá 2 ml normál kecske szérumot (NGS) 38 ml karbonát pufferhez. Távolítsuk el a felvivő oldatot és a lemezt rázassuk szárazra. Minden lyukhoz adjunk hozzá 350 µl blokkoló oldatot. Takarjuk le a lemezt tapadós zárófóliával, és inkubáljuk 2 órán keresztül 37 °C-on (vagy egy éjszakán keresztül 4 °C-on).

A standardok elkészítése

Egy 12 x 75 mm-es, boroszilikát üvegből készült egyszer használatos kémcsőben keverjünk össze 5,8 µl tisztított VTG standardot 1,5 ml vizsgálati pufferrel. Ezzel egy 12 760 ng/ml koncentrációjú keveréket állítunk elő. Ezután hígítási sorozatot készítünk úgy, hogy az előző hígításból 750 µl mennyiséget hozzáadunk 750 µl mennyiségű vizsgálati pufferhez, így megkapjuk a következő végső koncentrációértékeket: 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 és 50 ng/ml.

A minták előkészítése

Elsőként hígítsuk a vérplazmát a vizsgálati pufferrel 1 : 300 (pl. 1 µl plazma és 299 µl vizsgálati puffer összekeverésével) vagy 1 : 30 arányban. Ha várhatólag nagy mennyiségű VTG-t kapunk, további vagy nagyobb arányú hígításokra lehet szükség. Törekedjünk arra, hogy a B/B₀ belül maradjon a standardok tartományán. Azoknál a mintáknál, amelyeknél nem értékelhető a VTG-szint, pl. kontrollként szolgáló ivaréretlen hímeknél és nőstényeknél, érdemes 1 : 30 arányú hígítást használni. Az ennél kisebb arányú hígítások esetén nem kívánt mátrixhatások léphetnek fel.

Emellett ajánlatos minden lemezzel párhuzamosan pozitív kontrollmintát futtatni. A kontrollminta olyan plazmaállományból származik, amely nagy mennyiségű indukált VTG-t tartalmaz. A plazmaállományt először normál kecske szérummal hígítják, alikvotokba osztják és -80 °C-on tárolják. Minden lemezhez felolvasztanak egy alikvotot, felhígítják a vizsgálati pufferrel és a vizsgálati mintával azonos körülmények között vizsgálják.

Inkubálás az 1. ellenanyaggal

Az 1. ellenanyag elkészítéshez az előadszorbeált 1. ellenanyag szérumot 1 : 2 000 arányban hígítják a vizsgálati pufferrel (pl. 8 µl mennyiséget hígítanak 16 ml vizsgálati pufferrel). Egy üveg csőben keverjünk össze 300 µl 1. ellenanyag oldatot 300 µl mintával/standarddal. Készítsük el hasonlóképpen a B₀ csövet, 300 µl vizsgálati puffert összekeverve 300 µl ellenanyaggal. Ezenfelül egy normál kecske szérumot tartalmazó csövet is kell készítenünk,

csak 600 µl vizsgálati pufferrel, vagyis ellenanyag nélkül. Fedjük le a csöveket Parafilm zárófóliával, majd örvénykeverővel óvatosan elegyítsük tartalmukat. Inkubáljuk a csöveket 37 °C-os vízfürdőben 1 órán keresztül.

A lemez mosása

Közvetlenül az 1. ellenanyag inkubálásának vége előtt mossuk ki a lemezt. Ehhez rázzuk ki a tartalmát és nedvszívó papírral töröljük szárazra. Ezt követően töltjük fel a lyukakat 350 µl mosóoldattal, majd öntsük ki az oldatot, és töröljük szárazra a lyukakat. Jó szolgálatot tehet egy többcsatornás ismétlőpipetta vagy lemezmosó. A mosási műveletet kétszer megismétljük, mert összesen háromszor kell kimosnunk a lemezt.

A lemez feltöltése

Miután elmostuk a lemezt, óvatosan távolítsuk el a csöveket a vízfürdőből és az örvénykeverőből. Minden mintát, standardot, B₀-t és NSB-t tartalmazó csőből öntsünk 200 µl-t a lemez két-két lyukába. Takarjuk le a lemezt tapadós zárófóliával, és inkubáljuk 1 órán keresztül 37 °C-on.

Inkubálás a 2. ellenanyaggal

Az előző lépésben végrehajtott inkubálás végén a lemezt a fentiekhez hasonlóan ismét háromszor el kell mosni. A 2. ellenanyag hígításához keverjük össze 2,5 µl 2. ellenanyagot 50 ml vizsgálati pufferrel. A hígított 2. ellenanyagból töltünk 200 µl-t az egyes lyukakba, majd a lemezt a fentiekben leírtak szerint zárjuk le és inkubáljuk 1 órán át 37 °C-on.

A szubsztrát hozzáadása

A 2. ellenanyag inkubálását követően mossuk ki háromszor a lemezt a fentiek szerint. Ezután minden lyukhoz adjunk hozzá 100 µl TMB szubsztrátot. Ezt követően 10 percig hagyjuk a reakciót végbemenni, lehetőleg erős fénytől védett helyen. Majd 100 µl 1 M koncentrációjú foszforsav hozzáadásával állítsuk le a reakciót. Ezáltal a keverék színe kékről élénksárgára változik. Egy lemezleolvasóval mérjük meg az abszorbanciát 450 nm-en.

A B/B₀ kiszámítása

Minden mérési eredményből vonjuk ki az NSB átlagértékét. Az egyes minták és standardok B/B₀ arányának kiszámításához osszuk el az abszorbancia értékét (B) a B₀ minta átlagos abszorbanciájával.

A standard görbe létrehozása és az ismeretlen mennyiségek meghatározása

Számítógépes grafikai szoftver (pl. Slidewrite™ vagy Sigma Plot®) segítségével hozzunk létre egy standard görbét, amely a standardok B/B₀ aránya alapján extrapolálja a minta B/B₀

arányából származó mennyiséget. A szóban forgó mennyiség jellemzően egy logaritmikus skálán jelenik meg, a görbe pedig szigmoid formájú. A standardok szűk tartománya esetén azonban a görbe lineáris formát vehet fel. Igazítsuk ki a mintára kapott mennyiséget a hígítási tényezővel, és mg VTG/ml plazma arányban tüntessük fel a jelentésben.

A minimális kimutathatósági határértékek (MDL) megállapítása

Különösen a normál fejlődésű hímeknél gyakran nem világos, hogyan szerepeljenek a jelentésben az alacsony értékekből származó eredmények. Ilyen esetben a 95 %-os „konfidenciahatárok” alkalmazásával kell meghatározni, hogy az értéket nullaként vagy valamely más számként kell-e feltüntetni. Amennyiben a minta eredménye a nulla standard (B_0) konfidenciaintervallumán belül van, akkor az értéket nullaként kell feltüntetni. A minimális kimutathatósági szint az a legalacsonyabb standard, amelyik következetesen eltér a nulla standardtól; vagyis a két konfidenciaintervallum között nincs átfedés. A minta azon eredményei esetében, amelyek a minimális kimutathatósági szint konfidenciahatárán belül vagy azon felül helyezkednek el, a kiszámított értéket kell feltüntetni a jelentésben. Ha pedig a minta eredménye a nulla standard és a minimális kimutathatósági szint határértékei közé esik, az adott minta értéke a minimális kimutathatósági szint feleként kerül bele a jelentésbe.

SZAKIRODALOM

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.

7. függelék

STATISZTIKAI ELEMZÉS

A LAGDA során három statisztikai elemzésnek alávetett adattípus keletkezik: (1) kvantitatív folytonos adatok, (2) a fejlődési ütemre vonatkozó, „eseményig eltelt időt” jelző adatok (az NF szerinti 62. stádium eléréséig eltelt idő) és (3) a kórszöveti vizsgálatokból származó sorrendi adatok, azaz a súlyossági pontszámok és a fejlődési stádiumok. Az 1. ábrán látható a LAGDA javasolt statisztikai elemzési folyamatábrája. Az alábbi rész pedig néhány magyarázattal szolgál, amelyek szükségesek lehetnek a LAGDA mérési eredményeinek statisztikai elemzéséhez. Az elemzési folyamatábra alapján a mortalitás, a növekedés (testtömeg és testhossz) és a hepato-szomatikus index (LSI) mérési eredményeit a „Más végpontok” elágazás szerint kell elemezni.

Folytonos adatok

A folytonos végpontokra vonatkozó adatok esetében először ellenőrzik a monotonitást, ehhez rangsorba rendezik az adatokat, beillesztik őket egy ANOVA-modellbe, majd összevetik a lineáris és kvadratikus kontrasztokat. Monoton jellegű adatoknál egy lefelé lépegető Jonckheere–Terpstra-féle trendpróbát kell végezni az ismétlések középértékein, és további elemzésekre nincs szükség. A normál eloszlású, homogén szórással rendelkező adatok elemezhetők a lefelé lépegető Williams-próbával is. Ha azonban az adatok nem monoton jellegűek (vagyis a kvadratikus kontraszt szignifikáns, a lineáris kontraszt pedig nem az), akkor elemzésükhöz kombinált hatásokat mérő ANOVA-modellt kell használni. Ezt követően meg kell vizsgálni az adatok normalitását (lehetőleg a Shapiro–Wilk- vagy az Anderson–Darling-próba alkalmazásával) és szóráshomogenitását (lehetőleg a Levene-féle próba használatával). Mindkét próbát a kombinált hatásokat mérő ANOVA-modell maradékain végzik. Ezeket a formális normalitási és szóráshomogenitási próbákat a szakértői megítélés is helyettesítheti, de a formális próbákat kell előnyben részesíteni. Ha az adatok normál eloszlásúak homogén szórással, akkor a kombinált hatásokat mérő ANOVA feltételezései beigazolódnak, és a szignifikáns kezelési hatást a Dunnett-féle próbával határozzák meg. Normálistól eltérő eloszlás vagy szórásheterogenitás esetén a Dunnett-féle próba feltételezései nem teljesülnek, és normalizáló vagy szórástabilizáló transzformációt kell keresni. Ha nem találunk ilyen transzformációt, a szignifikáns kezelési hatást a Dunn-féle próbával határozzák meg. A lehetőségekhez mérten nem kétoldali, hanem egyoldali vizsgálatot kell végezni, de szakértői megítélés alapján kell döntenie arról, hogy egy adott végpont esetén melyik vizsgálat a helyénvaló.

Mortalitás

A mortalitási adatokat a vizsgálat teljes időtartamára vonatkozólag elemezni kell, és a mortalitást az egyes tartályokban elpusztult állatok arányában kell kifejezni. Azoknak az ebihalaknak az adatait, amelyek nem alakultak át teljesen az adott időkereten belül, illetve

amelyeket felhasználtak a lárva szakaszban zajló mintavételhez, továbbá a kiselejtezett növendék békák és a kísérletet végző személy hibájából elpusztult állatok adatait cenzúrázott adatoknak kell tekinteni, és figyelmen kívül kell hagyni az arányszám nevezőjének meghatározásakor. Mielőtt statisztikai elemzésekre kerülne sor, a mortalitási arányszámokon négyzetgyök arkusz transzformációt kell végezni. Alternatív megoldásként a lefelé lépegető Cochran–Armitage-féle próba használható, ha az eloszlás túlbecsült, akkor lehetőleg annak Rao–Scott-féle módosítását kell alkalmazni.

Testtömeg és testhossz (növekedési adatok)

Mivel az átalakulás során a hímek és a nőstények nem mutatnak ivari kétalakúságot, a lárva részminták növekedési adatait ivartól függetlenül elemzik. A növendékek növekedési adatait azonban genetikai ivar szerint elkülönítve kell elemezni. Előfordulhat, hogy a végpontok adatain logaritmus transzformációt kell alkalmazni, miután a méretre vonatkozó adatok eloszlása gyakran követi a lognormális eloszlást.

Hepato-szomatikus index (LSI)

A máj tömegére vonatkozó adatokat a teljes testtömeg arányához viszonyítva normalizálni kell (vagyis meg kell határozni az LSI-t), és genetikai ivar szerint elkülönítve kell elemezni.

Az NF szerinti 62. stádiumig eltelt idő

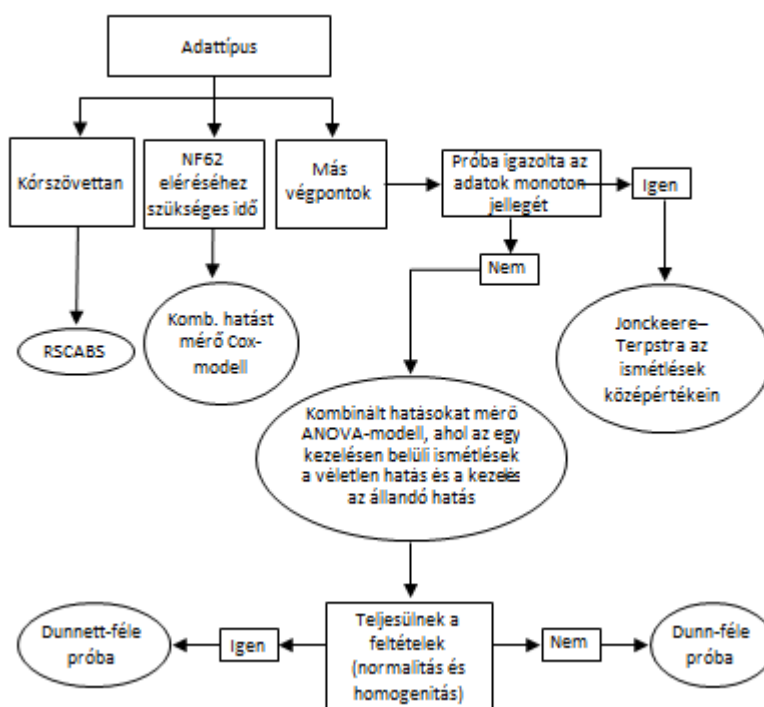
Az átalakulásig eltelt időre vonatkozó adatokat „eseményig eltelt időt” jelző adatként kell kezelni, és az elemzésből ki kell zárni az elhullott, valamint azon egyedek adatait, amelyek nem érték el 70 napon belül az NF szerinti 62. stádiumot (ezek a felső határt túllépő adatok, vagyis a valós érték nagyobb mint 70 nap, de a vizsgálat véget ér, mielőtt az állat 70 napon belül elérte volna az NF szerinti 62. stádiumot). A vizsgálat lezárásának napját a hígítóvizet kontrollokban az NF szerinti 62. stádium (vagyis az átalakulás végének) eléréséhez szükséges átlagos időtartam alapján kell meghatározni. A teljes átalakuláshoz szükséges átlagos időtartam megállapítható a terméket és határértéket vizsgáló Kaplan–Meierx becsléssel. Ezeket a végpontokat a kombinált hatásokat mérő Cox-féle arányos kockázati modellel kell elemezni, amely figyelembe veszi a vizsgálat ismétléseinek számát.

Kórszövettani adatok (súlyossági pontszámok és a fejlődési stádiumok)

Kórszövettani adatok súlyossági pontszámok vagy fejlődési stádiumok formájában állnak rendelkezésre. Az úgynevezett RSCABS (Rao–Scott Cochran–Armitage by Slices) próba a Cochran–Armitage-féle trendpróba Rao–Scott-féle lefelé lépegető módosítását alkalmazza a kórszövettani válaszreakció minden súlyossági szintjén (Green és munkatársai, 2014). A Rao–Scott-féle módosítás a próba során figyelembe veszi az edények (ismétlések) kísérleti kialakítását. A „by Slices” eljárás számításba veszi azt a biológiai elvárást, hogy a dózisok vagy koncentrációk növelésével párhuzamosan nő a hatás súlyossága, ugyanakkor megtartja az egyedi pontszámokat és meghatározza a kimutatott hatások súlyosságát. Az RSCABS

eljárás nem csupán azt határozza meg, hogy melyik kezelés különbözik statisztikailag a kontrolloktól, (vagyis melyik mutat súlyosabb patológiai elváltozásokat, mint a kontrollok), hanem azt is megállapítja, hogy melyik súlyossági pontszámnál fordul elő eltérés, újabb összefüggéseket tárva fel az elemzés számára. Az ivarmirigyek és a reproduktív vezetékek fejlődési stádiumba sorolása tekintetében az adatok további feldolgozására van szükség, mivel az RSCABS egyik feltételezése, hogy a dózissal párhuzamosan nő a hatás súlyossága. A megfigyelt hatás a késleltetett vagy a felgyorsult fejlődés. Ezért a fejlődési stádiumba sorolásra vonatkozó adatok elemezhetők a jelentés szerint a felgyorsult fejlődés észleléséhez, majd a második, a késleltetett fejlődés detektálásához manuálisan invertálni kell az adatokat.

1. ábra: A LAGDA során nyert adatok statisztikai elemzésének folyamatábrája.



SZAKIRODALOM

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

8. függelék

SZEMPONTOK A GERINCFERDÜLÉS ELŐFORDULÁSÁNAK NYOMON KÖVETÉSÉHEZ ÉS MINIMALIZÁLÁSÁHOZ

Az idiopátiás gerincferdülés, amely a *Xenopus laevis* ebihalaknál többnyire a farok elhajlásában nyilvánul meg, megnehezítheti a vizsgált populáció morfológiájának és viselkedésének megfigyelését. Erőfeszítéseket kell tenni annak érdekében, hogy mind a törzsállományban, mint a vizsgálati körülmények közepette minimalizálják vagy teljesen visszaszorítsák a gerincferdülés előfordulását. A végleges vizsgálat során ajánlatos a mérsékelt és a súlyos gerincferdülés gyakoriságát 10 % alatt tartani, hogy a vizsgálat megbízhatóbban észlelje a kezeléssel összefüggő fejlődési hatásokat az egyébként egészséges kétéltű lárvákban.

A végleges vizsgálat alatt tett napi megfigyelések során fel kell jegyezni az észlelt gerincferdüléssel esetek előfordulását (egyedenként számlálva) és súlyosságát. A rendellenesség természetét jellemezni kell előfordulási helyével (pl. a farok elülső vagy hátsó vége) és a görbület irányával (laterális vagy dorziventrális). A súlyosság osztályozható az alábbiak szerint:

(NR) Nem észrevehető: nem látható görbület

(1) Enyhe: csekély mértékű, laterális görbület a farok hátsó részén; csak nyugalmi állapotban észlelhető.

(2) Mérsékelt: laterális görbület a farok hátsó részén; mindenkor észlelhető, de nem akadályozza a mozgást

(3) Súlyos: laterális görbület a farok elülső részén; VAGY a mozgást akadályozó bármely görbület; VAGY bármely dorziventrális görbület

Az US EPA FIFRA Tudományos Tanácsadó Testülete (FIFRA SAP 2013) áttekintette tizenöt, (NF szerinti 51–60+ stádiumban lévő) *X. laevis* egyedeken lefolytatott kétéltű-átalakulási vizsgálatból származó, gerincferdülésre vonatkozó összefoglaló adatokat, és általános ajánlásokat fogalmazott meg arra nézve, hogyan lehet csökkenteni a rendellenesség előfordulását a vizsgált populációban. Az ajánlások a LAGDA szempontjából is relevánsak, bár ez a vizsgálat hosszabb fejlődési szakaszt foglal magában.

Korábbi ivási teljesítmény

Általános elvként jó minőségű, egészséges felnőttekből kell kialakítani a tenyészpárokat; a gerincferdüléssel utódokat termelő tenyészpárok eltávolítása minimalizálhatja a

gerincferdülés későbbi előfordulását. Kifejezetten a vadon befogott tenyészállomány használatának visszaszorítása bizonyulhat előnyösnek. A LAGDA expozíciós időszaka az NF szerinti 8–10. stádiumban lévő embriókkal veszi kezdetét, és a vizsgálat elején nem állapítható meg, hogy az adott egyedeknél előfordul-e majd gerincferdülés. Amellett tehát, hogy a vizsgálatba felvett állatoknál nyomon követik a gerincferdülés előfordulását, dokumentálni kell a generáció korábbi teljesítményét is (azon belül a gerincferdülés fejlődő lárváknál tapasztalt gyakoriságát). Hasznos lehet az egyes generációk vizsgálatból kimaradt egyedeinek további nyomon követése, és a megfigyelések belefoglalása a jelentésbe (FIFRA SAP 2013).

Vízminőség

Fontos biztosítani a megfelelő vízminőséget, a laboratóriumi törzsállományban és a vizsgálat alatt egyaránt. A vízi toxicitási vizsgálatokban rutinszerűen értékelt vízminőségi kritériumokon túl hasznos lehet nyomon követni és kiküszöbölni a tápanyaghiányt (pl. a C-vitamin, a kalcium és a foszfor hiányát), valamint a szelén és a réz túlzott előfordulását, ami a beszámolók szerint különböző súlyosságú gerincferdülést okozott a laboratóriumban nevelt *Rana* sp. és *Xenopus* sp. fajoknál (Marshall és munkatársai 1980; Leibovitz és munkatársai 1992; Martinez és munkatársai 1992; a FIFRA SAP 2013 jelentése szerint). A megfelelő étrend biztosítása (lásd a 4. függelék) és a tartály rendszeres tisztítása általában javítja a vízminőséget és a vizsgált egyedek egészségét.

Étrend

A 4. függelék részletesen ismerteti a LAGDA során sikeresnek bizonyult étrendre vonatkozó konkrét ajánlásokat. Javasolt ellenőrizni, hogy a táplálékforrások nem tartalmaznak-e biotoxinokat, gyomirtó szereket és egyéb növényvédő szereket, amelyről ismert, hogy az *X. laevis* egyedekben és más vízi állatokban gerincferdülést okoznak (Schlenk és Jenkins 2013). Bizonyos kolinészteráz-gátlókkal szembeni kitettséget például összefüggésbe hozták a halaknál (Schultz és munkatársai 1985) és a békáknál (Bacchetta és munkatársai 2008) megfigyelt gerincferdüléssel.

SZAKIRODALOM

- Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, and G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. *Science of the Total Environment* 392: 110–118.
- Schultz, T.W., J.N. Dumont, and R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. *Toxicology* 36: 185–198.
- Leibovitz, H.E., D.D. Culley, and J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium

benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. Journal of the World Aquaculture Society 13: 322-328.

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

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

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