

Briuselis, 2019 m. vasario 25 d.
(OR. en)

6800/19
ADD 2

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

PRIDEDAMAS PRANEŠIMAS

nuo:	Europos Komisijos
gavimo data:	2019 m. vasario 22 d.
kam:	Tarybos generaliniam sekretoriatui
Komisijos dok. Nr.:	Annex to D060575/02
Dalykas:	[data] KOMISIJOS REGLAMENTO (ES) .../..., kuriuo, derinant prie technikos pažangos, iš dalies keičiamas Reglamento (EB) Nr. 440/2008, nustatančio bandymų metodus pagal Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH), priedas, PRIEDAS

Delegacijoms pridedamas dokumentas Annex to D060575/02.

Pridedama: Annex to D060575/02

B.71 ODOS JAUTRINIMO *IN VITRO* TYRIMAI, PER KURIUOS TIRIAMAS ODOS JAUTRINIMO NEPALANKIOS BAIGTIES KELIO (AOP) PAGRINDINIS ĮVYKIS – DENDRITINIŲ LĄSTELIŲ AKTYVINIMAS

BENDRASIS ĮVADAS

Pagrindiniu dendritinių ląstelių aktyvinimo įvykiu pagrįstas bandymo metodas

1. Odą jautrinanti medžiaga yra tokia medžiaga, kuri susilietusi su oda sukelia alerginę reakciją, kaip apibrėžta Jungtinių Tautų visuotinai suderintoje cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklavimo sistemoje (JT GHS) (1) ir Europos Sąjungos (ES) reglamente Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklavimo ir pakavimo (CLP reglamentas)¹. Dėl pagrindinių biologinių reiškinių, nuo kurių priklauso odos jautrinimas, yra visuotinai sutariama. Apibendrinus dabartines žinias apie cheminius ir biologinius mechanizmus, susijusius su odos jautrinimu, nustatytas nepalankios baigties kelias (angl. *Adverse Outcome Pathway*, AOP) pagal Ekonominio bendradarbiavimo ir plėtros organizacijos (EBPO) AOP programą (2): nuo molekulinio inicijavimo įvykio per tarpinius įvykius iki neigiamo poveikio, t. y. alerginio kontaktinio dermatito. Šiuo atveju molekulinio inicijavimo įvykis (t. y. pirmasis pagrindinis įvykis) yra kovalentinio ryšio atsiradimas tarp elektrofilinių medžiagų ir odos baltymų nukleofilinių centrų. Antrasis pagrindinis šio nepalankios baigties kelio įvykis vyksta keratinocituose ir apima uždegiminius atsakus, taip pat su specifiniais ląstelių signalizavimo keliais (tokiais kaip nuo antioksidacinio ar elektrofilinio atsako elemento (ARE) priklausomi keliai) susijusios genų ekspresijos pokyčius. Trečiasis pagrindinis įvykis yra dendritinių ląstelių aktyvinimas, paprastai vertinamas pagal specifinių ląstelių paviršinių žymenų, chemokinių ir citokinių, ekspresiją. Ketvirtasis pagrindinis įvykis yra T ląstelių aktyvinimas ir proliferacija; tai netiesiogiai vertinama atliekant pelių vietinių limfmazgių tyrimą (LLNA) (3).

¹ 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklavimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006, OL L 353/1, 2008 12 31.

2. Šis bandymų metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) 442E (2017). Pagal jį aprašyti tyrimai *in vitro* atliekami tiriant apibūdintus mechanizmus, kurie būdingi odos jautrinimo nepalankios baigties kelio pagrindiniam įvykiui – dendritinių ląstelių aktyvinimui (2). Šį bandymų metodą sudaro bandymai, naudotini siekiant pagrįsti odą jautrinančių medžiagų skyrimą nuo nejautrinančių medžiagų pagal JT GHS ir CLP sistemą.

Pagal šį bandymų metodą aprašyti bandymai yra:

- žmogaus ląstelių linijos aktyvinimo bandymas (h-CLAT);
 - U937 ląstelių linijos aktyvinimo bandymas (U-SENSTM);
 - interleukino-8 reporterinio geno tyrimas (IL-8 Luc tyrimas).
3. Į šį bandymų metodą ir į atitinkamas EBPO bandymų gaires įtraukti bandymai gali skirtis naudojama procedūra, pagal kurią gaunami duomenys, ir išmatuotais rodmenimis, bet juos galima vienodai naudoti laikantis valstybių reikalavimų pateikti bandymų rezultatus dėl odos jautrinimo nepalankios baigties kelio pagrindinio įvykio – dendritinių ląstelių aktyvinimo ir pasinaudoti EBPO savitarpio duomenų pripažinimu (angl. *Mutual Acceptance of Data*).

Į šį pagrindiniu įvykiu pagrįstą bandymų metodą įtrauktų bandymų aplinkybės ir principai

4. Odos jautrinimo vertinimas paprastai atliekamas naudojant bandomuosius gyvūnus. Klasikiniai metodai, pagal kuriuos naudojamos jūrų kiaulytės, yra Magnusson'o ir Kligman'o maksimizacijos bandymas su jūrų kiaulytėmis (GMPT) ir Buehler'io bandymas (TM B.6) (4): pagal juos vertinami odos jautrinimo indukcijos ir atsako sukėlimo tarpsniai. Atliekant bandymus su pelėmis, t. y. LLNA (TM B.42) (3) ir du jo variantus nenaudojant radioaktyviųjų medžiagų, LLNA: DA (TM B.50) (5) ir LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51) (6), visais atvejais vertinamas tik atsakas į indukciją ir jie taip pat yra pripažinti, nes pranašesni už bandymus su jūrų kiaulytėmis gyvūnų gerovės atžvilgiu ir juos atliekant objektyviai vertinamas odos jautrinimo indukcijos tarpsnis.
5. Neseniai patvirtinti *in chemico* ir *in vitro* mechanizmų tyrimais pagrįsti bandymų metodai, pagal kuriuos tiriamas odos jautrinimo nepalankios baigties kelio pirmasis pagrindinis įvykis (TM B.59; tiesioginio peptidų reaktyvumo tyrimas (7)) ir antrasis pagrindinis įvykis (TM B.60; ARE-Nrf2 liuciferazės bandymo metodas (8)), padedantys vertinti potencialų cheminių medžiagų odos jautrinimo pavojingumą.
6. Pagal šį bandymų metodą aprašytais bandymais arba kiekybiškai nustatomas vieno arba kelių ląstelių paviršinių žymenų, siejamų su monocitų ir dendritinių ląstelių aktyvinimo procesu po jautrinančių medžiagų poveikio (pvz., CD54, CD86), ekspresijos pokytis, arba

IL-8 (citokino, siejamo su dendritinių ląstelių aktyvinimu) ekspresijos pokyčiai. Pranešama, kad odą jautrinančios medžiagos sužadina ląstelių membranos žymenų, tokių kaip CD40, CD54, CD80, CD83 ir CD86, ekspresiją kartu su prouždegiminių citokinų, tokių kaip IL-1 β ir TNF- α , ir kelių chemokinų, įskaitant IL-8 (CXCL8) ir CCL3 (9) (10) (11) (12), siejamų su dendritinių ląstelių aktyvinimu, indukcija (2).

7. Tačiau kadangi dendritinių ląstelių aktyvinimas yra tik vienas iš pagrindinių odos jautrinimo nepalankios baigties kelio (AOP) įvykių (2) (13), informacijos, gautos vien bandymais, per kuriuos matuojami dendritinių ląstelių aktyvinimo žymenys, gali nepakakti, kad būtų galima daryti išvadą dėl to, ar cheminės medžiagos geba jautrinti odą, ar ne. Todėl siūloma duomenimis, gautais atlikus šiame bandymų metodo aprašyme aprašytus bandymus, papildomai pasinaudoti skiriant odą jautrinančias (t. y. JT GHS ar CLP 1 kategorijos) medžiagas nuo nejautrinančių medžiagų, naudojant juos pagal integruotuosius bandymo ir vertinimo metodus (angl. *Integrated Approaches to Testing and Assessment*, IATA) kartu su kita aktualia papildoma informacija, pvz., gauta iš tyrimų *in vitro* dėl kitų pagrindinių odos jautrinimo AOP įvykių, ir ne bandymų metodais, įskaitant cheminių analogų duomenų naudojimą (analogijos metodas) (13). Paskelbta pavyzdžių, kaip šiais bandymais gauti duomenys naudojami pagal apibrėžtuosius metodus (angl. *Defined Approaches*) – t. y. metodus, pagal kuriuos standartizuoti tiek konkretūs naudojami informacijos šaltiniai, tiek procedūra, pagal kurią, remiantis duomenimis, daromos prognozės (13), ir jie gali būti naudingi elementai IATA sistemoje.
8. Šiame bandymų metodo aprašyme aprašytais bandymais negalima atskirai remtis nei priskiriant odą jautrinančias medžiagas 1A ir 1B subkategorijoms, apibrėžtoms JT GHS arba CLP sistemoje (kai institucijos naudoja šias dvi neprivalomas subkategorijas), nei prognozuojant medžiagų jautrinimo gebą, kai reikia priimti saugos vertinimo sprendimus. Tačiau, priklausomai nuo reglamentavimo sistemos, teigiami rezultatai, gauti šiais metodais, gali būti atskirai naudojami priskiriant cheminę medžiagą prie JT GHS ar CLP 1 kategorijos medžiagų.
9. Šiame bandymų metodo aprašyme vartojamas terminas „bandomoji cheminė medžiaga“ reiškia tai, kas yra bandoma¹, ir jo reikšmė nėra susijusi su šių bandymų tinkamumu

¹ 2013 m. birželio mėn. EBPO bendrame susitikime susitarta, kad, kai įmanoma, naujose ir atnaujintose EBPO bandymų gairėse terminą „bandomoji cheminė medžiaga“ reikėtų nuosekliau vartoti tam, kas bandoma, apibūdinti.

vienkomponentėms cheminėms medžiagoms, daugiakomponentėms cheminėms medžiagoms ir (arba) mišiniams bandyti. Kol kas turima nedaug informacijos apie šių bandymų tinkamumą daugiakomponentėms medžiagoms ar mišiniams (14) (15); nepaisant to, šie bandymai yra techniškai tinkami daugiakomponentėms medžiagoms ir mišiniams bandyti. Vis dėlto, prieš taikant šį bandymų metodą mišiniui siekiant gauti duomenis numatomu reglamentavimo tikslu, reikėtų apsvarstyti, ar juo galima gauti tam tikslui tinkamus rezultatus (ir, jei taip, kodėl tai yra įmanoma)¹. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra teisės aktais nustatytas reikalavimas atlikti mišinio bandymą. Be to, atliekant daugiakomponenčių medžiagų arba mišinių bandymą reikėtų atsižvelgti į tai, kad citotoksiškos jų sudedamosios dalys gali paveikti stebimus atsakus.

¹ Šį sakinį buvo pasiūlyta įtraukti ir dėl to susitarta 2014 m. balandžio mėn. WNT darbo grupės susitikime.

LITERATŪRA

- (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. Paskelbta 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. Paskelbta [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) Šio priedo B.42 skyrius. Vietinio limfmazgio tyrimas. Šio priedo B.6 skyrius. Odos jautrinimas.
- (4) Šio priedo B.50 skyrius. Odos jautrinimas. Vietinio limfmazgio tyrimas. DA.
- (5) Šio priedo B.51 skyrius. Odos jautrinimas. Vietinio limfmazgio tyrimas. BrdU-ELISA.
- (6) Šio priedo B.59 skyrius. Odos jautrinimas *in chemico*. Tiesioginio peptidų reaktyvumo tyrimas (DPRA).
- (7) Šio priedo B.60 skyrius. Odos jautrinimas *in vitro*. ARE-Nrf2 liuciferazės bandymo metodas.
- (8) Steinman R. M. (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 L. L., 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 Z. U., Mizuashi M., Ohtani T., Yoshino Y., and Tagami H. (2003). p. 38. Mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and DNCB. *J Invest Dermatol* 120:390-8.

- (12) OECD (2016). *Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29*. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Paskelbta
<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 priedėlis

ODOS JAUTRINIMAS *IN VITRO*. ŽMOGAUS LĄSTELIŲ LINIJOS AKTYVINIMO BANDYMAS (H-CLAT)

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

1. Atliekant h-CLAT bandymą kiekybiškai nustatomi ląstelių paviršinių žymenų, siejamų su monocitų ir dendritinių ląstelių aktyvinimo procesu (t. y. CD86 ir CD54), ekspresijos pokyčiai žmogaus monocitinės leukemijos ląstelių linijos THP-1 ląstelėse, jas paveikus jautrinančiomis medžiagomis (1) (2). Išmatuoti ląstelių paviršinių žymenų CD86 ir CD54 ekspresijos lygiai naudojami tam, kad padėtų atskirti odą jautrinančias ir jos nejautrinančias medžiagas.
2. Bandymas h-CLAT įvertintas atlikus Europos Sąjungos bandymų su gyvūnais alternatyvų etaloninės laboratorijos (EURL ECVAM) koordinuojamą jo tinkamumo patvirtinimo tyrimą ir paskesnę nepriklausomą ekspertizę, kurią atliko EURL ECVAM mokslinis patariamasis komitetas (ESAC). Atsižvelgus į visus turimus įrodymus ir į reguliavimo institucijų bei suinteresuotųjų subjektų nuomones, bandymas h-CLAT buvo EURL ECVAM rekomenduotas (3) naudoti kaip IATA dalis, kad padėtų skirti odą jautrinančias ir nejautrinančias medžiagas siekiant jas klasifikuoti pagal pavojingumą ir atitinkamai ženklinti. Bandymo h-CLAT duomenų naudojimo kartu su kita informacija pavyzdžių pateikta literatūroje (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).
3. Įrodyta, kad metodą h-CLAT galima pritaikyti laboratorijose, turinčiose ląstelių kultūrų auginimo metodų naudojimo ir tėkmės citometrinės analizės atlikimo patirties. Tikėtinas prognozių laboratorinio ir tarplaboratorinio atkuriamumo lygis atliekant šį bandymą yra apie 80 % (3) (12). Iš rezultatų, gautų atlikus tinkamumo patvirtinimo tyrimą (13) ir kitus paskelbtus tyrimus (14), apskritai matyti, kad, palyginti su LLNA rezultatais, odą jautrinančių (t. y. JT GHS ar CLP 1 kategorijos) ir nejautrinančių medžiagų skyrimo tikslumas yra 85 % (N = 142), esant 93 % (94/101) jautriui ir 66 % (27/41) specifiškumui (remiantis EURL ECVAM pakartotine analize (12), atsižvelgiant į visus esamus duomenis ir neatsižvelgiant į neigiamus rezultatus cheminių medžiagų, kurių Log K_{ow} didesnis nei 3,5, kaip aprašyta 4 punkte), atveju. Klaidingai neigiamos prognozės atliekant bandymą h-CLAT yra labiau tikėtinos tų cheminių medžiagų, kurių odos jautrinimo geba yra maža arba vidutinė (t. y. JT GHS ar CLP 1B subkategorijos medžiagų) atveju, negu tų cheminių medžiagų, kurių odos jautrinimo geba yra didelė (t. y. JT GHS ar CLP 1A subkategorijos) (4) (13) (15). Iš visos šios informacijos yra aiškus h-CLAT metodo naudingumas padedant nustatyti odos jautrinimo pavojus. Vis dėlto čia pateiktos tikslumo

vertės, kai h-CLAT atliekamas kaip atskiras bandymas, yra tik orientacinės, nes šio bandymo duomenis IATA kontekste reikėtų vertinti kartu su informacija iš kitų šaltinių ir atsižvelgti į bendrojo įvado 7 ir 8 punktuose pateiktas nuostatas. Be to, vertinant odos jautrinimo bandymų ne su gyvūnais metodus, reikėtų turėti omenyje, kad LLNA bandymas ir kiti bandymai su gyvūnais gali nevisiškai tiksliai parodyti su žmonėmis susijusią padėtį.

4. Remiantis šiuo metu turimais duomenimis, įsitikinta, kad h-CLAT metodas tinka bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurių organinės funkcinės grupės, reakcijos mechanizmai, odos jautrinimo geba (kaip nustatyta atliekant *in vivo* tyrimus), fizikinės ir cheminės savybės yra įvairūs (3) (14) (15). Metodas h-CLAT tinka bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios yra tirpios arba sudaro stabilią dispersiją (t. y. koloidus ar suspensijas, iš kurių bandomoji cheminė medžiaga neiškrenta į nuosėdas ir nesudaro su tirpikliu ar nešikliu skirtingų fazių) tinkamame tirpiklyje ar nešiklyje (žr. 14 punktą). Klaidingai neigiamų rezultatų paprastai gaunama tada, kai bandomųjų cheminių medžiagų Log K_{ow} didesnis nei 3,5 (14), todėl nereikėtų atsižvelgti į gautus neigiamus rezultatus, kai bandomųjų cheminių medžiagų Log K_{ow} yra didesnis nei 3,5. Tačiau teigiami rezultatai, gauti, kai bandomųjų cheminių medžiagų Log K_{ow} yra didesnis nei 3,5, vis tiek galėtų būti naudojami tam, kad padėtų nustatyti, kad bandomoji cheminė medžiaga yra odą jautrinanti medžiaga. Be to, dėl ribotos metabolinės gebos, būdingos naudojamai ląstelių linijai (16), ir dėl šio bandymo sąlygų, tiriant prohaptenus (t. y. medžiagas, kurias būtina aktyvinti fermentais, pvz., P450 fermentais) ir prehaptenus (t. y. medžiagas, kurios aktyvinamos oksidacija), ypač kai oksidacija vyksta lėtai, taip pat galima gauti neigiamus rezultatus atliekant h-CLAT bandymą (15). Fluorescuojančios bandomosios cheminės medžiagos gali būti vertinamos pagal metodą h-CLAT (17), tačiau stipriai fluorescuojančios bandomosios cheminės medžiagos, kurių skleidžiamų bangų ilgis toks pat kaip fluoresceino izotiocianato (FITC) ar propidiumo jodido (PI), interferuos atliekant tėkmės citometriją, todėl neįmanoma jų tiksliai įvertinti naudojant FITC konjuguotus antikūnus ar PI. Tokiu atveju gali būti atitinkamai naudojami kiti fluorochromu žymėti antikūnai arba kiti citotoksiškumo žymenys, jei galima įrodyti, kad juos naudojant gaunami panašūs rezultatai kaip ir naudojant FITC žymėtus antikūnus (žr. 24 punktą) arba PI (žr. 18 punktą), pvz., atliekant 1.2 priedėlyje nurodytą kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų bandymus. Atsižvelgiant į tai, kas išdėstyta, neigiami rezultatai turėtų būti aiškinami atsižvelgiant į nustatytus apribojimus ir kartu remiantis kitais informacijos šaltiniais IATA sistemoje. Tais atvejais, kai yra įrodymų, kad h-CLAT metodas netinkamas taikyti kitų konkrečių kategorijų bandomosioms cheminėms medžiagoms, jo nereikėtų taikyti tų konkrečių kategorijų medžiagoms.

5. Kaip aprašyta pirmiau, h-CLAT metodas padeda skirti odą jautrinančias medžiagas nuo nejautrinančių medžiagų; tačiau jis taip pat gali padėti vertinti jautrinimo gebą (4) (5) (9), kai taikomas pagal integruotuosius metodus, tokius kaip IATA. Vis dėlto, siekiant nustatyti, kaip h-CLAT rezultatais būtų galima pagrįsti jautrinimo gebos vertinimą, būtina darbuotis toliau (geriausia remiantis duomenimis apie žmones).
6. Terminų apibrėžtys pateiktos 1.1 priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAS

7. h-CLAT metodas yra tyrimas *in vitro*, kurį atliekant kiekybiškai nustatomi ląstelių paviršinių žymenų ekspresijos (t. y. CD86 ir CD54) pokyčiai žmogaus monocitinės leukemijos ląstelių linijos (THP-1 ląstelėse) po 24 valandų veikimo bandomąja chemine medžiaga. Šios paviršinės molekulės yra tipiniai monocitinių THP-1 ląstelių aktyvinimo žymenys ir gali atkartoti dendritinių ląstelių aktyvinimą, kuris yra ypač svarbus T ląstelių aktyvinimui. Paviršinių žymenų ekspresijos pokyčiai matuojami tėkmės citometrijos būdu, prieš tai nudažius ląsteles fluorochromu žymėtais antikūnais. Kartu atliekamas ir citotoksiškumo matavimas, vertinant, ar paviršinių žymenų ekspresijos didinimas vyksta esant mažesnėms nei citotoksiškos koncentracijoms. Santykinis paviršinių žymenų fluorescencijos intensyvumas, palyginti su tirpiklio ar nešiklio kontroliniu bandiniu, apskaičiuojamas ir naudojamas pagal prognozavimo modelį (žr. 26 punktą), kad padėtų atskirti jautrinančias ir nejautrinančias medžiagas.

KVALIFIKACIJOS ĮRODYMAS

8. Prieš pradėdamos įprastai atlikti šiame priedėlyje aprašytą bandymą pagal bandymo metodą B.71, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją naudodamos 10 kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų, kurių sąrašas pateiktas 1.2 priedėlyje. Be to, šio bandymo naudotojai turėtų turėti ankstesnių duomenų bazę, kurioje būtų kaupiami duomenys, gauti atliekant reaktyvumo patikrinimus (žr. 11 punktą) ir naudojant teigiamus bei tirpiklio ar nešiklio kontrolinius bandinius (žr. 20–22 punktus), ir šiais duomenimis naudotis, kad patvirtintų tolesnį šio bandymo atkuriamumą savo laboratorijoje laikui bėgant.

PROCEDŪRA

9. Šis bandymas pagrįstas h-CLAT DB-ALM (angl. *DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation* – bandymams su gyvūnais alternatyvių metodų duomenų bazės paslauga) protokolu Nr. 158 (18) – šis protokolas naudotas atliekant EURL

ECVAM koordinuotą tinkamumo patvirtinimo tyrimą. Rekomenduojama taikyti šį protokolą diegiant ir naudojant h-CLAT metodą laboratorijoje. Toliau aprašyti pagrindiniai komponentai ir procedūros pagal h-CLAT metodą, kuris susideda iš dviejų etapų: *dozės nustatymo tyrimo* ir *CD86/CD54 ekspresijos vertinimo*.

Ląstelių paruošimas

10. Atliekant bandymą pagal h-CLAT metodą turėtų būti naudojama žmogaus monocitinės leukemijos ląstelių linija THP-1. Patartina, kad ląstelės (TIB-202™) būtų gautos iš kvalifikuoto ląstelių banko, tokio kaip „American Type Culture Collection“.
11. THP-1 ląstelės auginamos 37 °C temperatūroje, esant 5 % CO₂ ir drėgnai atmosferai, terpėje RPMI-1640, papildytoje 10 % galvijų vaisiaus serumo (FBS), 0,05 mM 2-merkaptoetanolio, 100 vnt./ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino. Auginimo terpėje galima ir nenaudoti penicilino ir streptomicino, tačiau tokiu atveju naudotojai turėtų įsitikinti, jog tai, kad auginimo terpėje nėra antibiotikų, neturi poveikio rezultatams, pavyzdžiui, atlikdami 1.2 priedėlyje nurodytą kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų bandymus. Bet kokių atveju, siekiant kuo labiau sumažinti užkrėtimo riziką, reikėtų laikytis gerosios ląstelių auginimo praktikos nepriklausomai nuo to, ar ląstelių auginimo terpėje yra antibiotikų, ar ne. THP-1 ląstelės reguliariai sėjamos kas 2–3 dienas nuo 0,1 iki $0,2 \times 10^6$ ląstelių/ml tankiu. Jų tankis turėtų būti palaikomas nuo 0,1 iki $1,0 \times 10^6$ ląstelių/ml intervale. Prieš naudojant ląsteles bandymui, reikėtų patikrinti jų tinkamumą, atliekant reaktyvumo patikrinimą. Ląstelių reaktyvumo patikrinimas turėtų būti atliekamas praėjus dviem savaitėms po atitirpinimo, naudojant teigiamus kontrolinius bandinius su 2,4-dinitrochlorbenzenu (DNCB) (CAS Nr. 97-00-7, ≥ 99 % grynumo) ir nikelio sulfatu (NiSO₄) (CAS Nr. 10101-97-0, ≥ 99 % grynumo) ir neigiamą kontrolinį bandinį su pieno rūgštimi (CAS Nr. 50-21-5, ≥ 85 % grynumo). Naudojant ir DNBCB, ir NiSO₄ turėtų būti gauti teigiami ir CD86, ir CD54 ląstelių paviršinių žymenų atsakai, o naudojant pieno rūgštį turėtų būti gauti neigiami atsakai ir CD86, ir CD54 ląstelių paviršinių žymenų atveju. Tyrimui turi būti naudojamos tik tokios ląstelės, kurių reaktyvumo patikrinimas atliktas. Ląsteles galima dauginti ne ilgiau kaip du mėnesius po atitirpinimo. Sėjimų skaičius neturėtų viršyti 30. Reaktyvumo patikrinimas turėtų būti atliekamas pagal 20–24 punktuose aprašytas procedūras.
12. Bandymui THP-1 ląstelės sėjamos $0,1 \times 10^6$ ląstelių/ml arba $0,2 \times 10^6$ ląstelių/ml tankiu ir jų kultūra iš anksto ruošama auginimo kolbose atitinkamai 72 valandas arba 48 valandas. Svarbu, kad ląstelių tankis auginimo kolboje iškart po kultūros paruošimo periodo būtų kuo pastovesnis atliekant kiekvieną bandymą (renkantis vieną iš dviejų pirmiau apibūdintų kultūros paruošimo sąlygų), nes ląstelių tankis auginimo kolboje iškart po kultūros

paruošimo gali turėti įtakos CD86/CD54 ekspresijai, sukeliamai alergenų (19). Bandymo dieną iš auginimo kolbos surinktos ląstelės resuspenduojamos naujoje auginimo terpėje 2×10^6 ląstelių/ml tankiu. Tada ląstelės paskirstomos 24 duobučių plokščiadugnėje mikrotitravimo plokštelėje, kurios duobučių tūris 500 μ l (1×10^6 ląstelių į kiekvieną duobutę), arba 96 duobučių plokščiadugnėje plokštelėje, kurios duobučių tūris 80 μ l ($1,6 \times 10^5$ ląstelių į kiekvieną duobutę).

Dozės nustatymo tyrimas

13. *Dozės nustatymo tyrimas* atliekamas siekiant nustatyti CV75 – bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją, kuriai esant ląstelių gyvybingumas (angl. CV) yra 75 %, palyginti su tirpiklio ar nešiklio kontroliniu bandiniu. CV75 vertė naudojama nustatant bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijos vertę, tinkamą CD86/CD54 ekspresijai matuoti (žr. 20–24 punktus).

Bandomųjų cheminių medžiagų ir kontrolinių medžiagų paruošimas

14. Bandomosios cheminės medžiagos ir kontrolinės medžiagos ruošiamos bandymo dieną. Pagal h-CLAT metodą bandomosios cheminės medžiagos ištirpinamos arba stabiliai disperguojamos (taip pat žr. 4 punktą) fiziologiniame tirpale ar terpėje (šiems tirpikliams ar nešikliams teikiama pirmenybė) arba dimetilsulfoksido (DMSO, ≥ 99 % grynumo), kuris yra antras galimas tirpiklis ar nešiklis, jei bandomoji cheminė medžiaga nėra tirpi arba nesudaro stabilios dispersijos dviejuose pirmiau minėtuose tirpikliuose ar nešikliuose; atitinkamos galutinės koncentracijos yra 100 mg/ml (fiziologiniame tirpale ar terpėje) arba 500 mg/ml (DMSO). Kiti čia neminėti tirpikliai ar nešikliai gali būti naudojami, jei pateikiamas pakankamas mokslinis to pagrindimas. Reikėtų atsižvelgti į bandomosios cheminės medžiagos stabilumą galutiniame tirpiklyje ar nešiklyje.
15. Pradedant nuo 100 mg/ml (fiziologiniame tirpale ar terpėje) ar 500 mg/ml (DMSO) bandomųjų cheminių medžiagų pradinių tirpalų, jų skiedimo eiga turėtų būti tokia:
 - kai naudojamas tirpiklis ar nešiklis yra fiziologinis tirpalas arba terpė, paruošiami aštuoni (aštuonių koncentracijų) pradiniai tirpalai skiedžiant serijiniu būdu po 2 kartus, naudojant atitinkamą tirpiklį ar nešiklį. Tada šie pradiniai tirpalai papildomai 50 kartų praskiedžiami auginimo terpe (darbiniai tirpalai). Jei didžiausia galutinė koncentracija 1 000 μ g/ml plokštelėje nėra toksiška, reikėtų pakartotinai nustatyti didžiausią koncentraciją, atliekant naują citotoksiškumo bandymą. Galutinė bandomųjų cheminių medžiagų, ištirpintų arba stabiliai disperguotų fiziologiniame tirpale ar terpėje, koncentracija plokštelėje neturėtų viršyti 5 000 μ g/ml;

- kai naudojamas tirpiklis ar nešiklis yra DMSO, paruošiami aštuoni (aštuonių koncentracijų) pradiniai tirpalai skiedžiant serijiniu būdu po 2 kartus, naudojant atitinkamą tirpiklį ar nešiklį. Tada šie pradiniai tirpalai papildomai 250 kartų praskiedžiami auginimo terpe (darbiniai tirpalai). Galutinė koncentracija mikrotitravimo plokštelėje neturėtų viršyti 1 000 µg/ml, net jei ši koncentracija nėra toksiška.

Šie darbiniai tirpalai galiausiai naudojami veikimui bandomąja chemine medžiaga tirti, įpilant tiek darbinio tirpalo į THP-1 ląstelių suspensiją plokštelėje, kad jo tūris būtų toks pat kaip ląstelių suspensijos (taip pat žr. 17 punktą), taip dar du kartus jį praskiedžiant (paprastai galutinis koncentracijos verčių intervalas plokštelėje yra 7,81–1 000 µg/ml).

16. Pagal h-CLAT metodą tirpiklio ar nešiklio kontroliniam bandiniui naudojama kultūros auginimo terpė (bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios yra soliubilizuojamos ar stabiliai disperguojamos (žr. 4 punktą) terpėje ar fiziologiniame tirpale) arba DMSO (bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios soliubilizuojamos ar stabiliai disperguojamos DMSO), bandymui naudojant vienintelę galutinę 0,2 % koncentraciją plokštelėje. Skiedžiama taip pat, kaip ir darbiniai tirpalai, kaip aprašyta 15 punkte.

Bandomųjų cheminių medžiagų ir kontrolinių medžiagų įterpimas

17. Auginimo terpė arba darbiniai tirpalai, aprašyti 15 ir 16 punktuose, sumaišomi santykiu 1:1 (tūrio) su ląstelių suspensijomis, paruoštomis 24 arba 96 duobučių plokščiadugnėje mikrotitravimo plokštelėje (žr. 12 punktą). Paruoštos plokštelės $24 \pm 0,5$ val. inkubuojamos 37 °C temperatūroje, esant 5 % CO₂. Reikėtų imtis atsargumo priemonių, kad būtų išvengta lakiųjų bandomųjų cheminių medžiagų garavimo ir kryžminio užteršimo bandomosiomis cheminėmis medžiagomis tarp duobučių, pvz., sandariai uždengiant plokštelę, prieš ją inkubuojant su bandomosiomis cheminėmis medžiagomis (20).

Dažymas propidiumo jodidu (PI)

18. Po $24 \pm 0,5$ val. veikimo bandomąja chemine medžiaga ląstelės perkeliama į mėgintuvėlius ir surenkamos centrifuguojant. Paviršinis skystis (supernatantas) pašalinamas, o likusios ląstelės resuspenduojamos 200 µl (jei naudojama 96 duobučių plokštelė) arba 600 µl (jei naudojama 24 duobučių plokštelė) fosfatinio buferinio druskų tirpalo, kuriame yra 0,1 % galvijų serumo albumino (dažymo buferinis tirpalas). 200 µl ląstelių suspensijos perkeliama į 96 duobučių gaubtadugnę mikrotitravimo plokštelę (jei naudojamos 96 duobutės) arba į mikromėgintuvėlį (jei naudojamos 24 duobutės) ir dukart perplaunama 200 µl (jei naudojamos 96 duobutės) ar 600 µl (jei naudojamos 24 duobutės) dažymo buferinio tirpalo. Galiausiai ląstelės resuspenduojamos dažymo buferiniame tirpale (pvz., 400 µl) ir pridedama PI tirpalo (pvz., 20 µl) (pavyzdžiui, galutinė PI koncentracija yra 0,625 µg/ml). Kitos citotoksiškumo žymėjimo medžiagos, tokios kaip 7-

aminoaktinomicinas D (7-AAD), tripano mėlis ar kt., gali būti naudojamos, jei galima įrodyti, kad alternatyviais dažais gaunami panašūs rezultatai kaip ir PI, pavyzdžiui, atliekant 1.2 priedėlyje nurodytą kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų bandymus.

Citotoksiškumo matavimas tėkmės citometrijos būdu ir CV75 vertės nustatymas

19. PI sugertis analizuojama tėkmės citometrijos metodu, naudojant duomenų gavimo kanalą FL-3. Iš viso gaunama 10 000 gyvų ląstelių (PI neigiamas). Ląstelių gyvybingumą galima apskaičiuoti naudojant toliau pateiktą lygtį pagal citometrinės analizės programą. Kai ląstelių gyvybingumas yra mažas, turėtų būti gauta iki 30 000 ląstelių, įskaitant negyvas ląsteles. Kitu būdu duomenis galima gauti per vieną minutę po analizės pradžios.

$$CL_{\text{ląstelių gyvybingumas}} = \frac{\text{gyvų ląstelių skaičius}}{\text{bendras gautų ląstelių skaičius}} \times 100$$

CV75 vertė (žr. 13 punktą), t. y. koncentracija, kuriai esant išgyvena 75 % THP-1 ląstelių (25 % citotoksiškumas), apskaičiuojama logaritminiu tiesiniu interpoliavimu pagal šią lygtį:

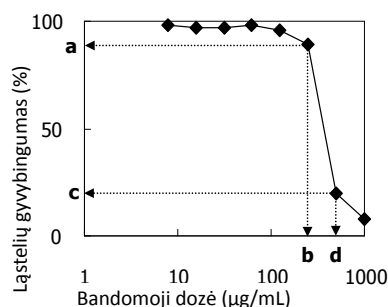
$$\text{Log CV75} = \frac{(75-c) \times \text{Log}(b) - (75-a) \times \text{Log}(d)}{a-c}$$

kurioje:

a – mažiausia ląstelių gyvybingumo vertė virš 75 %,

c – didžiausia ląstelių gyvybingumo vertė žemiau 75 %,

b ir d – atitinkamos koncentracijos, kurioms esant gautos ląstelių gyvybingumo vertės a ir c.



CV75 vertė gali būti gaunama ir kitais metodais, jei įrodoma, kad tai neturi poveikio rezultatams (pvz., atliekant kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų bandymus).

CD86/CD54 ekspresijos matavimas

Bandomųjų cheminių medžiagų ir kontrolinių medžiagų paruošimas

20. Bandomosios cheminės medžiagos ištirpinamos arba stabiliai disperguojamos naudojant tinkamą tirpiklį ar nešiklį (fiziologinį tirpalą, terpę arba DMSO; žr. 14 punktą). Bandomosios cheminės medžiagos visų pirma praskiedžiamos iki tokios koncentracijos, kuri yra 100 kartų (jei naudojamas fiziologinis tirpalas ar terpė) arba 500 kartų (jei naudojamas DMSO) didesnė nei $1,2 \times CV75$ vertė, nustatyta atliekant *dozės nustatymo tyrimą* (žr. 19 punktą). Jei CV75 nustatyti neįmanoma (t. y. jei per *dozės nustatymo tyrimą* nenustatoma pakankamo citotoksiškumo), kaip pradinę koncentraciją reikėtų naudoti didžiausią ištirpintos ar stabiliai disperguotos bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją, paruoštą naudojant kiekvieną atitinkamą tirpiklį ar nešiklį. Įsidėmėtina, kad galutinė koncentracija plokštelėje neturėtų viršyti 5 000 µg/ml (jei naudojamas fiziologinis tirpalas ar terpė) arba 1 000 µg/ml (jei naudojamas DMSO). Tada paruošiamos po 1,2 karto praskiestų tirpalų serijos naudojant atitinkamą tirpiklį ar nešiklį, taip gaunant pradinius tirpalus (aštuonių koncentracijų nuo $100 \times 1,2 \times CV75$ iki $100 \times 0,335 \times CV75$ (naudojant fiziologinį tirpalą ar terpę) arba nuo $500 \times 1,2 \times CV75$ iki $500 \times 0,335 \times CV75$ (naudojant DMSO)), kurie bus naudojami bandymui pagal h-CLAT metodą (žr. DB-ALM protokole Nr. 158 pateiktą dozavimo schemos pavyzdį). Tada pradiniai tirpalai praskiedžiami dar 50 kartų (jei naudojamas fiziologinis tirpalas ar terpė) arba 250 kartų (jei naudojamas DMSO) auginimo terpe (darbiniai tirpalai). Šie darbiniai tirpalai galiausiai naudojami veikimui bandomąja chemine medžiaga tirti, dar kartą galutinai du kartus juos praskiedžiant plokštelėje. Jei rezultatai neatitinka 29 ir 30 punktuose apibūdintų priimtimumo kriterijų dėl ląstelių gyvybingumo, *dozės nustatymo tyrimas* gali būti pakartotas, nustatant tikslesnę CV75 vertę. Įsidėmėtina, kad CD86/CD54 ekspresijos matavimui galima naudoti tik 24 duobučių mikrotitravimo plokšteles.
21. Tirpiklio ar nešiklio kontrolinis bandinys paruošiamas taip, kaip aprašyta 16 punkte. Pagal h-CLAT metodą naudojamas teigiamas kontrolinis bandinys su DNCB (žr. 11 punktą), kurio pradiniai tirpalai paruošiami naudojant DMSO ir praskiedžiami taip, kaip aprašyta 20 punkte dėl pradinių tirpalų. DNCB, kaip teigiamas kontrolinis bandinys atliekant *CD86/CD54 ekspresijos matavimą*, turėtų būti naudojamas vienos galutinės koncentracijos (paprastai 4,0 µg/ml) plokštelėje. Siekiant plokštelėje gauti DNCB 4,0 µg/ml koncentraciją, paruošiamas DNCB 2 mg/ml pradinis tirpalas naudojant DMSO ir dar 250 kartų praskiedžiamas auginimo terpe, gaunant 8 µg/ml darbinį tirpalą, arba kaip teigiamo kontrolinio bandinio koncentraciją galima rinktis DNCB CV75 vertę, nustatytą kiekvienoje bandymų laboratorijoje. Galima naudoti ir kitokius tinkamus teigiamus kontrolinius bandinius, jei yra ankstesnių duomenų, iš kurių būtų galima nustatyti panašius bandymo eigos priimtimumo kriterijus. Teigiamų kontrolinių bandinių vienintelė galutinė koncentracija plokštelėje neturėtų viršyti 5 000 µg/ml (jei naudojamas fiziologinis tirpalas

ar terpė) arba 1 000 µg/ml (jei naudojamas DMSO). Bandymo eigos priimtumo kriterijai yra tokie patys kaip tie nurodyti kriterijai, kurie skirti bandomajai cheminei medžiagai (žr. 29 punktą), išskyrus paskutinį priimtumo kriterijų, nes bandymui naudojamas tik vienos koncentracijos teigiamas kontrolinis bandinys.

Bandomųjų cheminių medžiagų ir kontrolinių medžiagų įterpimas

22. Siekiant gauti prognozę dėl kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos ir kontrolinės medžiagos, reikia atlikti vieną bandymą. Kiekvieną bandymą sudaro bent du atskiri *CD86/CD54 ekspresijos matavimo* ciklai (žr. 26–28 punktus). Kiekvienas atskiras ciklas atliekamas vis kitą dieną, arba tą pačią dieną su sąlyga, kad kiekvienam ciklui: a) paruošiami atskiri nauji bandomosios cheminės medžiagos pradiniai tirpalai ir darbiniai tirpalai bei antikūnų tirpalai ir b) naudojamos atskirai surinktos ląstelės (t. y. ląstelės surenkamos iš skirtingų auginimo kolbų), tačiau tai gali būti ir to paties sėjimo ląstelės. Paruošti bandomųjų cheminių medžiagų ir kontrolinių medžiagų darbiniai tirpalai (500 µl) sumaišomi su 500 µl ląstelių suspensijos (1×10^6 ląstelių) santykiu 1:1, tada ląstelės inkubuojamos $24 \pm 0,5$ val., kaip aprašyta 20 ir 21 punktuose. Kiekvienam ciklui pakanka vieno kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos ir kontrolinės medžiagos kartotinio bandinio, nes prognozė daroma remiantis bent dviem atskirais bandymo ciklais.

Ląstelių dažymas ir analizė

23. Po $24 \pm 0,5$ val. veikimo bandomąja chemine medžiaga ląstelės perkeliama iš 24 duobučių plokštelės į mėgintuvėlius, surenkamos centrifuguojant ir dukart perplaunamos 1 ml dažymo buferinio tirpalo (jei reikia, galima plauti papildomai). Po plovimo ląstelės blokuojamos 600 µl blokuojančiojo tirpalo (dažymo buferinio tirpalo, kuriame yra 0,01 % (m/V) globulino (Cohn'o frakcijos II, III, žmogaus; SIGMA, #G2388-10G ar analogiško)), ir 15 min. inkubuojamos 4 °C temperatūroje. Po blokavimo ląstelės išskirstomos į tris alikvotines dalis po 180 µl 96 duobučių gaubtadugnėje mikrotitravimo plokštelėje ar mikromėgintuvėlyje.
24. Po centrifugavimo ląstelės nudažomos naudojant 50 µl FITC ženklintų anti-CD86, anti-CD54 ar pelės IgG1 (izotipo) antikūnų 30 min. 4° C temperatūroje. Turėtų būti naudojami antikūnai, aprašyti h-CLAT DB-ALM protokole Nr. 158 (18), praskiedžiant dažymo buferiniu tirpalu santykiu 3:25 (tūrio) (CD86 („BD-PharMingen“, #555657; klonas Fun-1)) arba santykiu 3:50 (tūrio) (CD54 (DAKO, #F7143; klonas 6.5B5) ir IgG1 (DAKO, #X0927)). Šie antikūnų skiedimo koeficientai šio bandymo kūrėjų nustatyti tokie, kad signalo ir triukšmo santykis būtų geriausias. Iš šio bandymo kūrėjų patirties žinoma, kad įvairių partijų antikūnų fluorescencijos intensyvumas paprastai yra pastovus, tačiau

naudotojai gali rinktis titruoti antikūnus savo laboratorijos sąlygomis, kad nustatytų tinkamiausias naudoti koncentracijas. Kitus fluorochromu žymėtus anti-CD86 ir (arba) anti-CD54 antikūnus galima naudoti, jei galima įrodyti, kad gaunami panašūs rezultatai kaip ir naudojant FITC konjuguotus antikūnus, pavyzdžiui, atliekant 1.2 priedėlyje nurodytą kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų bandymus. Įsidėmėtina, kad jei pakeičiamas antikūnų klonas arba tiekėjas, nurodytas h-CLAT DB-ALM protokole Nr. 158 (18), tai gali turėti įtakos rezultatams. Ląstelės, du arba daugiau kartų perplautos 150 µl dažymo buferinio tirpalo, resuspenduojamos dažymo buferiniame tirpale (pvz., 400 µl) ir pridedama PI tirpalo (pvz., 20 µl, gaunant galutinę 0,625 µg/ml koncentraciją) ar kito citotoksiškumo žymens tirpalo (žr. 18 punktą). CD86 ir CD54 ekspresijos lygiai ir ląstelių gyvybingumas analizuojami naudojant tėkmės citometrijos metodą.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Duomenų vertinimas

25. CD86 ir CD54 ekspresija analizuojama tėkmės citometrijos metodu, naudojant duomenų gavimo kanalą FL-1. Remiantis fluorescencijos intensyvumo geometriniu vidurkiu (vidutinis fluorescencijos intensyvumas, VFI), teigiamo kontrolinio bandinio (kontr.) ląstelių ir bandomosios cheminės medžiagos paveiktų ląstelių CD86 ir CD54 santykinis fluorescencijos intensyvumas (SFI) apskaičiuojamas pagal šią lygtį:

$$RFI = \frac{\text{Chem. medž. paveiktų ląstelių VFI} - \text{chem. medž. paveiktų izotipo kontrol. ląstelių VFI}}{\text{Tirpiklio ar nešiklio kontrol. ląstelių VFI} - \text{tirpiklio ar nešiklio izotipo kontrol. ląstelių VFI}} \times 100$$

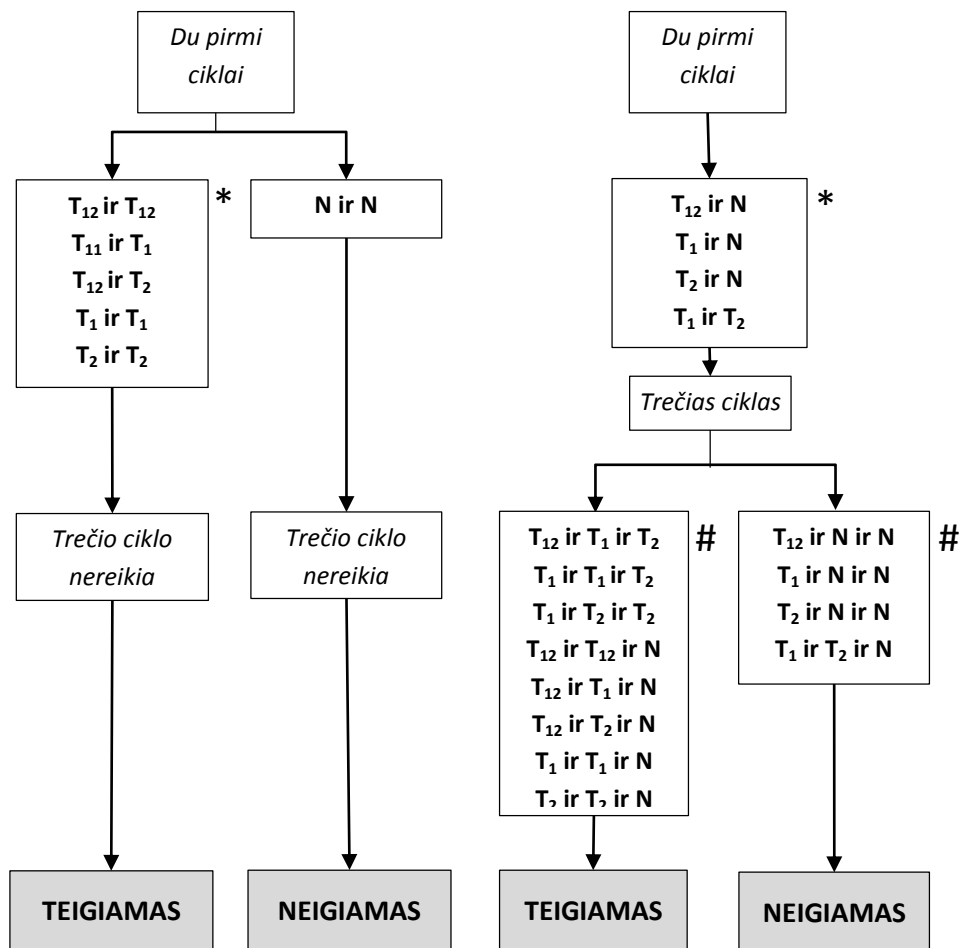
Izotipo kontrolinio bandinio (kontr.) ląstelių (nudažytų pelės IgG1 (izotipo) antikūnais) gyvybingumas taip pat apskaičiuojamas pagal lygtį, pateiktą 19 punkte.

Prognozavimo modelis

26. Atliekant *CD86/CD54* ekspresijos matavimą, kiekviena bandomoji cheminė medžiaga bandoma bent per du atskirus bandymo ciklus, gaunant vieną prognozę (TEIGIAMA arba NEIGIAMA). Pagal h-CLAT metodą prognozė laikoma TEIGIAMA, jei per 2 iš 2 ar bent 2 iš 3 atskirų bandymo ciklų tenkinama bent viena iš toliau nurodytų sąlygų; kitu atveju h-CLAT prognozė laikoma NEIGIAMA (1 diagrama):
- CD86 SFI yra lygus 150 % arba didesnis esant bet kuriai bandomajai koncentracijai (ląstelių gyvybingumas ≥ 50 %);
 - CD54 SFI yra lygus 200 % arba didesnis esant bet kuriai bandomajai koncentracijai (ląstelių gyvybingumas ≥ 50 %).

27. Remiantis tuo, kas išdėstyta, jei per abu pirmus bandymo ciklus gaunami teigiami rezultatai dėl CD86 ir (arba) per abu ciklus gaunami teigiami rezultatai dėl CD54, h-CLAT prognozė laikoma TEIGIAMA ir trečio ciklo atlikti nereikia. Panašiai ir tada, kai per pirmus du ciklus gaunami neigiami rezultatai dėl abiejų žymenų, h-CLAT prognozė laikoma NEIGIAMA (tinkamai atsižvelgiant į 30 punkto nuostatas) ir trečio ciklo nereikia. Tačiau jei per pirmus du ciklus gauti rezultatai nesutampa dėl bent vieno iš žymenų (CD54 arba CD86), reikia trečio bandymo ciklo, ir galutinė prognozė bus pagrįsta visų trijų atskirų ciklų rezultatų dauguma (t. y. 2 iš 3). Šiuo atžvilgiu reikėtų pažymėti, kad jei atliekami du atskiri bandymo ciklai ir per vieną iš jų gaunamas teigiamas rezultatas tik dėl CD86 (toliau – T_1), o per kitą – teigiamas rezultatas tik dėl CD54 (toliau – T_2), reikia trečio bandymo ciklo. Jei per šį trečią ciklą gaunami neigiami rezultatai dėl abiejų žymenų (toliau – N), h-CLAT prognozė laikoma NEIGIAMA. Kita vertus, jei per trečią ciklą gaunamas teigiamas rezultatas dėl bet kurio žymens (T_1 arba T_2) ar dėl abiejų žymenų (toliau – T_{12}), h-CLAT prognozė laikoma TEIGIAMA.

1 diagrama. Prognozavimo modelis, naudojamas pagal h-CLAT metodą. Gautą h-CLAT prognozę reikėtų vertinti remiantis IATA sistema ir laikantis bendrojo įvado 7 ir 8 punktų nuostatos.



T₁ – bandymo ciklas, kuriame gautas tik CD86 teigiamas rezultatas; T₂ – bandymo ciklas, kuriame gautas tik CD54 teigiamas rezultatas; T₁₂ – bandymo ciklas, kuriame gauti ir CD86, ir CD54 teigiami rezultatai; N – bandymo ciklas, kuriame negauta nei CD86, nei CD54 teigiamo rezultato.

Ženklu * pažymėtuose langeliuose parodyti atitinkami abiejų pirmų ciklų rezultatų deriniai, nepriklausomai nuo to, kokia eilės tvarka gali būti gauti tie rezultatai.

Ženklu # pažymėtuose langeliuose parodyti atitinkami visų trijų ciklų rezultatų deriniai, remiantis per pirmus du ciklus gautais rezultatais, parodytais aukščiau esančiame langelyje, nepriklausomai nuo to, kokia eilės tvarka gali būti gauti tie rezultatai.

28. Kai per h-CLAT bandymą prognozės dėl bandomųjų cheminių medžiagų yra TEIGIAMOS, galima (nebūtinai) nustatyti dvi efektyviųjų koncentracijų (EC) vertes – CD86 žymens EC150 vertę ir CD54 žymens EC200 vertę, t. y. koncentraciją, kuriai esant bandomųjų cheminių medžiagų santykinis fluorescencijos intensyvumas (SFI) yra 150 arba

200. Šios EC vertės galėtų padėti įvertinti jautrinimo gebą (9), naudojant jas pagal integruotuosius metodus, tokius kaip IATA (4) (5) (6) (7) (8). Jas galima apskaičiuoti pagal šias lygtis:

$$EC150 (CD86) = B_{konc.} + [(150 - B_{SFI}) / (A_{SFI} - B_{SFI}) \times (A_{konc.} - B_{konc.})]$$

$$EC200 (CD54) = B_{konc.} + [(200 - B_{SFI}) / (A_{SFI} - B_{SFI}) \times (A_{konc.} - B_{konc.})]$$

kuriose:

$A_{konc.}$ – mažiausia koncentracija $\mu\text{g/ml}$, kai $SFI > 150$ (CD86) ar 200 (CD54),

$B_{konc.}$ – didžiausia koncentracija $\mu\text{g/ml}$, kai $SFI < 150$ (CD86) ar 200 (CD54),

A_{SFI} – SFI esant mažiausiai koncentracijai, kai $SFI > 150$ (CD86) ar 200 (CD54),

B_{SFI} – SFI esant didžiausiai koncentracijai, kai $SFI < 150$ (CD86) ar 200 (CD54).

Siekiant gauti tikslesnes EC150 ir EC200 vertes gali reikėti trijų atskirų *CD86/CD54 ekspresijos matavimo* ciklų. Tada galutinės EC150 ir EC200 vertės nustatomos kaip efektyviųjų koncentracijų (EC), apskaičiuotų per tuos tris atskirus ciklus, medianinė vertė. Kai tik du iš trijų atskirų bandymo ciklų atitinka teigiamo rezultato kriterijus (žr. 26–27 punktus), pasirenkama didesnioji EC150 ar EC200 iš abiejų apskaičiuotų verčių.

Priimtimumo kriterijai

29. Taikant h-CLAT metodą turėtų būti tenkinami šie priimtimumo kriterijai (22) (27):

- terpės ir tirpiklio ar nešiklio kontrolinių bandinių ląstelių gyvybingumas turėtų būti didesnis nei 90 %;
- tirpiklio ar nešiklio kontroliniame bandinyje ir CD86, ir CD54 SFI vertės neturėtų viršyti teigiamo rezultato kriterijų (CD86 $SFI \geq 150$ % ir CD54 $SFI \geq 200$ %). Tirpiklio ar nešiklio kontrolinio bandinio SFI vertės apskaičiuojamos pagal 25 punkte aprašytą formulę („cheminės medžiagos VFI“ reikėtų pakeisti „tirpiklio ar nešiklio VFI“, o „tirpiklio ar nešiklio VFI“ reikėtų pakeisti „(terpės) kontrolinio bandinio VFI“);
- ir terpės, ir tirpiklio ar nešiklio kontrolinių bandinių tiek CD86, tiek CD54 VFI santykis su izotipo kontrolinio bandinio VFI turėtų būti >105 %;
- teigiamame (DNCB) kontroliniame bandinyje ir CD86, ir CD54 SFI vertės turėtų atitikti teigiamo rezultato kriterijus (CD86 $SFI \geq 150$ ir CD54 $SFI \geq 200$), o ląstelių gyvybingumas turėtų būti didesnis nei 50 %;
- bandomosios cheminės medžiagos paveiktų ląstelių gyvybingumas turėtų būti didesnis nei 50 % bent keturiose iš bandomosios medžiagos koncentracijų per kiekvieną ciklą.

30. Neigiami rezultatai yra priimtini tik tada, kai bandomųjų cheminių medžiagų paveiktų ląstelių gyvybingumas yra mažesnis nei 90 % esant didžiausiai bandomajai koncentracijai (t. y. $1,2 \times CV75$ pagal 20 punkte apibūdintą tirpalų serijinio skiedimo schemą). Jei ląstelių gyvybingumas, esant $1,2 \times CV75$ koncentracijai, yra lygus 90 % ar dar didesnis, gautą neigiamą rezultatą reikėtų atmesti. Tokiu atveju rekomenduojama bandyti tiksliau parinkti dozę, pakartotinai nustatant CV75. Reikėtų pažymėti, kad kai naudojama didžiausia bandomosios cheminės medžiagos koncentracija per bandymą yra 5 000 µg/ml koncentracija fiziologiniame tirpale (ar terpėje, arba kituose naudojamuose tirpikliuose ar nešikliuose), 1 000 µg/ml DMSO arba didžiausia tirpi koncentracija, gautas neigiamas rezultatas yra priimtinas, net jei ląstelių gyvybingumas yra didesnis nei 90 %.

Bandymo ataskaita

31. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga

Vienkomponentė medžiaga:

- cheminis identifikavimas, toks kaip IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS numeris (-iai), SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;
- fizinė išvaizda, Log K_{ow} , tirpumas vandenyje, tirpumas DMSO, molekulinė masė ir papildomos svarbios fizikinės ir cheminės savybės (tiek, kiek žinoma);
- grynumas, priemaišų cheminė tapatybė (kai tinka ir jei praktiškai įmanoma) ir kt.;
- apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);
- bandomoji (-osios) koncentracija (-os);
- laikymo sąlygos ir stabilumas (tiek, kiek žinoma);
- pagrindimas, kodėl pasirinktas tam tikras tirpiklis ar nešiklis kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai.

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

- kuo išsamesnis apibūdinimas, pvz., cheminė tapatybė (žr. pirmiau), grynumas, kiekybinė sudėtis ir svarbios fizikinės ir cheminės savybės (žr. pirmiau), būdingos sudedamosioms dalims (tiek, kiek žinoma);
- fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje, tirpumas DMSO ir svarbios papildomos fizikinės ir cheminės savybės (tiek, kiek žinoma);

- molekulinė masė arba vidutinė molekulinė masė, jei tai yra žinomos sudėties mišiniai ar polimerai, arba kita šiam tyrimui svarbi informacija;
- apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);
- bandomoji (-osios) koncentracija (-os);
- laikymo sąlygos ir stabilumas (tiek, kiek žinoma);
- pagrindimas, kodėl pasirinktas tam tikras tirpiklis ar nešiklis kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai.

Kontroliniai bandiniai

Teigiamas kontrolinis bandinys:

- cheminis identifikavimas, toks kaip IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS numeris (-iai), SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;
- fizinė išvaizda, Log K_{ow} , tirpumas vandenyje, tirpumas DMSO, molekulinė masė ir papildomos svarbios fizinės ir cheminės savybės (tiek, kiek žinoma, ir kai tinka);
- grynumas, priemaišų cheminė tapatybė (kai tinka ir jei praktiškai įmanoma) ir kt.;
- apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);
- bandomoji (-osios) koncentracija (-os);
- laikymo sąlygos ir stabilumas (tiek, kiek žinoma);
- nuoroda į ankstesnius teigiamus kontrolinių bandinių rezultatus, iš kurių nustatyti tinkami bandymo eigos priimtumo kriterijai (jei tinka).

Neigiamas ir tirpiklio ar nešiklio kontroliniai bandiniai:

- cheminis identifikavimas, toks kaip IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS numeris (-iai), SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;
- grynumas, priemaišų cheminė tapatybė (kai tinka ir jei praktiškai įmanoma) ir kt.;
- fizinė išvaizda, molekulinė masė ir papildomos svarbios fizinės ir cheminės savybės (tiek, kiek žinoma) tuo atveju, jei naudojamas ne vienas iš nurodytų bandymo gairėse, o kitas kontrolinio bandinio tirpiklis ar nešiklis;
- laikymo sąlygos ir stabilumas (tiek, kiek žinoma);

- pagrindimas, kodėl pasirinktas tam tikras tirpiklis ar nešiklis kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai.

Bandymo sąlygos

- Rėmėjo pavadinimas ir adresas, bandymų laboratorija ir tyrimo vadovas;
- naudojamo bandymo aprašymas;
- naudojama ląstelių linija, jos laikymo sąlygos ir šaltinis (pvz., įstaiga, iš kurios gautos ląstelės);
- naudojama tėkmės citometrijos įranga (pvz., modelis), įskaitant prietaisų nuostačius, globuliną, antikūnus ir naudojamą citotoksiškumo žymenį;
- pagal kokią procedūrą įrodyta laboratorijos kvalifikacija atlikti šį bandymą, atliekant kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų bandymus, ir pagal kokią procedūrą įrodytas šio bandymo atlikimo atkuriamumas laikui bėgant, pvz., remiantis ankstesniais kontroliniais duomenimis ir (arba) ankstesnių reaktyvumo patikrinimų duomenimis.

Bandymo priimtino kriterijai

- Ląstelių gyvybingumo, vidutinio fluorescencijos intensyvumo (VFI) ir santykinio fluorescencijos intensyvumo (SFI) vertės, gautos naudojant tirpiklio ar nešiklio kontrolinį bandinį, palyginti su nustatytais priimtino intervalais;
- ląstelių gyvybingumo ir SFI vertės, gautos naudojant teigiamą kontrolinį bandinį, palyginti su nustatytais priimtino intervalais;
- ląstelių gyvybingumas esant visoms cheminės medžiagos bandomosioms koncentracijoms.

Bandymo procedūra

- Bandymo ciklo skaičius;
- bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos, jos įterpimas ir pasirinktas veikimo laikas (jei skiriasi nuo rekomenduojamo);
- veikimo bandomąja medžiaga trukmė (jei skiriasi nuo rekomenduojamos);
- atliekant vertinimą ir priimant sprendimą taikytų kriterijų aprašymas;
- bet kokių bandymo procedūros keitimų aprašymas.

Rezultatai

- Duomenų lentelė, įskaitant CV75 vertę (jei tinka), atskirą geometrinį VFI, SFI, ląstelių gyvybingumo vertes, EC150/EC200 vertes (jei tinka), gautas iš bandomosios cheminės

medžiagos bandinių ir teigiamo kontrolinio bandinio per kiekvieną ciklą, ir nurodytą bandomosios cheminės medžiagos vertinimą pagal prognozavimo modelį;

- bet kokių kitų svarbių stebėjimų aprašymas (jei tinka).

Rezultatų aptarimas

- Taikant h-CLAT metodą gautų rezultatų aptarimas;
- bandymo rezultatų apsvaistymas atsižvelgiant į IATA sistemą, jei turima ir kitos svarbios informacijos.

Išvados

LITERATŪRA

- (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. Pateikta <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 S. N., Ramirez T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potencies. *Regul Toxicol Pharmacol.* 63, 489-504.
- (7) Van der Veen J. W., 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 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.
- (9) Jaworska J. S., 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 D. M., 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). Pateikta <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. Pateikta <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>.
- (14) Takenouchi O., Miyazawa M., Saito K., Ashikaga T., Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.* 38, 599-609.
- (15) Ashikaga T., Sakaguchi H., Sono S., Kosaka N., Ishikawa M., Nukada Y., Miyazawa M., Ito Y., Nishiyama N., Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
- (16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch Toxicol* 87, 1683-1969.

- (17) Okamoto K., Kato Y., Kosaka N., Mizuno M., Inaba H., Sono S., Ashikaga T., Nakamura T., Okamoto Y., Sakaguchi H., Kishi M., Kuwahara H., Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6th report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. *AATEX* 15, 81-88.
- (18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). *Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT)*, 23pp. Pateikta <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. Paskelbta [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. Paskelbta 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. priedėlis

TERMINŲ APIBRĖŽTYS

Tikslumas – bandymo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tai yra bandymo atlikimo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Šis terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „atitiktis“ ir reiškia tinkamų bandymo rezultatų dalį (21).

Nepalankios baigties kelias (angl. *Adverse Outcome Pathway*, AOP) – įvykių seka nuo tikslinės cheminės medžiagos ar panašių cheminių medžiagų grupės cheminės struktūros per molekulinio inicijavimo įvykį iki *in vivo* tiriamo rezultato (22).

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

CV75 – nustatyta koncentracijos vertė, kuriai esant ląstelių gyvybingumas yra 75 %.

EC150 – bandomosios medžiagos koncentracijos, kurioms esant CD86 ekspresijos santykinio fluorescencijos intensyvumo (SFI) vertės yra 150.

EC200 – bandomosios medžiagos koncentracijos, kurioms esant CD54 ekspresijos SFI vertės yra 200.

Tėkmės citometrija – citometrinis metodas, pagal kurį ląstelės viena po kitos suspenduojamos skysčio tėkmėje ir leidžiamos per jaudrinančios šviesos židinį, kuriame šviesa išskaidoma toms ląstelėms ir jų sudedamosioms dalims būdingais raštais; ląstelės dažnai pažymimos fluorescenciniais žymenimis, todėl šviesa pirmiausia sugerama, o tada išspinduliuojama pakitusiais dažniais.

Pavojus – būdingoji medžiagos savybė arba situacija, galinti sukelti neigiamų padarinių, kai organizmą, sistemą ar populiaciją (arba jos dalį) veikia ta medžiaga.

IATA (integruotasis bandymo ir vertinimo metodas, angl. *Integrated Approach to Testing and Assessment*) – struktūrinis metodas, taikomas cheminės medžiagos ar cheminių medžiagų grupės (galimam) pavojui nustatyti, pavojui (veikimo gebai) apibūdinti ir (arba) saugai vertinti (dėl galimo pavojaus ar veikimo gebos ir paveikimo ta medžiaga). Jį taikant strategiškai apibendrinami ir įvertinami visi susiję duomenys, kad būtų galima ta informacija pagrįsti reglamentavimo sprendimą dėl galimo pavojaus ir (arba) rizikos ir (arba) dėl būtinumo atlikti papildomus tikslinius, taigi minimalius bandymus.

Terpės kontrolinis bandinys – neapdorotas kartotinis bandinys, kuriame yra visi bandymo sistemos komponentai. Šis bandinys tiriamas kartu su bandomąja chemine medžiaga apdorotais bandiniais ir kitais kontroliniais bandiniais siekiant nustatyti, ar vyksta tirpiklio

arba nešiklio sąveika su bandymo sistema.

Mišinys – iš dviejų ar daugiau medžiagų sudarytas mišinys ar tirpalas.

Vienkomponentė medžiaga – medžiaga, apibrėžiama pagal jos kiekybinę sudėtį, kurioje vienas pagrindinis komponentas sudaro ne mažiau kaip 80 % (masės).

Daugiakomponentė medžiaga – medžiaga, apibrėžiama pagal jos kiekybinę sudėtį, kurioje daugiau kaip vieno pagrindinio komponento koncentracija yra ≥ 10 % (masės) ir < 80 % (masės). Daugiakomponentė medžiaga yra gamybos proceso rezultatas. Daugiakomponentė medžiaga nuo mišinio skiriasi tuo, kad mišinys gaunamas sumaišant dvi arba daugiau medžiagų, tarp kurių cheminė reakcija nevyksta. Daugiakomponentė medžiaga yra cheminės reakcijos rezultatas.

Teigiamas kontrolinis bandinys – kartotinis bandinys, kuriame yra visi bandymo sistemos komponentai, apdorotas tam tikra medžiaga, kuri, kaip žinoma, sukelia teigiamą atsaką. Siekiant užtikrinti, kad būtų galima vertinti teigiamo kontrolinio bandinio atsako kintamumą laikui bėgant, teigiamas atsakas neturėtų būti per stiprus.

Prehaptentai – cheminės medžiagos, kurios tampa jautrinančios po abiotinio virsmo.

Prohaptentai – cheminės medžiagos, kurias būtina aktyvinti fermentais, kad pasireikštų jų odos jautrinimo geba.

Santykinis fluorescencijos intensyvumas (SFI) – cheminės medžiagos paveiktų ląstelių fluorescencijos intensyvumo geometrinio vidurkio (VFI) santykinės vertės, palyginti su tirpikliu ar nešikliu apdorotų ląstelių VFI.

Tinkamumas – ryšio tarp bandymo ir tiriamo poveikio, taip pat bandymo reikšmingumo ir naudingumo siekiant tam tikro tikslo apibūdinimas. Tai yra atliekant bandymą tiriamo biologinio poveikio matavimo ar prognozavimo tikslumo laipsnis. Tinkamumas apima bandymo tikslumo (atitikties) aspektą (21).

Patikimumas – pagal tą patį protokolą atliekamo bandymo atkuriamumo laboratorijose ir tarp laboratorijų, laikui bėgant, matas. Jis įvertinamas apskaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų ir pakartojamumą laboratorijoje (21).

Bandymo ciklas – vienos ar daugiau bandomųjų cheminių medžiagų bandymas kartu naudojant tirpiklio ar nešiklio kontrolinį bandinį ir teigiamą kontrolinį bandinį.

Jautris – visų teigiamų (veikliųjų) cheminių medžiagų, kurios teisingai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Tai yra bandymo, kuriuo gaunami kategorijos nustatymo rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo tinkamumą (21).

Dažymo buferinis tirpalas – fosfatinis buferinis druskų tirpalas, kuriame yra 0,1 % galvijų

serumo albumino.

Tirpiklio ar nešiklio kontrolinis bandinys – neapdorotas bandinys, kuriame yra visi bandymo sistemos komponentai, išskyrus bandomąją cheminę medžiagą, tačiau įskaitant naudojamą tirpiklį ar nešiklį. Jis naudojamas nustatant bazinį atsaką bandiniuose, apdorotuose bandomąja chemine medžiaga, ištirpinta ar stabiliai disperguota tame pačiame tirpiklyje ar nešiklyje. Kai šis bandinys naudojamas bandymui kartu su terpės kontroliniu bandiniu, jis taip pat parodo, ar tirpiklis arba nešiklis veikia bandymo sistemą.

Specifiškumas – visų neigiamų (neveikliųjų) cheminių medžiagų, kurios teisingai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Tai yra bandymo, kuriuo gaunami kategorijos nustatymo rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo tinkamumą (21).

Medžiaga – gamtoje randamas ar bet kokio gamybos proceso metu gaunamas cheminis elementas ir jo junginiai, įskaitant bet kokius priedus, reikalingus jo stabilumui išlaikyti, ir priemaišas, atsirandančias dėl gamybos proceso, tačiau išskyrus tirpiklius, kuriuos galima atskirti nedarant poveikio medžiagos stabilumui ir nekeičiant jos sudėties.

Bandomoji cheminė medžiaga – taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

Jungtinių Tautų visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistema (JT GHS) – sistema, kurioje pateikiamas cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikavimas pagal standartizuotus fizinių pavojų, pavojų sveikatai bei aplinkai tipus ir lygius, ir naudojami atitinkami informaciniai elementai, tokie kaip piktogramos, signaliniai žodžiai, pavojingumo frazės, atsargumo frazės ir saugos duomenų lapai, kad būtų perduota informacija apie jų neigiamą poveikį, siekiant apsaugoti žmones (įskaitant darbdavius, darbuotojus, vežėjus, vartotojus ir avarių likviduotojus) ir aplinką (23).

UVCB – nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudedamieji reakcijų produktai ar biologinės medžiagos.

Patvirtinto tinkamumo bandymas – bandymas, laikomas pakankamai tinkamu ir patikimu konkrečiam tikslui pasiekti ir pagrįstas moksliniais patikimais principais. Bandymas niekada nėra absoliučiai tinkamas – jis yra tinkamas tik tam tikram tikslui pasiekti (21).

1.2. priedėlis

KVALIFIKACIJAI TIKRINTI SKIRTOS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

Prieš pradėdamos įprastu būdu atlikti bandymą, aprašytą šiame priedėlyje, pagal bandymo metodą B.71, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją, gaudamos teisingą numatytą h-CLAT prognozę dėl 10 medžiagų, rekomenduojamų 1 lentelėje, ir gaudamos CV75, EC150 bei EC200 vertes, kurios patenka į atitinkamus etaloninius intervalus, dėl ne mažiau kaip 8 iš 10 kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų. Kvalifikacijai tikrinti skirtos cheminės medžiagos buvo pasirinktos siekiant aprėpti odos jautrinimo pavojams būdingų atsakų spektrą. Kiti jų atrankos kriterijai buvo tokie, kad tų medžiagų būtų galima įsigyti iš komercinių tiekėjų ir kad būtų galima gauti aukštos kokybės *in vivo* etaloninių duomenų bei aukštos kokybės *in vitro* duomenų, nustatytų taikant h-CLAT metodą. Taip pat yra paskelbti h-CLAT metodo taikymo etaloniniai duomenys (3) (14).

1 lentelė. Cheminės medžiagos, rekomenduojamos techninei kvalifikacijai tikrinti pagal h-CLAT metodą

Kvalifikacijai tikrinti skirtos cheminės medžiagos	CAS Nr.	Fizinė būsena	Prognozė <i>in vivo</i> ¹	CV75 etaloninis intervalas µg/ml ²	h-CLAT rezultatai dėl CD86 (EC150 etaloninis intervalas µg/ml) ²	h-CLAT rezultatai dėl CD54 (EC200 etaloninis intervalas µg/ml) ²
2,4-dinitrochlorbenzenas	97-00-7	Kietoji medžiaga	Jautrinanti medžiaga (ypač stipriai)	2–12	Teigiama (0,5–10)	Teigiama (0,5–15)
4-fenilendiaminas	106-50-3	Kietoji medžiaga	Jautrinanti medžiaga (stipriai)	5–95	Teigiama (<40)	Neigiama (>1,5) ³
Nikelio sulfatas	10101-97-0	Kietoji medžiaga	Jautrinanti medžiaga (vidutinio stiprumo)	30–500	Teigiama (<100)	Teigiama (10–100)
2-merkaptbenzotiazolas	149-30-4	Kietoji medžiaga	Jautrinanti medžiaga (vidutinio stiprumo)	30–400	Neigiama (>10) ³	Teigiama (10–140)
R(+)-limonenas	5989-27-5	Skystis	Jautrinanti medžiaga (silpnai)	>20	Neigiama (>5) ³	Teigiama (<250)
Imidazolidinilo šlapalas	39236-46-9	Kietoji medžiaga	Jautrinanti medžiaga (silpnai)	25–100	Teigiama (20–90)	Teigiama (20–75)
Izopropilo alkoholis	67-63-0	Skystis	Nejautrinanti medžiaga	>5 000	Neigiama (>5 000)	Neigiama (>5 000)
Glicerolis	56-81-5	Skystis	Nejautrinanti medžiaga	>5 000	Neigiama (>5 000)	Neigiama (>5 000)
Pieno rūgštis	50-21-5	Skystis	Nejautrinanti medžiaga	1 500–5 000	Neigiama (>5 000)	Neigiama (>5 000)
4-aminobenzenkarboksirūgštis	150-13-0	Kietoji medžiaga	Nejautrinanti medžiaga	>1 000	Neigiama (>1 000)	Neigiama (>1 000)

Santrumpos: CAS Nr. – Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos registro numeris.

¹ Pavojaus (ir veikimo gebos) *in vivo* prognozė pagrįsta LLNA duomenimis (3) (14). Veikimo *in vivo* geba gauta taikant ECETOC pasiūlytus kriterijus (24).

² Pagrįsta anksčiau nustatytomis vertėmis (13) (25).

³ Praeityje dėl šio žymens buvo gauti daugiausia neigiami rezultatai, todėl labiausiai tikėtina, kad rezultatas bus neigiamas. Pateiktas intervalas buvo nustatytas remiantis keliais anksčiau gautais teigiamais rezultatais. Tuo atveju, jei būtų gautas teigiamas rezultatas, efektyviosios koncentracijos (EC) vertė turėtų būti pateiktame etaloniniame intervale.

2 priedėlis

ODOS JAUTRINIMAS *IN VITRO*. U937 LĄSTELIŲ LINIJOS AKTYVINIMO BANDYMAS (U-SENS™)

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

1. Atliekant U-SENS™ bandymą kiekybiškai nustatomas ląstelių paviršinio žymens, siejamo su monocitų ir dendritinių ląstelių aktyvinimo procesu (t. y. CD86), ekspresijos pokytis žmogaus histiocitinės limfomos ląstelių linijos U937 ląstelėse, jas paveikus jautrinančiomis medžiagomis (1). Išmatuoti ląstelių linijos U937 ląstelių paviršinio žymens CD86 ekspresijos lygiai naudojami padedant skirti odą jautrinančias ir jos nejautrinančias medžiagas.
2. Bandymas U-SENS™ buvo įvertintas atlikus „L’Oreal“ koordinuojamą jo tinkamumo patvirtinimo tyrimą (2) ir paskesnę nepriklausomą ekspertizę, kurią atliko Europos Sąjungos bandymų su gyvūnais alternatyvų etaloninės laboratorijos (EURL ECVAM) mokslinis patariamasis komitetas (ESAC) (3). Atsižvelgus į visus turimus įrodymus ir į reguliavimo institucijų bei suinteresuotųjų subjektų įnašus, bandymas U-SENS™ buvo EURL ECVAM rekomenduotas (4) naudoti kaip IATA dalis, padedant skirti odą jautrinančias ir nejautrinančias medžiagas, kad būtų galima jas klasifikuoti pagal pavojingumą ir atitinkamai ženklinti. EBPO rekomendaciniame dokumente dėl pranešimo apie struktūrinius metodus, pagal kuriuos susiejami duomenys ir atskiri informacijos šaltiniai, naudojami IATA sistemoje dėl odos jautrinimo, šiuo metu aptariami kelių atvejų tyrimai, apibūdinant įvairias bandymų strategijas ir prognozavimo modelius. Vienas iš šių įvairių nustatytų metodų yra pagrįstas U-SENS tyrimu (5). U-SENS™ duomenų naudojimo kartu su kita informacija, įskaitant ankstesnius duomenis ir esamus patvirtintus duomenis apie žmones (6), pavydžių pateikta ir kitoje literatūroje (4) (5) (7).
3. Įrodyta, kad U-SENS™ bandymą galima pritaikyti laboratorijose, turinčiose ląstelių kultūrų auginimo metodų naudojimo ir tėkmės citometrinės analizės atlikimo patirties. Tikėtinas prognozių laboratorinio ir tarplaboratorinio atkuriamumo lygis atliekant šį bandymą atitinkamai yra apie 90 % ir 84 % (8). Iš rezultatų, gautų atlikus tinkamumo patvirtinimo tyrimą (8) ir kitus paskelbtus tyrimus (1), apskritai matyti, kad, palyginti su LLNA rezultatais, odą jautrinančių (t. y. JT GHS ar CLP 1 kategorijos) ir nejautrinančių medžiagų skyrimo tikslumas yra 86 % (N = 166), esant 91 % (118/129) jautriui ir 65 % (24/37) specifiškumui. Palyginti su žmonių tyrimų rezultatais, odą jautrinančių (t. y. JT GHS ar CLP 1 kategorijos) ir nejautrinančių medžiagų skyrimo tikslumas yra 77 % (N = 101), esant 100 % (58/58) jautriui ir 47 % (20/43) specifiškumui. Klaidingai neigiamos

prognozės atliekant bandymą U-SENS™, palyginti su LLNA, yra labiau tikėtinos dėl tų cheminių medžiagų, kurių odos jautrinimo geba yra maža arba vidutinė (t. y. JT GHS ar CLP 1B subkategorijos medžiagų), negu tų cheminių medžiagų, kurių odos jautrinimo geba yra didelė (t. y. JT GHS ar CLP 1A subkategorijos) (1) (8) (9). Iš visos šios informacijos yra aiškus U-SENS™ bandymo naudingumas padedant nustatyti odos jautrinimo pavojus. Vis dėlto čia pateiktos tikslumo vertės, kai U-SENS™ atliekamas kaip atskiras bandymas, yra tik orientacinės, nes šio bandymo duomenis reikėtų vertinti kartu su informacija iš kitų šaltinių, kaip IATA dalį, ir pagal bendrojo įvado 7 ir 8 punktuose pateiktas nuostatas. Be to, vertinant odos jautrinimo bandymų ne su gyvūnais metodus, reikėtų turėti omenyje, kad LLNA bandymas ir kiti bandymai su gyvūnais gali neviseškai tiksliai parodyti su žmonėmis susijusią padėtį.

4. Remiantis šiuo metu turimais duomenimis, įsitikinta, kad U-SENS™ bandymas tinka bandomosioms cheminėms medžiagoms (įskaitant kosmetikos ingredientus, pvz., konservantus, paviršinio aktyvumo medžiagas, veikliąsias medžiagas, dažiklius), apimančioms įvairias organines funkcines grupes, fizikines ir chemines savybes, odos jautrinimo gebą (kaip nustatyta atliekant *in vivo* tyrimus) ir su odos jautrinimu siejamų reakcijos mechanizmų spektrą (t. y. Michael'o akceptorius, Schiff'o bazės susidarymas, acilo perdavimo agentas, nukleofilinis bimolekulinis pakeitimas (SN2) arba nukleofilinis aromatinis pakeitimas (SNAr)) (1) (8) (9) (10). U-SENS™ bandymas tinka bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios yra tirpios arba sudaro stabilią dispersiją (t. y. koloidus ar suspensijas, iš kurių bandomoji cheminė medžiaga neiškrenta į nuosėdas ir nesudaro su tirpikliu ar nešikliu skirtingų fazių) tinkamame tirpiklyje ar nešiklyje (žr. 13 punktą). Pagal U-SENS™ metodą buvo gautos teisingos prognozės dėl cheminių medžiagų, įtrauktų į duomenų rinkinį, apie kurias pranešta kaip apie prehaptenus (t. y. medžiagas, kurios aktyvinamos oksidacija) arba prohaptenus (t. y. medžiagas, kurias būtina aktyvinti fermentais, pvz., P450 fermentais) (1) (10). Tiriant ląstelių membraną ardančias medžiagas, gali būti gauta klaidingai teigiamų rezultatų dėl nespecifinio CD86 ekspresijos padidėjimo, nes 3 iš 7 atvejų gauti klaidingai teigiami rezultatai, palyginti su *in vivo* etalonine klasifikacija, buvo dėl paviršinio aktyvumo medžiagų (1). Taigi, paviršinio aktyvumo medžiagų bandymų teigiamus rezultatus reikėtų vertinti atsargiai, tačiau neigiamais rezultatais dėl šių medžiagų gali būti tinkama remtis nustatant, kad bandomoji cheminė medžiaga nėra jautrinanti. Fluorescuojančios bandomosios cheminės medžiagos gali būti vertinamos pagal U-SENS™ (1), tačiau stipriai fluorescuojančios bandomosios cheminės medžiagos, kurių skleidžiamų bangų ilgis toks pat kaip fluoresceino izotiocianato (FITC) ar propidiumo jodido (PI), kliudo tėkmės citometriniams nustatymui, todėl neįmanoma jų tiksliai įvertinti naudojant FITC konjuguotus antikūnus (galimas klaidingai neigiamas rezultatas) ar PI (neįmanoma išmatuoti gyvybingumo). Tokiu atveju

gali būti atitinkamai naudojami kiti fluorochromu žymėti antikūnai arba kiti citotoksiškumo žymenys, jei galima įrodyti, kad juos naudojant gaunami panašūs rezultatai kaip ir naudojant FITC žymėtus antikūnus arba PI (žr. 18 punktą), pvz., atliekant 2.2 priedėlyje nurodytą kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų bandymus. Atsižvelgiant į tai, kas išdėstyta, paviršinio aktyvumo medžiagų teigiami rezultatai ir stipriai fluorescuojančių bandomųjų cheminių medžiagų neigiami rezultatai turėtų būti aiškinami atsižvelgiant į nustatytus apribojimus ir kartu remiantis kitais informacijos šaltiniais IATA sistemoje. Tais atvejais, kai yra įrodymų, kad U-SENS™ bandymas netinka kitų konkrečių kategorijų bandomosioms cheminėms medžiagoms, jo nereikėtų atlikti dėl tų konkrečių kategorijų medžiagų.

5. Kaip aprašyta pirmiau, U-SENS™ bandymu padedama skirti odą jautrinančias medžiagas nuo nejautrinančių medžiagų; tačiau jis taip pat gali padėti vertinti jautrinimo gebą, kai taikomas pagal integruotuosius metodus, tokius kaip IATA. Vis dėlto būtina toliau dirbti (geriausia remiantis duomenimis apie žmones) siekiant nustatyti, kaip U-SENS™ rezultatais būtų galima pagrįsti jautrinimo gebos vertinimą.
6. Terminų apibrėžtys pateiktos 2.1. priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAS

7. Bandymas U-SENS™ – tai tyrimas *in vitro*, kurį atliekant kiekybiškai nustatomi ląstelių paviršinio žymens CD86 ekspresijos pokyčiai žmogaus histiocitinės limfomos ląstelių linijos U937 ląstelėse po 45 ± 3 valandų veikimo bandomąja chemine medžiaga. CD86 paviršinis žymuo yra tipinis U937 ląstelių aktyvinimo žymuo. Yra žinoma, kad CD86 yra kostimuliacinė molekulė, galinti atkartoti monocitinį aktyvinimą, kuris yra ypač svarbus T ląstelių aktyvinimui. Ląstelių paviršinio žymens CD86 ekspresijos pokyčiai matuojami tėkmės citometrijos būdu, prieš tai nudažius ląsteles, paprastai fluoresceino izotiocianatu (FITC) žymėtais antikūnais. Kartu atliekamas ir citotoksiškumo matavimas (pvz., naudojant PI), vertinant, ar ląstelių paviršinio žymens CD86 ekspresijos didinimas vyksta esant mažesnėms nei citotoksiškos koncentracijoms. Ląstelių paviršinio žymens CD86 stimuliavimo indeksas (SI), palyginti su tirpiklio ar nešiklio kontroliniu bandiniu, apskaičiuojamas ir naudojamas pagal prognozavimo modelį (žr. 19 punktą), taip padedant skirti jautrinančias ir nejautrinančias medžiagas.

KVALIFIKACIJOS ĮRODYMAS

8. Prieš pradėdamos įprastai atlikti šiame priedėlyje aprašytą bandymą pagal bandymo metodą B.71, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją naudodamos 10

kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų, kurių sąrašas pateiktas 2.2. priedėlyje, pagal gerąją *in vitro* metodų taikymo praktiką (11). Be to, šio bandymo naudotojai turėtų turėti ankstesnių duomenų bazę, kurioje būtų kaupiami duomenys, gauti atliekant reaktyvumo patikrinimus (žr. 11 punktą) ir naudojant teigiamus bei tirpiklio ar nešiklio kontrolinius bandinius (žr. 15–16 punktus), ir šiais duomenimis reikėtų naudotis patvirtinant tolesnį šio bandymo atkuriamumą savo laboratorijoje laikui bėgant.

PROCEDŪRA

9. Šis bandymas pagrįstas U-SENS™ DB-ALM (angl. *DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation* – bandymams su gyvūnais alternatyvių metodų duomenų bazės paslauga) protokolu Nr. 183 (12). Įdiegiant ir atliekant U-SENS™ bandymą laboratorijoje turėtų būti taikomos standartinės veiklos procedūros (SVP). U-SENS™ bandymą galima atlikti naudojant automatizuotą sistemą, jei galima įrodyti, kad taip gaunami panašūs rezultatai, pavyzdžiui, atliekant 2.2. priedėlyje nurodytą kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų bandymus. Toliau aprašyti pagrindiniai U-SENS™ bandymo komponentai ir procedūros.

Ląstelių paruošimas

10. Atliekant U-SENS™ bandymą turėtų būti naudojama žmogaus histiocitinės limfomos ląstelių linija U937 (13). Ląsteles (klonas CRL1593.2) reikėtų gauti iš kvalifikuoto ląstelių banko, tokio kaip „American Type Culture Collection“.
11. U937 ląstelės auginamos 37 °C temperatūroje, esant 5 % CO₂ ir drėgnai atmosferai, terpėje RPMI-1640, papildytoje 10 % veršelio embriono serumo (FCS), 2 mM L-glutamino, 100 vnt./ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino (visos sudėties terpė). U937 ląstelės reguliariai sėjamos kas 2–3 dienas atitinkamai 1,5 ar 3 × 10⁵ ląstelių/ml tankiu. Ląstelių tankis turėtų būti ne didesnis kaip 2 × 10⁶ ląstelių/ml, o ląstelių gyvybingumas, matuojamas atmetimo principu, naudojant tripano mėlį, turėtų būti ≥ 90 % (tai netaikoma per pirmąjį sėjimą po atitirpinimo). Reikėtų patikrinti kiekvienos ląstelių, FCS ar antikūnų partijos tinkamumą, atliekant reaktyvumo patikrinimą, prieš naudojant jas bandymui. Ląstelių reaktyvumo patikrinimas turėtų būti atliekamas praėjus bent vienai savaitei po atitirpinimo, naudojant teigiamą kontrolinį bandinį su pikrilsulfonrūgštimi (2,4,6-trinitrobenzensulfoninė rūgštis, TNBS) (CAS Nr. 2508-19-2, ≥99 % grynumo) ir neigiamą kontrolinį bandinį su pieno rūgštimi (CAS Nr. 50-21-5, ≥85 % grynumo). Atliekant reaktyvumo patikrinimą, turėtų būti bandomos kiekvieno iš dviejų kontrolinių bandinių šešios galutinės koncentracijos (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 µg/ml, pieno rūgšties: 1, 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml). TNBS, soliubilizuota visos sudėties terpėje, turėtų sukelti

teigiamą ir su koncentracija susijusį CD86 atsaką (pvz., kai po teigiamo atsako koncentracijos, kuriai esant CD86 stimuliavimo indeksas (SI) ≥ 150 , tolesnės koncentracijos CD86 SI yra didesnis), o naudojant pieno rūgštį, soliubilizuotą visos sudėties terpėje, CD86 atsakas turėtų būti neigiamas (žr. 21 punktą). Tyrimui turėtų būti naudojama tik tokia ląstelių partija, kurios reaktyvumo patikrinimas atliktas 2 kartus. Ląsteles galima dauginti ne ilgiau kaip septynias savaites po atitirpinimo. Sėjimų skaičius neturėtų viršyti 21. Reaktyvumo patikrinimas turėtų būti atliekamas pagal 18–22 punktuose aprašytas procedūras.

12. Bandymui U937 ląstelės sėjamos 3×10^5 ląstelių/ml arba 6×10^5 ląstelių/ml tankiu ir jų kultūra iš anksto ruošama auginimo kolbose atitinkamai 2 dienas arba 1 dieną. Kultūros paruošimo sąlygos gali būti ir kitokios, negu aprašyta pirmiau, jei pateikiamas pakankamas mokslinis to pagrindimas ir galima įrodyti, kad taip gaunami panašūs rezultatai, pavyzdžiui, atliekant 2.2. priedėlyje nurodytą kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų bandymus. Bandymo dieną iš auginimo kolbos surinktos ląstelės resuspenduojamos naujoje auginimo terpėje 5×10^5 ląstelių/ml tankiu. Tada ląstelės paskirstomos 96 duobučių plokščiadugnėje mikrotitravimo plokštelėje, kurios duobučių tūris 100 μ l (galutinis ląstelių tankis $0,5 \times 10^5$ ląstelių kiekvienoje duobutėje).

Bandomųjų cheminių medžiagų ir kontrolinių medžiagų paruošimas

13. Prieš bandymą atliekamas tirpumo vertinimas. Šiuo tikslu bandomosios cheminės medžiagos ištirpinamos arba stabiliai disperguojamos visos sudėties terpėje, gaunant 50 mg/ml koncentraciją (šiam tirpikliui teikiama pirmenybė), arba dimetilsulfoksido (DMSO, ≥ 99 % grynumo), kuris yra antras galimas tirpiklis arba nešiklis, jei bandomoji cheminė medžiaga nėra tirpi naudojant visos sudėties terpę kaip tirpiklį ar nešiklį. Bandymui skirta bandomoji cheminė medžiaga ištirpinama visos sudėties terpėje, kurioje jos galutinė koncentracija 0,4 mg/ml, jei ta cheminė medžiaga yra tirpi šiame tirpiklyje ar nešiklyje. Jei cheminė medžiaga yra tirpi tik DMSO, cheminė medžiaga jame ištirpinama iki 50 mg/ml koncentracijos. Kiti čia neminėti tirpikliai ar nešikliai gali būti naudojami, jei pateikiamas pakankamas mokslinis to pagrindimas. Reikėtų atsižvelgti į bandomosios cheminės medžiagos stabilumą galutiniame tirpiklyje ar nešiklyje.
14. Bandomosios cheminės medžiagos ir kontrolinės medžiagos ruošiamos bandymo dieną. Kadangi neatliekama dozės nustatymo tyrimo, per pirmą bandymo ciklą turėtų būti bandomos 6 galutinės koncentracijos (1, 10, 20, 50, 100 ir 200 μ g/ml) atitinkamame tirpiklyje ar nešiklyje – visos sudėties terpėje arba terpėje su 0,4 % DMSO. Per paskesnius bandymo ciklus, pradedant nuo 0,4 mg/ml koncentracijos visos sudėties terpėje ar 50 mg/ml DMSO, bandomųjų cheminių medžiagų tirpalai – bent 4 darbiniai (t. y. bent

4 koncentracijų) tirpalai – ruošiami naudojant atitinkamą tirpiklį ar nešiklį. Šie darbiniai tirpalai galiausiai naudojami bandymui, į mikrotitravimo plokštelės duobutes įpilant po vienodą tūrį U937 ląstelių suspensijos (žr. pirmiau, 11 punktą) ir darbinio tirpalo, taip dar du kartus jį praskiedžiant (12). Atitinkamos koncentracijos (bent 4 koncentracijos) per bet kokį paskesnę bandymo ciklą parenkamos remiantis atskirais visų ankstesnių ciklų rezultatais (8). Tinkamos naudoti galutinės koncentracijos yra 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 ir 200 µg/ml. Didžiausia galutinė koncentracija yra 200 µg/ml. Tuo atveju, jei nustatoma CD86 teigiama vertė esant 1 µg/ml, vertinama 0,1 µg/ml koncentracija, siekiant nustatyti tokią bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją, kuri nesukelia CD86 atsako, viršijančio teigiamo rezultato ribą. Per kiekvieną bandymo ciklą, jei nustatomas CD86 teigiamas atsakas į koncentraciją, apskaičiuojama EC150 (cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant pasiekama CD86 teigiamo atsako 150 % riba; žr. 19 punktą). Kai bandomoji cheminė medžiaga sukelia teigiamą CD86 atsaką, nesusijusį su koncentracija, gali nereikėti apskaičiuoti EC150, kaip aprašyta U-SENS™ DB-ALM protokole Nr. 183 (12). Per kiekvieną bandymo ciklą, kai tik įmanoma, apskaičiuojama CV70 (cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant pasiekama 70 % citotoksiškumo riba; žr. 19 punktą) (12). Siekiant tirti CD86 atsako didėjimo su koncentracija susijusį poveikį, bet kokios koncentracijos iš tinkamų naudoti koncentracijos verčių turėtų būti pasirinktos tolygiais intervalais tarp EC150 (arba didžiausios CD86 neigiamos necitotoksiškos koncentracijos) ir CV70 (arba didžiausios leidžiamos koncentracijos, t. y. 200 µg/ml). Palyginimo tikslais per kiekvieną bandymo ciklą turėtų būti bandomos mažiausiai 4 koncentracijos, iš kurių bent 2 turėtų būti tokios pačios kaip per pirmesnę ciklą arba ciklus.

15. Per U-SENS™ bandymą tirpiklio ar nešiklio kontroliniam bandiniui naudojama visos sudėties terpė (bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios yra soliubilizuojamos ar stabiliai disperguojamos) (žr. 4 punktą), arba 0,4 % DMSO visos sudėties terpėje (bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios soliubilizuojamos arba stabiliai disperguojamos DMSO).
16. Atliekant U-SENS™ bandymą naudojamas teigiamas kontrolinis bandinys su TNBS (žr. 11 punktą), paruoštas visos sudėties terpėje. TNBS, kaip teigiamas kontrolinis bandinys atliekant CD86 ekspresijos matavimą, turėtų būti naudojama vienos galutinės koncentracijos plokštelėje (50 µg/ml), ląstelių gyvybingumui esant >70 %. Siekiant plokštelėje gauti 50 µg/ml TNBS koncentraciją, paruošiamas TNBS 1 M (t. y. 293 mg/ml) pradinis tirpalas visos sudėties terpėje ir dar 2930 kartų praskiedžiamas visos sudėties terpe, gaunant 100 µg/ml darbinį tirpalą. Kaip neigiamas kontrolinis bandinys turėtų būti naudojama pieno rūgštis (CAS 50-21-5), 200 µg/ml koncentracijos, soliubilizuota visos

sudėties terpėje (iš 0,4 mg/ml pradinio tirpalo). Kiekvienoje mikrotitravimo plokštelėje per kiekvieną bandymo ciklą paruošiami trys visos sudėties terpės neapdoroto kontrolinio bandinio, tirpiklio ar nešiklio kontrolinio bandinio, neigiamo ir teigiamo kontrolinių bandinių kartotiniai bandiniai (12). Galima naudoti ir kitokius tinkamus teigiamus kontrolinius bandinius, jei yra ankstesnių duomenų, iš kurių būtų galima nustatyti panašius bandymo eigos priimtinumą kriterijus. Bandymo eigos priimtinumą kriterijai yra tie patys, kurie apibūdinti dėl bandomosios cheminės medžiagos (žr. 12 punktą).

Bandomųjų cheminių medžiagų ir kontrolinių medžiagų įterpimas

17. Tirpiklio ar nešiklio kontrolinis bandinys arba darbiniai tirpalai, aprašyti 14–16 punktuose, sumaišomi santykiu 1:1 (tūrio) su ląstelių suspensijomis, paruoštomis 96 duobučių plokščiadugnėje mikrotitravimo plokštelėje (žr. 12 punktą). Paruoštos plokštelės 45 ± 3 val. inkubuojamos 37°C temperatūroje, esant 5 % CO_2 . Prieš inkubavimą plokštelės sandariai uždengiamos pusiau pralaidžia plėvele, kad būtų išvengta lakiųjų bandomųjų cheminių medžiagų garavimo ir kryžminio užteršimo tarp bandomosiomis cheminėmis medžiagomis veikiamų ląstelių (12).

Ląstelių dažymas

18. Po 45 ± 3 val. veikimo bandomąja chemine medžiaga ląstelės perkeliama į V formos duobučių mikrotitravimo plokštelę ir surenkamos centrifuguojant. Tirpumo trukdis apibrėžiamas kaip kristalų arba lašelių susidarymas, matomas per mikroskopą praėjus 45 ± 3 val. po apdorojimo (prieš ląstelių dažymą). Supernatantas pašalinamas, o likusios ląstelės vieną kartą perplaunamos 100 μl ledo temperatūros fosfatinio buferinio druskų tirpalo (PBS), kuriame yra 5 % veršelio embriono serumo (dažymo buferinis tirpalas). Po centrifugavimo ląstelės resuspenduojamos 100 μl dažymo buferinio tirpalo ir nudažomos naudojant 5 μl (pvz., 0,25 μg) FITC ženklinatų anti-CD86 ar pelės IgG1 (izotipo) antikūnų 30 min. 4°C temperatūroje, saugant nuo šviesos. Turėtų būti naudojami antikūnai, aprašyti U-SENS™ DB-ALM protokole Nr. 183 (12) (CD86: BD-PharMingen #555657 klonas Fun-1 arba Caltag/Invitrogen # MHCD8601 klonas BU63; IgG1: BD-PharMingen #555748 arba Caltag/Invitrogen # GM4992). Iš šio bandymo kūrėjų patirties žinoma, kad įvairių partijų antikūnų fluorescencijos intensyvumas paprastai yra pastovus. Tyrimui gali būti naudojami ir kiti antikūnų klonai arba kito tiekėjo antikūnai, kurių reaktyvumas patikrintas (žr. 11 punktą). Tačiau naudotojai gali apsvarstyti poreikį titruoti antikūnus savo laboratorijos sąlygomis, kad nustatytų tinkamiausią naudoti koncentraciją. Kitokią aptikimo sistemą, pvz., fluorochromu žymėtus anti-CD86 antikūnus galima naudoti, jei galima įrodyti, kad gaunami panašūs rezultatai kaip ir naudojant FITC konjuguotus antikūnus, pavyzdžiui, atliekant 2.2 priedėlyje nurodytą kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų bandymus. Du kartus perplautos 100 μl dažymo buferinio tirpalo ir

vieną kartą – 100 µl ledo temperatūros fosfatinio buferinio druskų tirpalo (PBS), ląstelės resuspenduojamos ledo temperatūros PBS (pvz., 125 µl, kai bandiniai analizuojami rankiniu būdu imant mėgintuvėlius vieną po kito, arba 50 µl, kai naudojama automatinio ėminių ėmiklio plokštelė), ir įpilama PI tirpalo (galutinė koncentracija 3 µg/ml). Kiti citotoksiškumo žymenys, tokie kaip 7-aminoaktinomicinas D (7-AAD) arba tripano mėlis, gali būti naudojami, jei galima įrodyti, kad alternatyviais dažais gaunami panašūs rezultatai kaip ir PI, pavyzdžiui, atliekant 2.2 priedėlyje nurodytą kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų bandymus.

Tėkmės citometrinė analizė

19. CD86 ekspresijos lygis ir ląstelių gyvybingumas analizuojami naudojant tėkmės citometrijos metodą. Ląstelės parodomos tam tikro dydžio (FSC) ir grūdėtumo (SSC) taškinėje diagramoje, perkelta į logaritminę skalę, kad būtų galima aiškiai nustatyti populiaciją pirmajame regione R1 ir pašalinti liekanas. Iš kiekvienos duobutės gaunamas tikslinis bendras 10 000 ląstelių skaičius R1 regione. To paties R1 regiono ląstelės pavaizduojamos FL3 ar FL4 / SSC taškinėje diagramoje. Gyvybingos ląstelės išskiriamos nustatant antrą R2 regioną, kuriam pasirenkama propidiumo jodidu žymėtų neigiamų ląstelių populiacija (FL3 ar FL4 kanalas). Ląstelių gyvybingumą galima apskaičiuoti naudojant toliau pateiktą lygtį pagal citometrinės analizės programą. Kai ląstelių gyvybingumas yra mažas, galima gauti iki 20 000 ląstelių, įskaitant negyvas ląsteles. Kitu būdu duomenis galima gauti per vieną minutę po analizės pradžios.

$$\text{Ląstelių gyvybingumas} = \frac{\text{gyvų ląstelių skaičius}}{\text{bendras gautų ląstelių skaičius}} \times 100$$

Tada nustatoma FL1 teigiamų ląstelių procentinė dalis iš tų gyvybingų ląstelių, kurios surinktos pasirinkus R2 regioną (R1 regione). Ląstelių paviršinio žymens CD86 ekspresija analizuojama FL1 / SSC taškinėje diagramoje, sudarytoje parinkus gyvybingų ląstelių regioną (R2).

Visos sudėties terpės / IgG1 bandinių duobutėms analizės žymuo nustatomas artimas pagrindinei populiacijai, kad visos sudėties terpės kontrolinių bandinių IgG1 būtų tiksliniame 0,6–0,9 % intervale.

Spalvinis trukdis apibrėžiamas kaip poslinkis FITC ženklintų IgG1 antikūnų taškinėje diagramoje (IgG1 FL1 SI geometrinis vidurkis ≥ 150 %).

Kontrolinių bandinių ląstelių (neapdorotų arba 0,4 % DMSO tirpale) ir bandomosios cheminės medžiagos paveiktų ląstelių CD86 stimuliavimo indeksas (SI) apskaičiuojamas pagal šią lygtį:

$$SI = \frac{CD86^{+} \text{ paveiktų ląstelių proc.} - IgG1^{+} \text{ paveiktų ląstelių proc.}}{CD86^{+} \text{ kontrolinių ląstelių proc.} - IgG1^{+} \text{ kontrolinių ląstelių proc.}} \times 100$$

„IgG1⁺ neapdorotų kontrolinių ląstelių proc.“ – FL1 teigiamų IgG1 ląstelių procentinė dalis, nustatyta analizės žymeniu (priimtinas intervalas yra $\geq 0,6$ % ir $< 1,5$ %, žr. 22 punktą), iš visų gyvybingų neapdorotų ląstelių.

„IgG1⁺/CD86⁺ kontrolinių / apdorotų ląstelių proc.“ – FL1 teigiamų IgG1/CD86 ląstelių procentinė dalis, nustatyta nekeičiant analizės žymens pozicijos, iš visų gyvybingų kontrolinių ar apdorotų ląstelių.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Duomenų vertinimas

20. Atliekant U-SENSTM bandymą apskaičiuojami šie parametrai: CV70 vertė, t. y. koncentracija, kuriai esant U937 ląstelių išgyvenimas 70 % (30 % citotoksiškumas), ir EC150 vertė, t. y. koncentracija, kuriai esant bandomųjų cheminių medžiagų sukulto CD86 stimuliavimo indeksas (SI) yra 150 %.

CV70 apskaičiuojama logaritminiu tiesiniu interpoliavimu pagal šią lygtį:

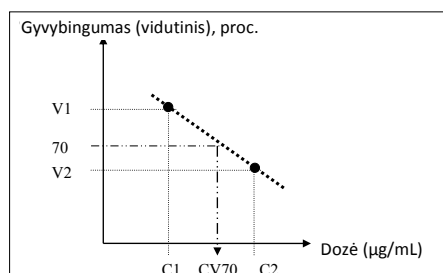
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

kurioje:

V1 – mažiausia ląstelių gyvybingumo vertė virš 70 %,

V2 – didžiausia ląstelių gyvybingumo vertė žemiau 70 %.

C1 ir C2 – atitinkamos koncentracijos, kurioms esant gautos ląstelių gyvybingumo vertės V1 ir V2.



CV70 vertė gali būti gaunama ir kitais metodais, jei įrodoma, kad tai neturi poveikio rezultatams (pvz., atliekant kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų bandymus).

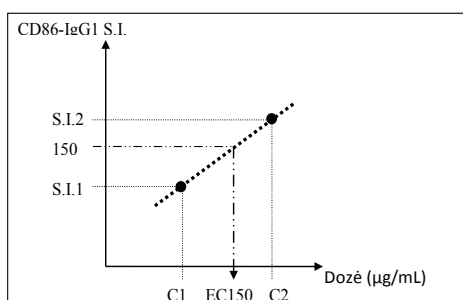
EC150 apskaičiuojama logaritminiu tiesiniu interpoliavimu pagal šią lygtį:

$$EC150 = C1 + [(150 - SI\ 1) / (SI\ 2 - SI\ 1) * (C2 - C1)]$$

kurioje:

C1 – didžiausia koncentracija $\mu\text{g/ml}$, kai CD86 SI < 150 % (SI 1),

C2 – mažiausia koncentracija $\mu\text{g/ml}$, kai CD86 SI $\geq$ 150 % (SI 2).



EC150 ir CV70 vertės apskaičiuojamos:

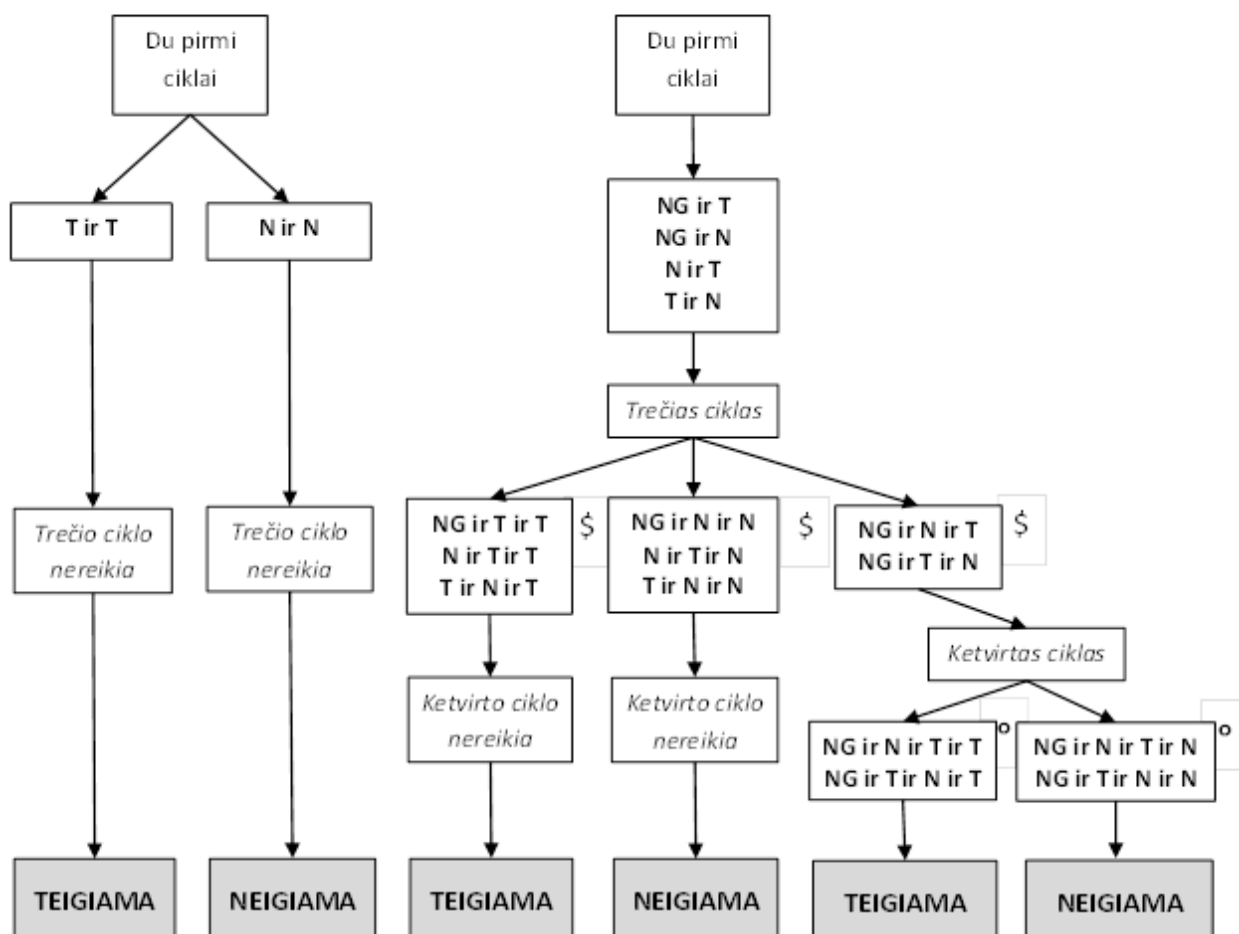
- per kiekvieną bandymo ciklą: atskiros EC150 ir CV70 vertės naudojamos kaip priemonės tiriant CD86 atsako didėjimo su koncentracija susijusį poveikį (žr. 14 punktą),
- remiantis vidutinėmis gyvybingumo vertėmis, nustatoma bendra CV70 (12),
- remiantis vidutiniu CD86 verčių SI, nustatomas bandomosios cheminės medžiagos, dėl kurios pagal U-SENS™ metodą gauta TEIGIAMA prognozė, bendras EC150 (žr. 21 punktą) (12).

Prognozavimo modelis

- Atliekant CD86 ekspresijos matavimą, kiekviena bandomoji cheminė medžiaga bandoma bent keturių koncentracijų ir bent per du atskirus bandymo ciklus (atliekamus skirtingomis dienomis), gaunant vieną prognozę (NEIGIAMA arba TEIGIAMA).
- Atskira kurio nors U-SENS™ bandymo ciklo išvada laikoma neigiama (toliau – N), jei CD86 SI yra mažesnis nei 150 % esant visoms necitotoksiškoms koncentracijoms (ląstelių gyvybingumas $\geq 70\%$) ir nepastebima trukdžių (citotoksiškumo, tirpumo (žr. 18 punktą) ar spalvinių trukdžių (žr. 19 punktą), nepriklausomai nuo to, kokioms necitotoksiškoms koncentracijoms esant pastebimas toks trukdis). Visais kitais atvejais, kai CD86 SI yra 150 % ar didesnis ir (arba) pastebima trukdžių, atskira to U-SENS™ bandymo ciklo išvada laikoma teigiama (toliau – T).

- U-SENS™ prognozė laikoma NEIGIAMA, jei bent dviejų atskirų bandymo ciklų rezultatai yra neigiami (N) (1 diagrama). Jei abiejų pirmų bandymo ciklų rezultatai yra neigiami (N), U-SENS™ prognozė laikoma NEIGIAMA ir trečio ciklo atlikti nereikia.
- U-SENS™ prognozė laikoma TEIGIAMA, jei bent dviejų atskirų bandymo ciklų rezultatai yra teigiami (T) (1 diagrama). Jei abiejų pirmų bandymo ciklų rezultatai yra teigiami (T), U-SENS™ prognozė laikoma TEIGIAMA ir trečio ciklo atlikti nereikia.
- Kadangi neatliekama dozės nustatymo tyrimo, daroma išimtis, jei per pirmąjį bandymo ciklą CD86 SI yra lygus 150 % arba didesnis tik esant didžiausiai necitotoksiškai koncentracijai. Tas ciklas tada laikomas NEGALUTINIU (NG) ir reikėtų per papildomus ciklus ištirti papildomas koncentracijas (tarp didžiausios necitotoksiškos koncentracijos ir mažiausios citotoksiškos koncentracijos – žr. 20 punktą). Tuo atveju, jei nustatoma, kad tam tikras ciklas yra negalutinis (NG), reikėtų dar bent 2 papildomų ciklų, ir ketvirto ciklo tuo atveju, jei 2 ir 3 ciklų rezultatai nesutampa (skirtingai N ir (arba) T) (1 diagrama). Paskesnių ciklų rezultatai bus laikomi teigiamais, net jei tik vienos necitotoksiškos koncentracijos CD86 vertė bus lygi 150 % ar didesnė, nes koncentracijos vertės yra atitinkamai nustatytos tai konkrečiai bandomajai cheminei medžiagai. Galutinė prognozė bus pagrįsta per tris arba keturis atskirus bandymo ciklus gautų rezultatų dauguma (t. y. 2 iš 3 arba 2 iš 4) (1 diagrama).

1 diagrama. Prognozavimo modelis, naudojamas atliekant U-SENS™ bandymą. U-SENS™ prognozė reikėtų vertinti remiantis IATA sistema ir laikantis 4 punkto ir bendrojo įvado 7, 8 bei 9 punktų nuostatų.



N – ciklas, kurio metu nenustatyta CD86 teigiamo atsako ar trukdžių;

T – ciklas, kurio metu nustatytas CD86 teigiamas atsakas ir (arba) trukdžiai;

NG – negalutinis. Pirmas bandymo ciklas yra negalutinis, kai CD86 yra teigiamas tik esant didžiausiai necitotoksiškai koncentracijai.

#: negalutinė (NG) atskira išvada, padaryta tik dėl pirmojo bandymo ciklo, visada reiškia, kad reikia atlikti trečią ciklą, kad būtų gauta teigiamų (T) arba neigiamų (N) išvadų dauguma bent per 2 iš 3 atskirų ciklų.

S: šiuose langeliuose parodyti atitinkami visų trijų ciklų rezultatų deriniai, remiantis per pirmus du ciklus gautais rezultatais, parodytais aukščiau esančiame langelyje.

⁹: šiuose langeliuose parodyti atitinkami visų keturių ciklų rezultatų deriniai, remiantis per pirmus tris ciklus gautais rezultatais, parodytais aukščiau esančiame langelyje.

Priimtinumo kriterijai

22. Atliekant U-SENS™ bandymą turėtų būti tenkinami šie priimtino kriterijai (12):

- 45 ± 3 val. veikimo bandomąja medžiaga laikotarpio pabaigoje vidutinis trijų kartotinių bandinių neapdorotų U937 ląstelių gyvybingumas turi būti $>90\%$ ir neturi būti nustatyta CD86 ekspresijos poslinkio. Neapdorotų U937 ląstelių CD86 bazinė ekspresija turi būti intervale nuo $\geq 2\%$ iki $\leq 25\%$;
- kai DMSO naudojamas kaip tirpiklis, DMSO nešiklio kontrolinio bandinio tinkamumas įvertinamas apskaičiuojant DMSO stimuliavimo indeksą (SI), palyginant jį su neapdorotomis ląstelėmis, ir vidutinis trijų kartotinių bandinių ląstelių gyvybingumas turi būti $>90\%$. DMSO nešiklio kontrolinis bandinys yra tinkamas, jei jo trijų kartotinių bandinių CD86 SI vidutinė vertė yra mažesnė nei neapdorotų U937 ląstelių trijų kartotinių bandinių CD86 SI vidurkio 250 %;
- bandymo ciklai laikomi tinkamais, jei bent dvi iš trijų neapdorotų U937 ląstelių IgG1 verčių yra intervale nuo $\geq 0,6\%$ iki $<1,5\%$;
- kartu bandytas neigiamas kontrolinis (pieno rūgštis) bandinys laikomas tinkamu, jei bent dviejų iš trijų kartotinių bandinių rezultatai yra neigiami (CD86 SI $< 150\%$) ir necitotoksiški (ląstelių gyvybingumas $\geq 70\%$);
- teigiamas kontrolinis (TNBS) bandinys laikomas tinkamu, jei bent dviejų iš trijų kartotinių bandinių rezultatai yra teigiami (CD86 SI $\geq 150\%$) ir necitotoksiški (ląstelių gyvybingumas $\geq 70\%$).

Bandymo ataskaita

23. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga

Vienkomponentė medžiaga:

- cheminis identifikavimas, toks kaip IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS numeris (-iai), SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;
- fizinė išvaizda, tirpumas visos sudėties terpėje, tirpumas DMSO, molekulinė masė ir papildomos svarbios fizinės ir cheminės savybės (tiek, kiek žinoma);
- grynumas, priemaišų cheminė tapatybė (kai tinka ir jei praktiškai įmanoma) ir kt.;
- apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);
- bandomoji (-osios) koncentracija (-os);

- laikymo sąlygos ir stabilumas (tiek, kiek žinoma);
- pagrindimas, kodėl pasirinktas tam tikras tirpiklis ar nešiklis kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai.

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

- kuo išsamesnis apibūdinimas, pvz., cheminė tapatybė (žr. pirmiau), grynumas, kiekybinė sudėtis ir svarbios fizikinės ir cheminės savybės (žr. pirmiau), būdingos sudedamosioms dalims (tiek, kiek žinoma);
- fizinė išvaizda, tirpumas visos sudėties terpėje, tirpumas DMSO ir papildomos svarbios fizikinės ir cheminės savybės (tiek, kiek žinoma);
- molekulinė masė arba vidutinė molekulinė masė, jei tai yra žinomos sudėties mišiniai ar polimerai, arba kita šiam tyrimui svarbi informacija;
- apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);
- bandomoji (-osios) koncentracija (-os);
- laikymo sąlygos ir stabilumas (tiek, kiek žinoma);
- pagrindimas, kodėl pasirinktas tam tikras tirpiklis ar nešiklis kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai.

Kontroliniai bandiniai

Teigiamas kontrolinis bandinys:

- cheminis identifikavimas, toks kaip IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS numeris (-iai), SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;
- fizinė išvaizda, tirpumas DMSO, molekulinė masė ir papildomos svarbios fizikinės ir cheminės savybės (tiek, kiek žinoma, ir kai tinka);
- grynumas, priemaišų cheminė tapatybė (kai tinka ir jei praktiškai įmanoma) ir kt.;
- apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);
- bandomoji (-osios) koncentracija (-os);
- laikymo sąlygos ir stabilumas (tiek, kiek žinoma);
- nuoroda į ankstesnius teigiamus kontrolinių bandinių rezultatus, iš kurių nustatyti tinkami bandymo eigos priimtino kriterijai (jei tinka).

Neigiamas ir tirpiklio ar nešiklio kontroliniai bandiniai:

- cheminis identifikavimas, toks kaip IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS numeris (-iai), SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;
- grynumas, priemaišų cheminė tapatybė (kai tinka ir jei praktiškai įmanoma) ir kt.;
- fizinė išvaizda, molekulinė masė ir papildomos svarbios fizinės ir cheminės savybės (tiek, kiek žinoma) tuo atveju, jei naudojamas ne vienas iš nurodytų bandymo gairėse, o kitas kontrolinio bandinio tirpiklis ar nešiklis;
- laikymo sąlygos ir stabilumas (tiek, kiek žinoma);
- pagrindimas, kodėl pasirinktas tam tikras tirpiklis ar nešiklis kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai.

Bandymo sąlygos

- Rėmėjo pavadinimas ir adresas, bandymų laboratorija ir tyrimo vadovas;
- naudoto bandymo aprašymas;
- naudojama ląstelių linija, jos laikymo sąlygos ir šaltinis (pvz., įstaiga, iš kurios gautos ląstelės);
- naudojama tėkmės citometrijos įranga (pvz., modelis), įskaitant prietaisų nuostačius, antikūnus ir naudojamą citotoksiškumo žymenį;
- pagal kokią procedūrą įrodyta laboratorijos kvalifikacija atlikti šį bandymą, atliekant kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų bandymus, ir pagal kokią procedūrą įrodytas šio bandymo atlikimo atkuriamumas laikui bėgant, pvz., remiantis ankstesniais kontroliniais duomenimis ir (arba) ankstesnių reaktyvumo patikrinimų duomenimis.

Bandymo priimtino kriterijai

- Ląstelių gyvybingumo ir CD86 stimuliavimo indekso (SI) vertės, gautos naudojant tirpiklio ar nešiklio kontrolinį bandinį, palyginti su nustatytais priimtino intervalais;
- ląstelių gyvybingumo ir SI vertės, gautos naudojant teigiamą kontrolinį bandinį, palyginti su nustatytais priimtino intervalais;
- ląstelių gyvybingumas esant visoms bandymui naudojamoms bandomosios cheminės medžiagos koncentracijoms.

Bandymo procedūra

- Bandymo ciklų skaičius;
- bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos, jos įterpimas ir pasirinktas veikimo laikas (jei skiriasi nuo rekomenduojamo);
- veikimo bandomąja medžiaga trukmė;
- atliekant vertinimą ir priimant sprendimą taikytų kriterijų aprašymas;
- bet kokių bandymo procedūros keitimų aprašymas.

Rezultatai

- Duomenų lentelė, įskaitant CV70 vertę (jei tinka), stimuliavimo indeksą (SI), ląstelių gyvybingumo vertes, EC150 vertes (jei tinka), gautas iš bandomosios cheminės medžiagos bandinių ir teigiamo kontrolinio bandinio per kiekvieną ciklą, ir nurodytą bandomosios cheminės medžiagos vertinimą pagal prognozavimo modelį;
- bet kokių kitų svarbių stebėjimų aprašymas (jei tinka).

Rezultatų aptarimas

- Atliekant U-SENSTM bandymą gautų rezultatų aptarimas;
- bandymo rezultatų apsvaistymas atsižvelgiant į IATA sistemą, jei turima ir kitos svarbios informacijos.

Išvados

LITERATŪRA

- (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*. Pateikta 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. Paskelbta [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. Paskelbta <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/euro-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing>.
- (5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014. *Cosmetics* 3, 14.
- (6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, *Series on Testing & Assessment* No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Paskelbta [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm].
- (7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.
- (8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015).

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

- (9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.
- (10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683-1696.
- (11) OECD. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Paskelbta 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. Pateikta [<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. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Paskelbta <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (15) Jungtinės Tautos (JT) (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. Paskelbta http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
- (16) OECD (2012). *Series on Testing and Assessment* No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic

Cooperation and Development, Paris. Paskelbta
<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. Paskelbta
https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

2.1. priedėlis

TERMINŲ APIBRĖŽTYS

Tikslumas – bandymo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tai yra bandymo atlikimo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Šis terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „atitiktis“ ir reiškia tinkamų bandymo rezultatų dalį (14).

Nepalankios baigties kelias (angl. *Adverse Outcome Pathway*, AOP) – įvykių seka nuo tikslinės cheminės medžiagos ar panašių cheminių medžiagų grupės cheminės struktūros per molekulinio inicijavimo įvykį iki *in vivo* tiriamo rezultato (15).

CD86 atsakas į koncentraciją – priklausomumas nuo koncentracijos (arba atsakas į koncentraciją), kai po teigiamos koncentracijos (kuriai esant CD86 stimuliavimo indeksas (SI) ≥ 150) tolesnės koncentracijos CD86 SI yra didesnis.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

CV70 – nustatyta koncentracijos vertė, kuriai esant ląstelių gyvybingumas yra 70 %.

Poslinkis yra, kai: i) neapdoroto kontrolinio kartotinio 3 bandinio pakoreguota %CD86⁺ vertė yra mažesnė nei neapdorotų kontrolinių kartotinių 1 ir 2 bandinių pakoreguotos %CD86⁺ vertės vidurkio 50 %; ir ii) neigiamo kontrolinio kartotinio 3 bandinio pakoreguota %CD86⁺ vertė yra mažesnė nei neigiamų kontrolinių kartotinių 1 ir 2 bandinių pakoreguotos %CD86⁺ vertės vidurkio 50 %.

EC150 – nustatytos koncentracijos vertės, kurioms esant CD86 ekspresijos SI yra 150 %.

Tėkmės citometrija – citometrinis metodas, pagal kurį ląstelės viena po kitos suspenduojamos skysčio tėkmėje ir leidžiamos per jaudrinančios šviesos židinį, kuriame šviesa išskaidoma toms ląstelėms ir jų sudedamosioms dalims būdingais raštais; ląstelės dažnai pažymimos fluorescenciniais žymenimis, todėl šviesa pirmiausia sugerama, o tada išspinduliuojama pakitusiais dažniais.

Pavojus – būdingoji medžiagos savybė arba situacija, galinti sukelti neigiamų padarinių, kai organizmą, sistemą ar populiaciją (arba jos dalį) veikia ta medžiaga.

IATA (integruotasis bandymo ir vertinimo metodas, angl. *Integrated Approach to Testing and Assessment*) – struktūrinis metodas, taikomas cheminės medžiagos ar cheminių medžiagų grupės (galimam) pavojui nustatyti, pavojui (veikimo gebai) apibūdinti ir (arba) saugai vertinti (dėl galimo pavojaus ar veikimo gebos ir paveikimo ta medžiaga). Jį taikant strategiškai apibendrinami ir įvertinami visi susiję duomenys, kad būtų galima ta

informacija pagrįsti reglamentavimo sprendimą dėl galimo pavojaus ir (arba) rizikos ir (arba) dėl būtinumo atlikti papildomus tikslinius, taigi minimalius bandymus.

Mišinys – iš dviejų ar daugiau medžiagų sudarytas mišinys ar tirpalas.

Vienkomponentė medžiaga – medžiaga, apibrėžiama pagal jos kiekybinę sudėtį, kurioje vienas pagrindinis komponentas sudaro ne mažiau kaip 80 % (masės).

Daugiakomponentė medžiaga – medžiaga, apibrėžiama pagal jos kiekybinę sudėtį, kurioje daugiau kaip vieno pagrindinio komponento koncentracija yra ≥ 10 % (masės) ir < 80 % (masės). Daugiakomponentė medžiaga yra gamybos proceso rezultatas. Daugiakomponentė medžiaga nuo mišinio skiriasi tuo, kad mišinys gaunamas sumaišant dvi arba daugiau medžiagų, tarp kurių cheminė reakcija nevyksta. Daugiakomponentė medžiaga yra cheminės reakcijos rezultatas.

Teigiamas kontrolinis bandinys – kartotinis bandinys, kuriame yra visi bandymo sistemos komponentai, apdorotas tam tikra medžiaga, kuri, kaip žinoma, sukelia teigiamą atsaką. Siekiant užtikrinti, kad būtų galima vertinti teigiamo kontrolinio bandinio atsako kintamumą laikui bėgant, teigiamas atsakas neturėtų būti per stiprus.

Prehaptentai – cheminės medžiagos, kurios tampa jautrinančios po abiotinio virsmo, pvz., dėl oksidacijos.

Prohaptentai – cheminės medžiagos, kurias būtina aktyvinti fermentais, kad pasireikštų jų odos jautrinimo geba.

Tinkamumas – ryšio tarp bandymo ir tiriamo poveikio, taip pat bandymo reikšmingumo ir naudingumo siekiant tam tikro tikslo apibūdinimas. Tai yra atliekant bandymą tiriamo biologinio poveikio matavimo ar prognozavimo tikslumo laipsnis. Tinkamumas apima bandymo tikslumo (atitikties) aspektą (14).

Patikimumas – pagal tą patį protokolą atliekamo bandymo atkuriamumo laboratorijose ir tarp laboratorijų, laikui bėgant, matas. Jis įvertinamas apskaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų ir pakartojamumą laboratorijoje (14).

Bandymo ciklas – vienos ar daugiau bandomųjų cheminių medžiagų bandymas kartu naudojant tirpiklio ar nešiklio kontrolinį bandinį ir teigiamą kontrolinį bandinį.

Jautris – visų teigiamų (veikliųjų) cheminių medžiagų, kurios teisingai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Tai yra bandymo, kuriuo gaunami kategorijos nustatymo rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo tinkamumą (14).

SI – stimuliacijos indeksas. Cheminės medžiagos paveiktų ląstelių fluorescencijos intensyvumo geometrinio vidurkio santykinės vertės, palyginti su tirpikliu apdorotomis ląstelėmis.

Tirpiklio ar nešiklio kontrolinis bandinys – neapdorotas bandinys, kuriame yra visi bandymo sistemos komponentai, išskyrus bandomąją cheminę medžiagą, tačiau įskaitant naudojamą tirpiklį ar nešiklį. Jis naudojamas nustatant bazinį atsaką bandiniuose, apdorotuose bandomąja chemine medžiaga, ištirpinta ar stabiliai disperguota tame pačiame tirpiklyje ar nešiklyje. Kai šis bandinys naudojamas bandymui kartu su terpės kontroliniu bandiniu, jis taip pat parodo, ar tirpiklis arba nešiklis veikia bandymo sistemą.

Specifiškumas – visų neigiamų (neveikliųjų) cheminių medžiagų, kurios teisingai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Tai yra bandymo, kuriuo gaunami kategorijos nustatymo rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo tinkamumą (14).

Dažymo buferinis tirpalas – fosfatinis buferinis druskų tirpalas, kuriame yra 5 % veršelio embriono serumo.

Medžiaga – gamtoje randamas ar bet kokio gamybos proceso metu gaunamas cheminis elementas ir jo junginiai, įskaitant bet kokius priedus, reikalingus jo stabilumui išlaikyti, ir priemaišas, atsirandančias dėl gamybos proceso, tačiau išskyrus tirpiklius, kuriuos galima atskirti nedarant poveikio medžiagos stabilumui ir nekeičiant jos sudėties.

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

Jungtinių Tautų visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistema (JT GHS) – sistema, kurioje pateikiamas cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikavimas pagal standartizuotus fizinių pavojų, pavojų sveikatai bei aplinkai tipus ir lygius, ir naudojami atitinkami informaciniai elementai, tokie kaip piktogramos, signaliniai žodžiai, pavojingumo frazės, atsargumo frazės ir saugos duomenų lapai, kad būtų perduota informacija apie jų neigiamą poveikį, siekiant apsaugoti žmones (įskaitant darbdavius, darbuotojus, vežėjus, vartotojus ir avarijų likviduotojus) ir aplinką (16).

UVCB – nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudedamieji reakcijų produktai ar biologinės medžiagos.

Patvirtinto tinkamumo bandymas – bandymas, laikomas pakankamai tinkamu ir patikimu konkrečiam tikslui pasiekti ir pagrįstas moksliškai patikimais principais. Bandymas niekada nėra absoliučiai tinkamas – jis yra tinkamas tik tam tikram tikslui pasiekti (14).

2.2. priedėlis

KVALIFIKACIJAI TIKRINTI SKIRTOS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

Prieš pradėdamos įprastu būdu atlikti šiame priedėlyje aprašytą bandymą pagal bandymo metodą B.71, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją, gaudamos teisingą numatytą U-SENSTM prognozę dėl 10 medžiagų, rekomenduojamų 1 lentelėje, ir gaudamos CV70 bei EC150 vertes, kurios patenka į atitinkamus etaloninius intervalus, dėl ne mažiau kaip 8 iš 10 kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų. Kvalifikacijai tikrinti skirtos cheminės medžiagos buvo pasirinktos siekiant aprėpti odos jautrinimo pavojams būdingų atsakų spektrą. Kiti jų atrankos kriterijai buvo tokie, kad tų medžiagų būtų galima įsigyti iš komercinių tiekėjų ir kad būtų galima gauti aukštos kokybės *in vivo* etaloninių duomenų bei aukštos kokybės *in vitro* duomenų, nustatytų atliekant U-SENSTM bandymą. Taip pat yra paskelbti U-SENSTM bandymo atlikimo etaloniniai duomenys (1) (8).

1 lentelė. Cheminės medžiagos, rekomenduojamos techninei kvalifikacijai tikrinti dėl U-SENSTM bandymo

Kvalifikacijai tikrinti skirtos cheminės medžiagos	CAS Nr.	Fizinė būseną	Prognozė <i>in vivo</i> ¹	U-SENS TM tirpiklis / nešiklis	U-SENS TM CV70 etaloninis intervalas µg/ml ²	U-SENS TM EC150 etaloninis intervalas µg/ml ²
4-fenilendiaminas	106-50-3	Kietoji medžiaga	Jautrinanti medžiaga (stipriai)	Visos sudėties terpė ³	<30	Teigiama (≤10)
Pikrilsulfonrūgštis	2508-19-2	Skystis	Jautrinanti (stipriai)	Visos sudėties terpė	>50	Teigiama (≤50)
Dietilmaleatas	141-05-9	Skystis	Jautrinanti medžiaga (vidutinio stiprumo)	DMSO	10–100	Teigiama (≤20)
Rezorcinolis	108-46-3	Kietoji medžiaga	Jautrinanti medžiaga (vidutinio stiprumo)	Visos sudėties terpė	>100	Teigiama (≤50)
Cinamilo alkoholis (stirolis)	104-54-1	Kietoji medžiaga	Jautrinanti medžiaga (silpnai)	DMSO	>100	Teigiama (10–100)
4-alilanzolas	140-67-0	Skystis	Jautrinanti medžiaga (silpnai)	DMSO	>100	Teigiama (<200)
Sacharinas	81-07-2	Kietoji medžiaga	Nejautrinanti medžiaga	DMSO	>200	Neigiama (>200)
Glicerolis	56-81-5	Skystis	Nejautrinanti medžiaga	Visos sudėties	>200	Neigiama (>200)

				terpė		
Pieno rūgštis	50-21-5	Skystis	Nejautrinanti medžiaga	Visos sudėties terpė	>200	Neigiama (>200)
Salicilo rūgštis	69-72-7	Kietoji medžiaga	Nejautrinanti medžiaga	DMSO	>200	Neigiama (>200)

Santrumpos: CAS Nr. – Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos registro numeris.

¹ Pavojaus (ir veikimo gebos) *in vivo* prognozė pagrįsta LLNA duomenimis (1) (8). Veikimo *in vivo* geba gauta taikant ECETOC pasiūlytus kriterijus (17).

² Pagrįsta anksčiau nustatytomis vertėmis (1) (8).

³ Visos sudėties terpė – RPMI-1640 terpė, papildyta 10 % veršelio embriono serumo, 2 mM L-glutamino, 100 vnt./ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino (8).

3 priedėlis

ODOS JAUTRINIMAS *IN VITRO*. IL-8 LUC TYRIMAS

PIRMINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

1. Priešingai nei tyrimai, kuriuos atliekant analizuojama ląstelių paviršinių žymenų ekspresija, atliekant IL-8 Luc tyrimą kiekybiškai nustatomi IL-8 (citokino, siejamo su dendritinių ląstelių aktyvinimu) ekspresijos pokyčiai. Iš THP-1 gautoje IL-8 reporterinių ląstelių linijoje (THP-G8, gauta iš žmogaus ūminės monocitinės leukemijos ląstelių linijos THP-1) matuojama IL-8 ekspresija paveikus jautrinančiomis medžiagomis (1). Nustatyta liuciferazės ekspresija naudojama padedant skirti odą jautrinančias ir nejautrinančias medžiagas.
2. IL-8 Luc tyrimas įvertintas atlikus tinkamumo patvirtinimo tyrimą (2), kurį atliko Japonijos alternatyvių metodų patvirtinimo centras (JaCVAM), **Ekonomikos, prekybos ir pramonės ministerija** (METI) ir Japonijos **Alternatyvų bandymams su gyvūnais draugija** (JSAAE), o vėliau atlikta jo nepriklausoma ekspertizė (3) vadovaujant JaCVAM ir Sveikatos, darbo ir gerovės ministerijai (MHLW) ir padedant **Tarptautinio bendradarbiavimo rengiant alternatyvius bandymų metodus** organizacijai (ICATM). Atsižvelgiant į visus turimus įrodymus ir į reguliavimo institucijų bei suinteresuotųjų subjektų įnašus, IL-8 Luc tyrimas laikomas naudingu kaip IATA dalis, padedant skirti odą jautrinančias medžiagas nuo nejautrinančių medžiagų, kad būtų galima jas klasifikuoti pagal pavojingumą ir atitinkamai ženklinėti. IL-8 Luc tyrimo duomenų naudojimo kartu su kita informacija pavyzdžių pateikta literatūroje (4) (5) (6).
3. Įrodyta, kad IL-8 Luc tyrimą galima pritaikyti laboratorijose, turinčiose ląstelių kultūrų auginimo ir liuciferazės matavimo patirties. Nustatytas jo laboratorinis ir tarplaboratorinis atkuriamumas atitinkamai yra 87,7 % ir 87,5 % (2). Duomenys, gauti atlikus tinkamumo patvirtinimo tyrimą (2) ir iš kitų paskelbtų mokslo darbų (1) (6), rodo, kad, palyginti su LLNA, atlikus IL-8 Luc tyrimą dėl 118 iš 143 cheminių medžiagų buvo gautas teigiamas arba neigiamas rezultatas, o 25 cheminių medžiagų rezultatai buvo negalutiniai, ir IL-8 Luc tyrimo tikslumas skiriant odą jautrinančias (JT GHS ar CLP 1 kategorijos) medžiagas nuo nejautrinančių (jokios JT GHS ar CLP kategorijos) medžiagų yra 86 % (101/118), esant 96 % (92/96) jautriui ir 41 % (9/22) specifiškumui. Išskyrus medžiagas, neįtrauktas į šio tyrimo taikymo sritį, kaip apibūdinta toliau (5 punktas), atlikus IL-8 Luc tyrimą dėl 113 iš 136 cheminių medžiagų buvo gautas teigiamas arba neigiamas rezultatas, o 23 cheminių medžiagų rezultatai buvo negalutiniai, ir IL-8 Luc tyrimo tikslumas yra 89 % (101/113), esant 96 % (92/96) jautriui ir 53 % (9/17) specifiškumui. Naudojant duomenis apie

žmones, nurodytus Urbisch *et al.* (7), atlikus IL-8 Luc tyrimą dėl 76 iš 90 cheminių medžiagų buvo gautas teigiamas arba neigiamas rezultatas, o 14 cheminių medžiagų rezultatai buvo negalutiniai, ir šio tyrimo tikslumas yra 80 % (61/76), jautris 93 % (54/58) ir specifiškumas 39 % (7/18). Išskyrus medžiagas, neįtrauktas į šio tyrimo taikymo sritį, atlikus IL-8 Luc tyrimą dėl 71 iš 84 cheminių medžiagų buvo gautas teigiamas arba neigiamas rezultatas, o 13 cheminių medžiagų rezultatai buvo negalutiniai, ir šio tyrimo tikslumas yra 86 % (61/71), esant 93 % (54/58) jautriui ir 54 % (7/13) specifiškumui. Klaidingai neigiamos prognozės atliekant IL-8 Luc tyrimą yra labiau tikėtinos dėl tų cheminių medžiagų, kurių odos jautrinimo geba yra maža arba vidutinė (JT GHS ar CLP 1B subkategorijos medžiagos), negu tų, kurių jautrinimo geba yra didelė (JT GHS ar CLP 1A subkategorijos) (6). Visa ši informacija patvirtina IL-8 Luc tyrimo naudingumą nustatant odos jautrinimo pavojus. Nurodytos IL-8 Luc tyrimo, atliekamo kaip atskiras bandymas, tikslumo vertės yra tik orientacinės, nes šio bandymo duomenis reikėtų vertinti kartu su informacija iš kitų šaltinių, kaip IATA dalį, ir pagal bendrojo įvado 7 ir 8 punktuose pateiktas nuostatas. Be to, vertinant odos jautrinimo bandymus ne su gyvūnais, reikėtų atminti, kad LLNA bandymas ir kiti bandymai su gyvūnais gali neviseškai tiksliai parodyti su žmonėmis susijusią padėtį.

4. Remiantis šiuo metu turimais duomenimis, įsitikinta, kad IL-8 Luc tyrimas tinka bandomosioms cheminėms medžiagoms, apimančioms įvairias organines funkcines grupes, reakcijos mechanizmus, odos jautrinimo gebą (kaip nustatyta atliekant *in vivo* tyrimus), fizikines ir chemines savybes (2) (6).
5. Nors atliekant IL-8 Luc tyrimą kaip tirpiklis naudojamas X-VIVO™ 15, jį atliekant tiksliai įvertintos tos cheminės medžiagos, kurių $\text{Log } K_{ow} > 3,5$, ir tos, kurių tirpumas vandenyje apie 100 µg/ml (apskaičiuotas naudojant *EPI Suite™*), o šio metodo veiksmingumas nustatant mažai vandenyje tirpias jautrinančias medžiagas yra didesnis negu tada, kai atliekant IL-8 Luc tyrimą kaip tirpiklis naudojamas dimetilsulfoksidas (DMSO) (2). Tačiau neigiami rezultatai, gauti dėl bandomųjų cheminių medžiagų, kurios netirpsta esant 20 mg/ml koncentracijai, gali būti klaidingai neigiami rezultatai dėl jų netirpumo X-VIVO™ 15. Todėl į šių cheminių medžiagų neigiamus rezultatus neturėtų būti atsižvelgiama. Atliekant tinkamumo patvirtinimo tyrimą buvo gauta didelė klaidingai neigiamų anhidridų rezultatų dalis. Be to, dėl ribotos šios ląstelių linijos metabolinės gebos (8) ir bandymo sąlygų atliekant šį tyrimą gali būti gauti neigiami rezultatai dėl prohaptenu (medžiagų, kurias būtina aktyvinti fermentais), ir prehaptenu (medžiagų, kurios aktyvinamos oksidacija ore). Tačiau nors medžiagų, kurios, kaip įtariama, gali būti prehaptenu ar prohaptenu, neigiami rezultatai turėtų būti aiškinami atsargiai, atliekant IL-8 Luc tyrimą teisingai įvertinta 11 iš 11 prehaptenu, 6 iš 6 prohaptenu ir 6 iš 8 prehaptenu

ar prohaptenu – šie rezultatai pateikti IL-8 Luc tyrimo duomenų rinkinyje (2). Remiantis neseniai atlikta išsamia trijų bandymų ne su gyvūnais (DPRA, *KeratinSens*TM ir h-CLAT) peržiūra vertinant, kaip jais nustatomi prehaptenu ir prohaptenu (9), ir remiantis tuo, kad IL-8 Luc tyrimui naudojamos THP-G8 ląstelės yra ląstelių linija, gauta iš THP-1 linijos, naudojamos h-CLAT tyrimui, IL-8 Luc tyrimas taip pat gali padėti padidinti bandymų, atliekamų ne su gyvūnais, jautrį nustatyti prehaptenus ir prohaptenus, kartu atliekant kitus bandymus. Iki šiol atliekant paviršinio aktyvumo medžiagų bandymus gauti (klaidingai) teigiami rezultatai nepriklausomai nuo jų tipo (pvz., katijoninės, anijoninės ar nejoninės medžiagos). Galiausiai cheminės medžiagos, kurios veikia liuciferazę, gali iškreipti jos veikimą ar matavimą, sukeldamos akivaizdų slopinimą arba padidindamos liuminescenciją (10). Pavyzdžiui, pranešta, kad didesnės kaip 1 μ M fitoestrogenų koncentracijos trikdo liuminescencijos signalus atliekant kitus liuciferazės reporterinio geno tyrimus dėl per didelio liuciferazės reporterinio geno aktyvinimo. Dėl to liuciferazės ekspresiją, gautą esant didelėms fitoestrogenų ar junginių, laikomų galinčiais sukelti fitoestrogenams būdingą liuciferazės reporterinio geno aktyvinimą, koncentracijoms, reikia vertinti atsargiai (11). Remiantis tuo, kas išdėstyta, į šio tyrimo taikymo sritį neįtrauktos paviršinio aktyvumo medžiagos, anhidridai ir liuciferazę veikiančios cheminės medžiagos. Tais atvejais, kai yra įrodymų, kad IL-8 Luc tyrimas netinka kitų konkrečių kategorijų bandomosioms cheminėms medžiagoms, šio bandymo nereikėtų atlikti dėl tų konkrečių kategorijų medžiagų.

6. Kaip aprašyta pirmiau, IL-8 Luc tyrimu padedama skirti odą jautrinančias medžiagas nuo nejautrinančių medžiagų. Reikia atlikti tolesnį darbą, geriausia remiantis duomenimis apie žmones, siekiant nustatyti, ar IL-8 Luc bandymo rezultatai, kartu remiantis kitais informacijos šaltiniais, gali padėti vertinti jautrinimo gebą.
7. Terminų apibrėžtys pateiktos 3.1. priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAS

8. IL-8 Luc tyrimui naudojama žmogaus monocitinės leukemijos ląstelių linija THP-1, gauta iš „American Type Culture Collection“ (Manasasas, Virdžinija, JAV). Naudojant šią ląstelių liniją, Tohoku universiteto Medicinos mokyklos Dermatologijos fakultete sukurta iš THP-1 gauta IL-8 reporterinių ląstelių linija THP-G8, kurioje yra stabiliosios oranžinės liuciferazės (SLO) ir stabiliosios raudonos liuciferazės (SLR) genai, atitinkamai kontroliuojami IL-8 ir gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenazės (GAPDH) promotorių (1). Taip galima kiekybiškai matuoti liuciferazės geno indukciją, nustatant liuminescenciją iš aiškiai nustatytų šviesą išskiriančių liuciferazės substratų, kaip IL-8 ir GAPDH aktyvumo ląstelėse, paveiktose jautrinančiomis cheminėmis medžiagomis, rodiklį.

9. Dvispalvė tyrimo sistema susideda iš oranžinę šviesą skleidžiančios liuciferazės (SLO; $\lambda_{max} = 580 \text{ nm}$) (12), skirtos IL-8 promotoriaus geno ekspresijai, ir raudoną šviesą skleidžiančios liuciferazės (SLR; $\lambda_{max} = 630 \text{ nm}$) (13), skirtos vidaus kontrolės promotoriaus GAPDH geno ekspresijai matuoti. Abi liuciferazės skleidžia skirtingų spalvų šviesą reaguodamos su jonvabalių d-liuciferinu, o jų liuminescencija matuojama vienu metu per vieno etapo reakciją, tiriamo mišinio skleidžiamą spinduliuotę išskaidant naudojamu optiniu filtru (14) (3.2. priedėlis).
10. THP-G8 ląstelės yra 16 valandų veikiamos bandomąja chemine medžiaga, po to matuojamas SLO liuciferazės aktyvumas (SLO-LA), atitinkantis IL-8 promotoriaus veikimą, ir SLR liuciferazės aktyvumas (SLR-LA), atitinkantis GAPDH promotoriaus veikimą. Kad būtų lengviau suprasti santrumpas, SLO-LA ir SLR-LA atitinkamai žymimi kaip IL8LA ir GAPLA. 1 lentelėje apibrėžti terminai, susiję su liuciferazės aktyvumu per IL-8 Luc tyrimą. Išmatuotos vertės naudojamos apskaičiuojant normalizuotą IL8LA (nIL8LA), kuris yra IL8LA ir GAPLA santykis; nIL8LA indukciją (Ind-IL8LA), kuri yra THP-G8 ląstelių, paveiktų bandomąja chemine medžiaga, keturis kartus išmatuotų nIL8LA verčių ir nepaveiktų THP-G8 ląstelių nIL8LA verčių aritmetinių vidurkių santykis; ir GAPLA slopinimą (Inh-GAPLA), kuris yra THP-G8 ląstelių, paveiktų bandomąja chemine medžiaga, keturis kartus išmatuotų GAPLA verčių ir nepaveiktų THP-G8 ląstelių GAPLA verčių aritmetinių vidurkių santykis, naudojamas kaip citotoksiškumo rodiklis.

1 lentelė. Su liuciferazės aktyvumu atliekant IL-8 Luc tyrimą susijusių terminų apibrėžtys

Santrumpos	Apibrėžtis
GAPLA	SLR liuciferazės aktyvumas, atitinkantis GAPDH promotoriaus veikimą
IL8LA	SLO liuciferazės aktyvumas, atitinkantis IL-8 promotoriaus veikimą
nIL8LA	IL8LA / GAPLA
Ind-IL8LA	cheminėmis medžiagomis paveiktų THP-G8 ląstelių nIL8LA / nepaveiktų ląstelių nIL8LA
Inh-GAPLA	cheminėmis medžiagomis paveiktų THP-G8 ląstelių GAPLA / nepaveiktų ląstelių GAPLA
CV05	Mažiausia cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant Inh-GAPLA tampa <0,05.

11. Paskelbti procedūros atlikimo standartai (angl. *Performance standards*, PS) (15), kad būtų galima lengviau patvirtinti iš dalies pakeistų *in vitro* IL-8 liuciferazės bandymų, panašių į IL-8 Luc tyrimą, tinkamumą ir tinkamu laiku pakeisti EBPO bandymų gaires 442E, įtraukiant tuos bandymus. EBPO savitarpis duomenų pripažinimas (angl. *Mutual Acceptance of Data*, MAD) bus užtikrintas tik dėl tų bandymų, kurių tinkamumas

patvirtintas pagal PS standartus, jei tie bandymai įvertinti ir įtraukti į EBPO bandymų gaires 442E (16).

KVALIFIKACIJOS ĮRODYMAS

12. Prieš pradėdamos įprastai atlikti šiame priedėlyje aprašytą bandymą pagal bandymo metodą B.71, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją naudodamos 10 kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų, kurių sąrašas pateiktas 3.3 priedėlyje, pagal gerąją *in vitro* metodų taikymo praktiką (17). Be to, šio bandymo naudotojai turėtų turėti ankstesnių duomenų bazę, kurioje būtų kaupiami duomenys, gauti atliekant reaktyvumo patikrinimus (žr. 15 punktą) ir naudojant teigiamus bei tirpiklio ar nešiklio kontrolinius bandinius (žr. 21–24 punktus), ir šiais duomenimis reikėtų naudotis patvirtinant tolesnį šio bandymo atkuriamumą savo laboratorijoje laikui bėgant.

PROCEDŪRA

13. Yra paskelbta IL-8 Luc tyrimo standartinė veiklos procedūra (SVP), kurios reikėtų laikytis atliekant šį bandymą (18). Laboratorijos, norinčios atlikti šį bandymą, gali gauti rekombinantinių THP-G8 ląstelių liniją iš Totoryje (Japonija) esančios laboratorijos „GPC Lab. Co. Ltd.“, jei pasirašo medžiagų perdavimo susitarimą (angl. *Material Transfer Agreement*, MTA) pagal EBPO šablone nustatytas sąlygas. Tolesniuose punktuose aprašyti pagrindiniai šio tyrimo komponentai ir procedūros.

Ląstelių paruošimas

14. Atliekant IL-8 Luc tyrimą turėtų būti naudojama iš Totoryje (Japonija) esančios laboratorijos „GPC Lab. Co. Ltd.“ gauta THP-G8 ląstelių linija (žr. 8 ir 13 punktus). Gautos ląstelės padauginamos (2–4 sėjimai) ir laikomos užšaldytos kaip vienalytė pradinė kultūra. Šios pradinės kultūros ląsteles galima dauginti iki ne daugiau kaip 12 sėjimų ar ne ilgiau kaip 6 savaites. Dauginimui naudojama terpė yra auginimo terpė RPMI-1640, kurioje yra 10 % galvijų vaisiaus serumo (FBS), antibiotiko / priešgrybelinio tirpalo (100 U/ml penicilino G, 100 µg/ml streptomicino ir 0,25 µg/ml amfotericino B 0,85 % fiziologiniame tirpale) (pvz., GIBCO Cat#15240-062), 0,15 µg/ml puomicino (pvz., CAS:58-58-2) ir 300 µg/ml G418 (pvz., CAS:108321-42-2).
15. Prieš naudojant ląsteles bandymui, reikėtų patikrinti jų tinkamumą, atliekant reaktyvumo patikrinimą. Šį patikrinimą reikėtų atlikti po 1–2 savaičių ar 2–4 sėjimų nuo atitirpinimo, naudojant teigiamą kontrolinį bandinį su 4-nitrobenzilbromidu (4-NBB) (CAS:100-11-8, ≥99 % grynumo) ir neigiamą kontrolinį bandinį su pieno rūgštimi (CAS:50-21-5, ≥85 %

grynumo). Naudojant 4-NBB turėtų būti gautas teigiamas atsakas į Ind-IL8LA ($\geq 1,4$), o naudojant pieno rūgštį turėtų būti gautas neigiamas atsakas į Ind-IL8LA ($< 1,4$). Tyrimui naudojamos tik tokios ląstelės, kurių reaktyvumo patikrinimas atliktas. Šis patikrinimas turėtų būti atliekamas pagal 22–24 punktuose aprašytas procedūras.

16. Bandymui THP-G8 ląstelės sėjamos nuo 2 iki 5×10^5 ląstelių/ml tankiu ir jų kultūra iš anksto ruošiama auginimo kolbose 48–96 valandas. Bandymo dieną iš auginimo kolbos surinktos ląstelės perplaunamos terpe RPMI-1640 su 10 % FBS be antibiotikų, o tada resuspenduojamos RPMI-1640 su 10 % FBS be antibiotikų, 1×10^6 ląstelių/ml tankiu. Tada ląstelės paskirstomos 96 duobučių juodoje plokščiadugnėje mikrotitravimo plokštelėje (pvz., Costar Cat#3603) su 50 μ l tūrio duobutėmis (5×10^4 ląstelių į kiekvieną duobutę).

Bandomosios cheminės medžiagos ir kontrolinių medžiagų paruošimas

17. Bandomoji cheminė medžiaga ir kontrolinės medžiagos ruošiamos bandymo dieną. Atliekant IL-8 Luc tyrimą, bandomosios cheminės medžiagos ištirpinamos beserumėje terpėje X-VIVO™ 15 (jos galima įsigyti iš komercinių tiekėjų: gamintojas „Lonza“, 04-418Q) iki galutinės 20 mg/ml koncentracijos. X-VIVO™ 15 įpilama į mikrocentrifugos mėgintuvėlį, į kurį dėta 20 mg bandomosios cheminės medžiagos (nepriklausomai nuo tos cheminės medžiagos tirpumo), kad susidarytų 1 ml tūris, o tada 30 minučių intensyviai plakama ir purtoma rotoriumi ne didesniu kaip 8 sūkių/min. greičiu, maždaug 20 °C aplinkos temperatūroje. Be to, jei kietosios cheminės medžiagos tebėra neištirpusios, mėgintuvėlis veikiamas ultragarsu, iki cheminė medžiaga visiškai ištirpsta arba stabiliai disperguojama. Bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios yra tirpios X-VIVO™ 15, skirtas tirpalas 5 kartus praskiedžiamas X-VIVO™ 15 ir naudojamas kaip X-VIVO™ 15 pradinis tos bandomosios cheminės medžiagos tirpalas (4 mg/ml). Kai bandomosios cheminės medžiagos nėra tirpios X-VIVO™ 15, mišinys vėl plakamas sukant bent 30 min., tada centrifuguojamas 15 000 sūkių/min. ($\approx 20\,000$ g) 5 min.; gautas supernatantas naudojamas kaip tos bandomosios cheminės medžiagos X-VIVO™ 15 pradinis tirpalas. Kitų tirpiklių, tokių kaip DMSO, vandens ar auginimo terpės, naudojimas turėtų būti moksliškai pagrįstas. Cheminių medžiagų tirpinimo procedūra išsamiai parodyta 3.5 priedėlyje. X-VIVO™ 15 tirpalai, aprašyti 18–23 punktuose, sumaišomi santykiu 1:1 (tūrio) su ląstelių suspensijomis, paruoštomis 96 duobučių juodoje plokščiadugnėje mikrotitravimo plokštelėje (žr. 16 punktą).
18. Pirmuoju bandymo ciklu siekiama nustatyti citotoksišką cheminių medžiagų koncentraciją ir ištirti jų odos jautrinimo gebą. Naudojant terpę X-VIVO™ 15, bandomųjų cheminių medžiagų X-VIVO™ 15 pradiniai tirpalai paruošiami skiedžiant serijiniu būdu po 2 kartus

(žr. 3.5 priedėlį), naudojant 96 duobučių mikrotitravimo plokštelę (pvz., Costar Cat#EW-01729-03). Tada 96 duobučių plokščiadugnėje juodoje plokštelėje įpilama po 50 µl praskiesto tirpalo į kiekvieną duobutę, į kurią dėta 50 µl ląstelių suspensijos. Taigi bandomųjų cheminių medžiagų, kurios yra tirpios X-VIVO™ 15, galutinės koncentracijos yra nuo 0,002 iki 2 mg/ml (3.5 priedėlis). Kai bandomosios cheminės medžiagos nėra tirpios X-VIVO™ 15 esant 20 mg/ml koncentracijai, nustatomi skiedimo koeficientai tik intervale nuo 2 iki 2^{10} , nors faktinės galutinės tų bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijos tebėra nežinomos ir priklauso nuo tų bandomųjų cheminių medžiagų soties koncentracijos X-VIVO™ 15 pradiniam tirpale.

19. Per paskesnius bandymo ciklus (t. y. antrame, trečiame ir ketvirtame kartotiniuose bandiniuose) X-VIVO™ 15 pradinis tirpalas paruošiamas 4 kartus didesnės koncentracijos nei ta, kuriai esant ląstelių gyvybingumo lygis yra 05 (CV05; mažiausia koncentracija, kuriai esant Inh-GAPLA tampa $<0,05$), per pirmąjį bandymą. Jei Inh-GAPLA nesumažėja iki mažesnės nei 0,05 vertės esant didžiausiai koncentracijai per pirmąjį ciklą, X-VIVO™ 15 pradinis tirpalas ruošiamas didžiausios koncentracijos, kuri naudota per pirmąjį ciklą. CV05 koncentracijos vertė apskaičiuojama dalijant per pirmąjį ciklą naudoto pradinio tirpalo koncentracijos vertę iš skiedimo koeficiento, skirtą CV05 (X) (skiedimo koeficientas CV05 (X); tai toks skiedimo koeficientas, kuris reikalingas pradiniam tirpalui praskiesti iki CV05 lygio) (žr. 3.5 priedėlį). Bandomųjų cheminių medžiagų, netirpių X-VIVO esant 20 mg/ml koncentracijai, CV05 koncentracijos vertė nustatoma kaip pradinio tirpalo koncentracija $\times 1/X$. Bandymo 2–4 ciklams antras pradinis tirpalas ruošiamas kaip $4 \times CV50$ (3.5 priedėlis).
20. X-VIVO™ 15 antrųjų pradinių tirpalų serijinis skiedimas atliekamas taikant skiedimo koeficientą 1,5, naudojant 96 duobučių mikrotitravimo plokštelę. Tada į 96 duobučių plokščiadugnės juodos plokštelės duobutes, kuriose yra po 50 µl ląstelių suspensijos, įpilama praskiesto tirpalo 50 µl į kiekvieną duobutę. Kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos bandymui turėtų būti skirtos 4 duobutės. Tada tie bandiniai sumaišomi ant plokštelių purtyklės ir 16 valandų inkubuojami 37 °C temperatūroje, esant 5 % CO₂, po to matuojamas liuciferazės aktyvumas, kaip aprašyta toliau.
21. Tirpiklio kontrolinis bandinys – tai mišinys, ruošiamas į kiekvieną plokštelės duobutę dedant po 50 µl X-VIVO™ 15 ir 50 µl ląstelių suspensijos RPMI-1640 terpėje su 10 % FBS.
22. Teigiamam kontroliniam bandiniui rekomenduojama naudoti 4-NBB. 20 mg 4-NBB paruošiama 1,5 ml tūrio mikrocentrifugos mėgintuvėlyje, į kurį įpilama X-VIVO™ 15, kad susidarytų 1 ml tūris, tada tas mėgintuvėlis intensyviai sukamas ir purtomas rotoriumi

maksimaliu 8 sūkių/min. greičiu bent 30 min. Po centrifugavimo 20 000 g 5 minutes supernatantas 4 kartus praskiedžiamas X-VIVO™ 15, ir 500 µl praskiesto supernatanto perkeliama į duobutę 96 duobučių mikrotitravimo plokštelėje. Praskiestas supernatantas papildomai praskiedžiamas X-VIVO™ 15 2 ir 4 kartus, ir 50 µl šio tirpalo įpilama kartu su 50 µl THP-G8 ląstelių suspensijos į duobutes 96 duobučių plokščiadugnėje juodoje plokštelėje (3.6 priedėlis). Kiekvienos koncentracijos teigiamam kontroliniam bandiniui turėtų būti skirtos 4 duobutės. Plokštelė supurtoma ant plokštelių purtyklės, tada inkubuojama CO₂ inkubatoriuje 16 valandų (37 °C, 5 % CO₂) ir po to matuojamas liuciferazės aktyvumas, kaip aprašyta 29 punkte.

23. Neigiamam kontroliniam bandiniui rekomenduojama naudoti pieno rūgštį. 20 mg pieno rūgšties paruošiama 1,5 ml tūrio mikrocentrifugos mėgintuvėlyje, į kurią įpilama X-VIVO™ 15, kad susidarytų 1 ml tūris (20 mg/ml). 20 mg/ml pieno rūgšties tirpalas 5 kartus praskiedžiamas X-VIVO™ 15 (iki 4 mg/ml); 500 µl šio 4 mg/ml pieno rūgšties tirpalo perkeliama į duobutę 96 duobučių mikrotitravimo plokštelėje. Šis tirpalas 2 kartus praskiedžiamas X-VIVO™ 15, tada vėl 2 kartus praskiedžiamas, gaunant 2 mg/ml ir 1 mg/ml tirpalus. 50 µl šių 3 tirpalų ir nešiklio kontrolinio bandinio (X-VIVO™ 15) dedama kartu su 50 µl THP-G8 ląstelių suspensijos į duobutes 96 duobučių plokščiadugnėje juodoje plokštelėje. Kiekvienos koncentracijos neigiamam kontroliniam bandiniui skiriamos 4 duobutės. Plokštelė supurtoma ant plokštelių purtyklės, tada inkubuojama CO₂ inkubatoriuje 16 valandų (37 °C, 5 % CO₂) ir po to matuojamas liuciferazės aktyvumas, kaip aprašyta 29 punkte.
24. Galima naudoti ir kitokius tinkamus teigiamus arba neigiamus kontrolinius bandinius, jei yra ankstesnių duomenų, iš kurių būtų galima nustatyti panašius bandymo eigos priimtumo kriterijus.
25. Reikėtų imtis atsargumo priemonių, kad būtų išvengta lakiųjų bandomųjų cheminių medžiagų garavimo ir kryžminio užteršimo bandomosiomis cheminėmis medžiagomis tarp duobučių, pvz., sandariai uždengiant plokštelę, prieš ją inkubuojant su bandomosiomis cheminėmis medžiagomis.
26. Siekiant gauti teigiamą arba neigiamą prognozę reikia atlikti 2–4 bandymo ciklus naudojant bandomąsias chemines medžiagas ir tirpiklio kontrolinį bandinį (žr. 2 lentelę). Kiekvienas ciklas atliekamas vis kitą dieną, naudojant naują bandomųjų cheminių medžiagų pradinį tirpalą X-VIVO™ 15 terpėje ir atskirai surinktas ląsteles. Ląstelės gali būti to paties sėjimo.

Liuciferazės aktyvumo matavimai

27. Liuminescencija matuojama naudojant 96 duobučių mikrotitravimo plokštelės liuminometrą su optiniais filtrais, pvz., „Phelios“ (gamintojas ATTO, Tokijas, Japonija), „Tristan 941“ („Berthold“, Bad Vildbadas, Vokietija) ir ARVO serijos instrumentus („PerkinElmer“, Voltamas, Masačusetsas, JAV). Liuminometras turi būti kalibruojamas kiekvienam bandymui, kad būtų užtikrintas atkuriamumas (19). Šiam kalibravimui galima gauti rekombinantinių oranžinės ir raudonos spalvos šviesą skleidžiančių liuciferazių.
28. 100 µl pašildyto *Tripluc*® liuciferazės tyrimo reagento („Tripluc“) dedama į kiekvieną plokštelės duobutę, kurioje yra ląstelių suspensijos, apdorotos arba neapdorotos bandomąja chemine medžiaga. Plokštelė 10 min. purtoma aplinkos temperatūroje (apie 20 °C). Plokštelė dedama į liuminometrą ir matuojamas liuciferazės aktyvumas. Bioluminescencija matuojama po 3 sekundes be optinio filtro (F0) ir su optiniu filtru (F1). Jei pasirenkami kitokie nuostačiai (pvz., priklausomai nuo naudojamo liuminometro modelio), reikėtų pateikti to pagrindimą.
29. Pagal išmatuotas vertes apskaičiuojami kiekvienos koncentracijos parametrai, pvz., IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, IL8LA vidutinis $\pm$ SN (standartinis nuokrypis), GAPLA vidutinis $\pm$ SN, nIL8LA vidutinis $\pm$ SN, Ind-IL8LA vidutinis $\pm$ SN, Inh-GAPLA vidutinis $\pm$ SN ir Ind-IL8LA 95 % pasikliautinis intervalas. Šiame punkte nurodytų parametrų apibrėžtys atitinkamai pateiktos I ir IV priedėliuose.
30. Daugiaspalvių reporterinių genų tyrimų metu spalvų skyrimas prieš matavimą paprastai pasiekiamas naudojant detektorius (liuminometrą ir plokštelių skaitytuvą) su optiniais filtrais, tokiais kaip riboto pralaidumo filurai, t. y. praleidžiantys tik ilgąsias bangas (LP filurai) arba tik trumpąsias bangas (SP filurai), arba juostiniai filurai. Kiekvienos bioluminescencijos signalinės spalvos šviesos pralaidumo per filurus koeficientai turėtų būti prieš bandymą kalibruojami pagal 3.2 priedėlį.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Duomenų vertinimas

31. Pagal teigiamo arba neigiamo sprendimo priėmimo kriterijus privaloma, kad per kiekvieną bandymo ciklą:
- IL-8 Luc tyrimo prognozė būtų laikoma teigiama, jei bandomosios cheminės medžiagos Ind-IL8LA yra $\geq 1,4$, o Ind-IL8LA 95 % pasikliautinojo intervalo žemesnioji riba $\geq 1,0$;
 - IL-8 Luc tyrimo prognozė būtų laikoma neigiama, jei bandomosios cheminės medžiagos Ind-IL8LA yra $< 1,4$, o Ind-IL8LA 95 % pasikliautinojo intervalo žemesnioji riba $< 1,0$.

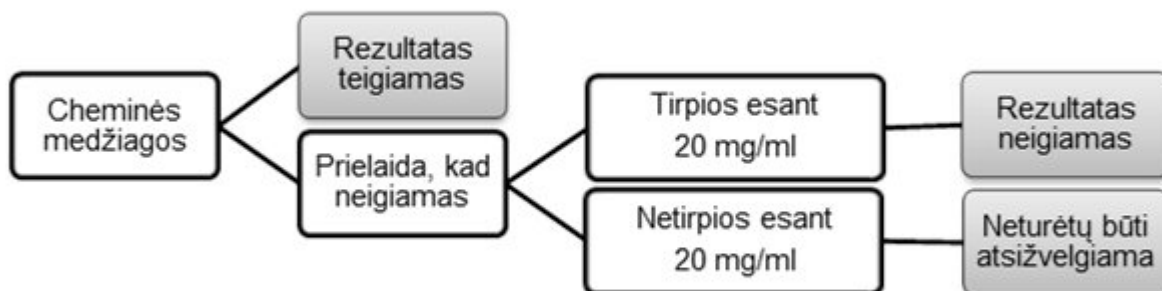
Prognozavimo modelis

32. Kai per bandomųjų cheminių medžiagų 1, 2, 3 ir 4 bandymo ciklus gaunami du teigiami rezultatai, tokios medžiagos rezultatas pripažįstamas teigiamu, o kai per 1, 2, 3 ar 4 bandymo ciklą gaunami trys neigiami rezultatai, daroma prielaida, kad rezultatas yra neigiamas (2 lentelė). Iš tų cheminių medžiagų, dėl kurių daroma prielaida, kad rezultatas yra neigiamas, tų cheminių medžiagų, kurios ištirpsta 20 mg/ml X-VOVO™ 15, rezultatai laikomi neigiamais, o į tas medžiagas, kurios neištirpsta 20 mg/ml X-VOVO™ 15, neturėtų būti atsižvelgiama (1 diagrama).

2 lentelė. Kriterijai, pagal kuriuos nustatomi teigiami rezultatai ir daroma prielaida dėl neigiamų rezultatų

1 ciklas	2 ciklas	3 ciklas	4 ciklas	Galutinė prognozė
Teigiamas	Teigiamas	-	-	Teigiamas
	Neigiamas	Teigiamas	-	Teigiamas
		Neigiamas	Teigiamas	Teigiamas
			Neigiamas	Prielaida, kad neigiamas
Neigiamas	Teigiamas	Teigiamas	-	Teigiamas
		Neigiamas	Teigiamas	Teigiamas
			Neigiamas	Prielaida, kad neigiamas
	Neigiamas	Teigiamas	Teigiamas	Teigiamas
			Neigiamas	Prielaida, kad neigiamas
		Neigiamas	-	Prielaida, kad neigiamas

1 diagrama. Prognozavimo modelis priimant galutinį sprendimą



Priimtino kriterijai

33. Atliekant IL-8 Luc tyrimą turėtų būti tenkinami šie priimtino kriterijai:

- bent vienos koncentracijos teigiamo kontrolinio bandinio su 4-NBB per kiekvieną bandymo ciklą Ind-IL8LA turėtų būti daugiau kaip 5,0;
- bet kurios koncentracijos neigiamo kontrolinio bandinio su pieno rūgštimi Ind-IL8LA per kiekvieną bandymo ciklą turėtų nesiekti 1,4;
- duomenis, gautus iš plokštelių, kurių kontrolinių bandinių duobutėse su ląstelėmis ir „Tripluc“, bet be cheminių medžiagų, GAPLA mažiau nei 5 kartus viršija GAPLA toje duobutėje, kurioje yra tik bandymo terpė (į duobutę dėta po 50 µl RPMI-1640 su 10 % FBS ir 50 µl X-VIVO™ 15), reikėtų atmesti;
- duomenis, gautus iš plokštelių, kuriose visų bandomųjų ar kontrolinių cheminių medžiagų koncentracijų Inh-GAPLA nesiekia 0,05, reikėtų atmesti. Šiuo atveju reikėtų kartoti pirmąjį bandymą, taigi per pakartotinį bandymą naudojama didžiausia galutinė koncentracija yra ta, kuri buvo mažiausia galutinė koncentracija per pirmesnį bandymą.

Bandymo ataskaita

34. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomosios cheminės medžiagos

Vienkomponentė medžiaga:

- cheminis identifikavimas, toks kaip IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS numeris (-iai), SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;
- fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje, molekulinė masė ir svarbios papildomos fizikinės ir cheminės savybės (tiek, kiek žinoma);
- grynumas, priemaišų cheminė tapatybė (kai tinka ir jei praktiškai įmanoma) ir kt.;
- apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);
- tirpumas X-VIVO™ 15. Kai cheminės medžiagos nėra tirpios X-VIVO™ 15 – ar po centrifugavimo pastebima nuosėdų arba plūduriuojančių dalelių;
- bandomoji (-osios) koncentracija (-os);
- laikymo sąlygos ir stabilumas (tiek, kiek žinoma);
- pagrindimas, kodėl pasirinktas tam tikras tirpiklis ar nešiklis kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai, jei nenaudota X-VIVO™ 15.

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

- kuo išsamesnis apibūdinimas, pvz., cheminė tapatybė (žr. pirmiau), grynumas, kiekybinė sudėtis ir svarbios fizikinės ir cheminės savybės (žr. pirmiau), būdingos sudedamosioms dalims (tiek, kiek žinoma);
- fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir svarbios papildomos fizikinės ir cheminės savybės (tiek, kiek žinoma);
- molekulinė masė arba vidutinė molekulinė masė, jei tai yra žinomos sudėties mišiniai ar polimerai, arba kita šiam tyrimui svarbi informacija;
- apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);
- tirpumas X-VIVO™ 15. Kai cheminės medžiagos nėra tirpios X-VIVO™ 15 – ar po centrifugavimo pastebima nuosėdų arba plūduriuojančių dalelių;
- bandomoji (-osios) koncentracija (-os);
- laikymo sąlygos ir stabilumas (tiek, kiek žinoma);
- pagrindimas, kodėl pasirinktas tam tikras tirpiklis ar nešiklis kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai, jei nenaudota X-VIVO™ 15.

Kontroliniai bandiniai

Teigiamas kontrolinis bandinys:

- cheminis identifikavimas, toks kaip IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS numeris (-iai), SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;
- fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje, molekulinė masė ir papildomos svarbios fizikinės ir cheminės savybės (tiek, kiek žinoma, ir kai tinka);
- grynumas, priemaišų cheminė tapatybė (kai tinka ir jei praktiškai įmanoma) ir kt.;
- apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);
- bandomoji (-osios) koncentracija (-os);
- laikymo sąlygos ir stabilumas (tiek, kiek žinoma);
- nuoroda į ankstesnius teigiamus kontrolinių bandinių rezultatus, iš kurių nustatyti tinkami priimtino kriterijai (jei tinka).

Neigiamas kontrolinis bandinys:

- cheminis identifikavimas, toks kaip IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS numeris (-iai) ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;
- grynumas, priemaišų cheminė tapatybė (kai tinka ir jei praktiškai įmanoma) ir kt.;
- fizinė išvaizda, molekulinė masė ir papildomos svarbios fizikinės ir cheminės savybės (tiek, kiek žinoma) tuo atveju, jei naudojami ne tie, kurie nurodyti bandymo gairėse, o kiti neigiami kontroliniai bandiniai;
- laikymo sąlygos ir stabilumas (tiek, kiek žinoma);
- pagrindimas, kodėl pasirinktas tam tikras tirpiklis kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai.

Bandymo sąlygos

- Rėmėjo pavadinimas ir adresas, bandymų laboratorija ir tyrimo vadovas;
- naudoto bandymo aprašymas;
- naudojama ląstelių linija, jos laikymo sąlygos ir šaltinis (pvz., įstaiga, iš kurios ji gauta);
- FBC partijos numeris ir kilmė, tiekėjo pavadinimas, 96 duobučių plokščiadugnės juodos mikrotitravimo plokštelės partijos numeris ir „Tripluc“ reagento partijos numeris;
- sėjimų skaičius ir ląstelių tankis, naudotas per bandymą;
- ląstelių skaičiavimo metodas, naudotas sėjant ląsteles prieš bandymą, ir priemonės, kuriomis užtikrintas tolygus ląstelių skaičiaus paskirstymas;

- naudotas liuminometras (pvz., modelis), įskaitant instrumento nuostačius, naudotas liuciferazės substratas ir parodyti tinkami liuminescencijos matavimai remiantis 3.2 priedėlyje aprašytu kontroliniu bandymu;
- procedūra, pagal kurią įrodyta laboratorijos kvalifikacija atlikti šį bandymą (pvz., atliekant kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų bandymus) arba įrodytas šio bandymo atlikimo atkuriamumas laikui bėgant.

Bandymo procedūra

- Kartotinių bandinių ir atliktų bandymo ciklų skaičius;
- bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertės, įterpimo procedūra ir veikimo trukmė (jei skiriasi nuo rekomenduojamos);
- atliekant vertinimą ir priimant sprendimą taikytų kriterijų aprašymas;
- taikytų tyrimo priimtino kriterijų aprašymas;
- bet kokių bandymo procedūros keitimų aprašymas.

Rezultatai

- IL8LA ir GAPLA matavimai;
- nIL8LA, Ind-IL8LA ir Inh-GAPLA skaičiavimai;
- Ind-IL8LA 95 % pasikliautinis intervalas;
- diagrama, kurioje parodytos dozės ir atsako kreivės vertinant liuciferazės aktyvumo indukciją ir gyvybingumą;
- bet kokių kitų svarbių stebėjimų aprašymas (jei tinka).

Rezultatų aptarimas

- Atliekant IL-8 Luc tyrimą gautų rezultatų aptarimas;
- tyrimo rezultatų apsvarstymas atsižvelgiant į IATA sistemą, jei turima ir kitos svarbios informacijos.

Išvada

LITERATŪRA

- (1) Takahashi T., Kimura Y., Saito R., Nakajima Y., Ohmiya Y., Yamasaki K., and Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci* 124:359-69.
- (2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. *Series on Testing and Assessment* No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Paskelbta <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (3) OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. *Series on Testing and Assessment* No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Paskelbta <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (4) OECD (2016). Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, *Series on Testing & Assessment* No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Paskelbta <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (5) Van der Veen J. W., Rorije E., Emter R., Natsch A., van Loveren H., 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 P. S., Gerberick F., et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol* 71:337-51.

- (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 D. A., Asturiol D., Roberts D. W., 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 D. S. (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 V. R., Bechara E. J., 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). (dar nepaskelbta) Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. *OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment*. OECD, Paris, France
- (16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. *OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment* No 34. OECD, Paris, France.

- (17) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Paskelbta [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*. Paskelbta http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.
- (19) Niwa K., Ichino Y., Kumata S., Nakajima Y., Hiraishi Y., Kato D., Viviani V. R., and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. *Photochem Photobiol* 86:1046-9.
- (20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. *OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment* No 168. OECD, Paris, France.
- (21) United Nations (2015). *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*. Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Paskelbta http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

3.1. priedėlis

TERMINŲ APIBRĖŽTYS

Tikslumas – bandymo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tai yra bandymo atlikimo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Šis terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „atitiktis“ ir reiškia tinkamų bandymo rezultatų dalį (16).

Nepalankios baigties kelias (angl. *Adverse Outcome Pathway*, AOP) – įvykių seka nuo tikslinės cheminės medžiagos ar panašių cheminių medžiagų grupės cheminės struktūros per molekulinio inicijavimo įvykį iki *in vivo* tiriamo rezultato (20).

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

CV05 – ląstelių gyvybingumo lygis 05, t. y. mažiausia koncentracija, kuriai esant cheminių medžiagų Inh-GAPLA nesiekia 0,05.

FInSLO-LA – IL-8 Luc tyrimo tinkamumo patvirtinimo ataskaitoje ir ankstesniuose jam skirtuose leidiniuose vartota santrumpa, reiškianti Ind-IL8LA. Žr. Ind-IL8LA apibrėžtį.

GAPLA – stabiliosios raudonos liuciferazės (SLR) geno liuciferazės aktyvumas (λ_{max} = 630 nm), reguliuojamas GAPDH promotoriaus, parodo ląstelių gyvybingumą ir gyvybingų ląstelių skaičių.

Pavojus – būdingoji medžiagos savybė arba situacija, galinti sukelti neigiamų padarinių, kai organizmą, sistemą ar populiaciją (arba jos dalį) veikia ta medžiaga.

IATA (integruotasis bandymo ir vertinimo metodas, angl. *Integrated Approach to Testing and Assessment*) – struktūrinis metodas, taikomas cheminės medžiagos ar cheminių medžiagų grupės (galimam) pavojui nustatyti, pavojui (veikimo gebai) apibūdinti ir (arba) saugai vertinti (dėl galimo pavojaus ar veikimo gebos ir paveikimo ta medžiaga). Jį taikant strategiškai apibendrinami ir įvertinami visi susiję duomenys, kad būtų galima ta informacija pagrįsti reglamentavimo sprendimą dėl galimo pavojaus ir (arba) rizikos ir (arba) dėl būtinumo atlikti papildomus tikslinius, taigi minimalius bandymus.

II-SLR-LA – IL-8 Luc tyrimo tinkamumo patvirtinimo ataskaitoje ir ankstesniuose jam skirtuose leidiniuose vartota santrumpa, reiškianti Inh-GAPLA. Žr. Inh-GAPLA apibrėžtį.

IL-8 (interleukinas-8) – citokinas, gaunamas iš endotelio ląstelių, fibroblastų, keratinocitų, makrofagų ir monocitų, sukeliantis neutrofilų ir T ląstelių limfocitų chemotaksį.

IL8LA – stabiliosios oranžinės liuciferazės (SLO) geno liuciferazės aktyvumas (λ_{max} = 580 nm), reguliuojamas IL-8 promotoriaus.

Ind-IL8LA – IL8LA indukcijos padidėjimas (kiek kartų). Gaunamas dalijant cheminėmis medžiagomis paveiktų THP-G8 ląstelių nIL8LA iš nestimuliuotų THP-G8 ląstelių nIL8LA ir atitinka IL-8 promotoriaus aktyvumo indukciją cheminėmis medžiagomis.

Inh-GAPLA – GAPLA slopinimas. Gaunamas dalijant cheminėmis medžiagomis paveiktų THP-G8 ląstelių GAPLA iš nepaveiktų THP-G8 ląstelių GAPLA ir parodo cheminių medžiagų citotoksiškumą.

Minimali indukcijos riba (angl. *minimum induction threshold*, MIT) – mažiausia koncentracija, kuriai esant cheminė medžiaga atitinka teigiamo rezultato kriterijus.

Mišinys – iš dviejų ar daugiau medžiagų sudarytas mišinys ar tirpalas.

Vienkomponentė medžiaga: medžiaga, apibrėžiama pagal jos kiekybinę sudėtį, kurioje vienas pagrindinis komponentas sudaro ne mažiau kaip 80 % (masės).

Daugiakomponentė medžiaga – medžiaga, apibrėžiama pagal jos kiekybinę sudėtį, kurioje daugiau kaip vieno iš pagrindinių komponentų koncentracija yra ≥ 10 % (masės) ir < 80 % (masės). Daugiakomponentė medžiaga yra gamybos proceso rezultatas. Daugiakomponentė medžiaga nuo mišinio skiriasi tuo, kad mišinys gaunamas sumaišant dvi arba daugiau medžiagų, tarp kurių cheminė reakcija nevyksta. Daugiakomponentė medžiaga yra cheminės reakcijos rezultatas.

nIL8LA – SLO liuciferazės aktyvumas, atitinkantis IL-8 promotoriaus veikimą (IL8LA), normalizuotas pagal SLR liuciferazės aktyvumą, atitinkantį GAPDH promotoriaus veikimą (GAPLA). Jis parodo IL-8 promotoriaus veikimą, nustatytą atsižvelgus į ląstelių gyvybingumą arba ląstelių skaičių.

nSLO-LA – IL-8 Luc tyrimo tinkamumo patvirtinimo ataskaitoje ir ankstesniuose jam skirtuose leidiniuose vartota santrumpa, reiškianti nIL8LA. Žr. nIL8LA apibrėžtį.

Teigiamas kontrolinis bandinys – kartotinis bandinys, kuriame yra visi bandymo sistemos komponentai, apdorotas tam tikra medžiaga, kuri, kaip žinoma, sukelia teigiamą atsaką. Siekiant užtikrinti, kad būtų galima vertinti teigiamo kontrolinio bandinio atsako kintamumą laikui bėgant, teigiamas atsakas neturėtų būti per stiprus.

Prehaptentai – cheminės medžiagos, kurios tampa jautrinančios po abiotinio virsmo.

Prohaptentai – cheminės medžiagos, kurias būtina aktyvinti fermentais, kad pasireikštų jų odos jautrinimo geba.

Tinkamumas – ryšio tarp bandymo ir tiriamo poveikio, taip pat bandymo reikšmingumo ir naudingumo siekiant tam tikro tikslo apibūdinimas. Tai yra atliekant bandymą tiriamo biologinio poveikio matavimo ar prognozavimo tikslumo laipsnis. Tinkamumas apima bandymo tikslumo (atitikties) aspektą (16).

Patikimumas – pagal tą patį protokolą atliekamo bandymo atkuriamumo laboratorijose ir tarp laboratorijų, laikui bėgant, matas. Jis įvertinamas apskaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų ir pakartojamumą laboratorijoje (16).

Bandymo ciklas – vienos ar daugiau bandomųjų cheminių medžiagų bandymas kartu naudojant tirpiklio ar nešiklio kontrolinį bandinį ir teigiamą kontrolinį bandinį.

Jautris – visų teigiamų (veikliųjų) cheminių medžiagų, kurios teisingai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Tai yra bandymo, kuriuo gaunami kategorijos nustatymo rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo tinkamumą (16).

SLO-LA – IL-8 Luc tyrimo tinkamumo patvirtinimo ataskaitoje ir ankstesniuose jam skirtuose leidiniuose vartota santrumpa, reiškianti IL8LA. Žr. IL8LA apibrėžtį.

SLR-LA – IL-8 Luc tyrimo tinkamumo patvirtinimo ataskaitoje ir ankstesniuose jam skirtuose leidiniuose vartota santrumpa, reiškianti GAPLA. Žr. GAPLA apibrėžtį.

Tirpiklio ar nešiklio kontrolinis bandinys – neapdorotas bandinys, kuriame yra visi bandymo sistemos komponentai, išskyrus bandomąją cheminę medžiagą, tačiau įskaitant naudojamą tirpiklį ar nešiklį. Jis naudojamas nustatant bazinį atsaką bandiniuose, apdorotuose bandomąją chemine medžiaga, ištirpinta ar stabiliai disperguota tame pačiame tirpiklyje ar nešiklyje. Kai šis bandinys naudojamas bandymui kartu su terpės kontroliniu bandiniu, jis taip pat parodo, ar tirpiklis arba nešiklis veikia bandymo sistemą.

Specifiškumas – visų neigiamų (neveikliųjų) cheminių medžiagų, kurios teisingai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Tai yra bandymo, kuriuo gaunami kategorijos nustatymo rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymo tinkamumą (16).

Medžiaga – gamtoje randami ar bet kokio gamybos proceso metu gaunami cheminiai elementai ir jų junginiai, įskaitant visus priedus, reikalingus produkto stabilumui išlaikyti, ir priemaišas, atsirandančias dėl gamybos proceso, tačiau išskyrus tirpiklius, kuriuos galima atskirti nedarant poveikio medžiagos stabilumui ar nekeičiant jos sudėties.

Paviršinio aktyvumo medžiaga (taip pat vadinama aktyviąja paviršiaus medžiaga) – medžiaga, pvz., ploviklis, gebanti sumažinti skysčio paviršiaus įtempį, kad jis galėtų putoti ar prasiskverbti į kietąsias medžiagas; be to, ji žinoma kaip drėkiklis. (TG437)

Bandomoji cheminė medžiaga – taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

THP-G8 – IL-8 reporterinių ląstelių linija, naudojama atliekant IL-8 Luc tyrimą. Žmogaus makrofagų tipo ląstelių linija THP-1 buvo transfekuota SLO ir SLR liuciferazės genais, atitinkamai kontroliuojamais IL-8 ir GAPDH promotorių.

Jungtinių Tautų visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo

sistema (JT GHS) – sistema, kurioje pateikiamas cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikavimas pagal standartizuotus fizinių pavojų, pavojų sveikatai bei aplinkai tipus ir lygius, ir naudojami atitinkami informaciniai elementai, tokie kaip piktogramos, signaliniai žodžiai, pavojingumo frazės, atsargumo frazės ir saugos duomenų lapai, kad būtų perduota informacija apie jų neigiamą poveikį, siekiant apsaugoti žmones (įskaitant darbdavius, darbuotojus, vežėjus, vartotojus ir avarijų likviduotojus) ir aplinką (21).

UVCB – nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudedamieji reakcijų produktai ar biologinės medžiagos.

Patvirtinto tinkamumo bandymų metodas – bandymas, laikomas pakankamai tinkamu ir patikimu konkrečiam tikslui pasiekti ir pagrįstas moksliai patikimais principais. Bandymas niekada nėra absoliučiai tinkamas – jis yra tinkamas tik tam tikram tikslui pasiekti.

3.2. priedėlis

LIUCIFERAZĖS AKTYVUMO MATAVIMO PRINCIPAS IR OPTINIO FILTRO PRALAUDUMO SLO IR SLR KOEFICIENTŲ NUSTATYMAS

„Daugiareporterinių“ tyrimų sistema „Tripluc“ (angl. *MultiReporter Assay System - Tripluc*–) gali būti naudojama su mikroplokštelių tipo liuminometru su daugiaspalvio aptikimo sistema, kurioje galima naudoti optinį filtrą (pvz., *Phelios* AB-2350 (gamintojas ATTO), ARVO („PerkinElmer“), *Tristar* LB941 („Berthold“)). Matavimui naudojamas optinis filtras yra 600–620 nm tik ilgąsias bangas praleidžiantis (LP) ar tik trumpąsias bangas praleidžiantis (SP) filtras arba 600–700 nm juostinis filtras.

Dvispalvių liuciferazių matavimas optiniu filtru

Tai pavyzdys, kaip gali būti naudojamas *Phelios* AB-2350 (ATTO). Šis liuminometras yra su 600 nm tik ilgąsias bangas praleidžiančiu (LP) filtru (R60 HOYA Co., 600 nm LP, 1 filtras), kuriuo išskaidoma SLO ($\lambda_{max} = 580$ nm) ir SLR ($\lambda_{max} = 630$ nm) liuminescencija.

Siekiant nustatyti 600 nm LP filtro pralaidumo koeficientus, visų pirma, naudojant išgrynintus SLO ir SLR liuciferazės fermentus, matuojamas i) SLO ir SLR bioluminescencijos intensyvumas be filtro (F0), ii) SLO ir SLR bioluminescencijos, praleistos per 600 nm LP filtrą (1 filtrą), intensyvumas ir iii) apskaičiuojami 600 nm LP filtro pralaidumo SLO ir SLR koeficientai, išvardyti toliau.

Pralaidumo koeficientai		Santrumpa	Apibrėžtis
SLO	1 filtro pralaidumo koeficientai	κ_{OR60}	Filtro SLO pralaidumo koeficientas
SLR	1 filtro pralaidumo koeficientai	κ_{R60}	Filtro SLR pralaidumo koeficientas

SLO ir SLR intensyvumą bandinyje atitinkamai žymint O ir R, i) skleidžiamos šviesos intensyvumas be filtro (vien optiškai) F0 ir ii) šviesos intensyvumas ją praleidus per 600 nm LP filtrą (1 filtras) F1 apskaičiuojami taip, kaip parodyta toliau.

$$F0 = O + R$$

$$F1 = \kappa_{OR60} \times O + \kappa_{R60} \times R$$

Šias formules galima išreikšti taip:

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

Tada, naudodami apskaičiuotus pralaidumo koeficientus (κO_{R60} ir κR_{R60}) ir išmatuotus F0 ir F1, galite O ir R vertes apskaičiuoti taip:

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

Nustatant pralaidumo koeficientą naudojamos medžiagos ir metodai

1) Reagentai

Atskiri išgryninti liuciferazės fermentai:

lioofilizuotas išgrynintas SLO fermentas,

lioofilizuotas išgrynintas SLR fermentas

(kurie, atliekant šio bandymo tinkamumo patvirtinimo darbą, buvo gauti iš Totoryje (Japonija) esančios laboratorijos „GPC Lab. Co. Ltd.“ kartu su THP-G8 ląstelių linija)

Tyrimo reagentas:

Tripluc® liuciferazės tyrimo reagentas (pvz., iš gamintojo TOYOBO, Cat#MRA-301)

Terpė: skirta liuciferazės tyrimui atlikti (30 ml, laikoma 2–8 °C temperatūroje)

Reagentas	Konc.	Galutinė konc. terpėje	Reikiamas kiekis
RPMI-1640	-	-	27 ml
FBS	-	10 %	3 ml

2) Fermento tirpalo ruošimas

Liofilizuotas išgrynintas liuciferazės fermentas ištirpinamas mėgintuvėlyje, įpilant 200 µl 10–100 mM Tris/HCl ar Hepes/HCl buferio (pH 7,5–8,0), į kurį papildomai dėta 10 % (m/V) glicerolio, tada fermento tirpalas padalijamas į 10 µl alikvotines dalis 1,5 ml vienkartinuose mėgintuvėliuose, kurie laikomi šaldiklyje –80 °C temperatūroje. Užšaldytą fermento tirpalą galima naudoti iki 6 mėnesių. Jį naudojant įpilama 1 ml liuciferazės tyrimui skirtos terpės (RPMI-1640 su 10 % FBS) į kiekvieną iš mėgintuvėlių, kuriuose yra fermento tirpalai (gaunamas praskiestas fermento tirpalas),

ir jie laikomi ant ledo, kad neprarastų aktyvumo.

3) Bioluminescencijos matavimas

Tripluc[®] liuciferazės tyrimo reagentas („Tripluc“) atitirpinamas ir laikomas kambario temperatūroje – vandens vonelėje arba aplinkos oro temperatūroje. Liuminometras įjungiamas 30 min. prieš pradedant matavimą, kad fotodaugintuvas stabilizuotųsi. 100 µl praskiesto fermento tirpalo perkeliama į juodos spalvos 96 duobučių (plokščiadugnė) mikrotitravimo plokštelę (SLO etaloninis bandinys į #B1, #B2, #B3 duobutes, SLR etaloninis bandinys į #D1, #D2, #D3 duobutes). Tada, naudojant automatinį dozatorių („pipetmaną“), po 100 µl pašildyto „Tripluc“ įpilama į kiekvieną plokštelės duobutę, kurioje yra praskiesto fermento tirpalo. Plokštelė 10 min. purtoma kambario temperatūroje (apie 25 °C) naudojant plokštelių purtyklę. Jei duobutėse susidaro tirpalo burbulų, juos reikia pašalinti. Plokštelė dedama į liuminometrą ir matuojamas liuciferazės aktyvumas. Bioluminescencija matuojama po 3 sekundes be optinio filtro (F0) ir su optiniu filtru (F1).

Optinio filtro pralaidumo koeficientas apskaičiuotas taip:

Pralaidumo koeficientas (SLO (κ_{OR60})) = $(F1 \#B1 + F1 \#B2 + F1 \#B3) / (F0 \#B1 + F0 \#B2 + F0 \#B3)$

Pralaidumo koeficientas (SLR (κ_{R60})) = $(F1 \#D1 + F1 \#D2 + F1 \#D3) / (F0 \#D1 + F0 \#D2 + F0 \#D3)$

Apskaičiuoti pralaidumo koeficientai naudojami per visus matavimus, atliekamus naudojant tą patį liuminometrą.

Įrangos kokybės kontrolė

Turėtų būti atliekamos IL-8 Luc bandymo protokole aprašytos procedūros (18).

3.3. priedėlis

KVALIFIKACIJAI TIKRINTI SKIRTOS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

Prieš pradėdamos įprastu būdu atlikti bandymą, aprašytą šiame priedėlyje, pagal bandymo metodą B.71, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją, gaudamos numatoma IL-8 Luc tyrimo prognozę dėl 10 medžiagų, rekomenduojamų 1 lentelėje, ir gaudamos vertes, patenkančias į atitinkamą etaloninį intervalą, dėl bent 8 iš 10 kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų (kurios pasirinktos siekiant aprėpti odos jautrinimo pavojams būdingų atsakų spektrą). Kiti jų atrankos kriterijai buvo tokie, kad tų medžiagų būtų galima įsigyti iš komercinių tiekėjų ir kad būtų galima gauti aukštos kokybės *in vivo* etaloninių duomenų bei aukštos kokybės *in vitro* duomenų, nustatytų atliekant IL-8 Luc tyrimą. Taip pat yra paskelbti IL-8 Luc tyrimo atlikimo etaloniniai duomenys (6) (1).

1 lentelė. Cheminės medžiagos, rekomenduojamos techninei kvalifikacijai tikrinti dėl IL-8 Luc tyrimo

Kvalifikacijai skirtos medžiagos	tikrinti cheminės	CAS Nr.	Būsena	Tirpumas 20 mg/ml X- VIVO15	Prognozė <i>in vivo</i> ¹	IL-8 Luc prognozė ²	Etaloninis intervalas (µg/ml) ³	
							CV05 ⁴	IL-8 Luc MIT ⁵
2,4-dinitrochlorbenzenas		97-00-7	Kietoji medžiaga	Netirpus	Jautrinanti medžiaga (ypač stipriai)	Teigiama	2,3–3,9	0,5–2,3
Formaldehidas		50-00-0	Skystis	Tirpus	Jautrinanti medžiaga (stipriai)	Teigiama	9–30	4–9
2-merkaptobenzotiazolas		149-30-4	Kietoji medžiaga	Netirpus	Jautrinanti medžiaga (vidutinio stiprumo)	Teigiama	250–290	60–250
Etilendiaminas		107-15-3	Skystis	Tirpus	Jautrinanti medžiaga (vidutinio stiprumo)	Teigiama	500–700	0,1–0,4
Etilenglikolio dimetakrilatas		97-90-5	Skystis	Netirpus	Jautrinanti medžiaga (silpnai)	Teigiama	>2 000	0,04–0,1
4-alilanzolas (estragolas)		140-67-0	Skystis	Netirpus	Jautrinanti medžiaga (silpnai)	Teigiama	>2 000	0,01– 0,07
Streptomicino sulfatas		3810-74- 0	Kietoji medžiaga	Tirpus	Nejautrinanti medžiaga	Neigiama	>2 000	>2 000
Glicerolis		56-81-5	Skystis	Tirpus	Nejautrinanti medžiaga	Neigiama	>2 000	>2 000
Izopropilo alkoholis		67-63-0	Skystis	Tirpus	Nejautrinanti medžiaga	Neigiama	>2 000	>2 000

Santrumpos: CAS Nr. – Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos registro numeris.

¹ Veikimo *in vivo* geba gauta taikant ECETOC pasiūlytus kriterijus (19).

² Pagrįsta anksčiau nustatytomis vertėmis (1) (6).

³ CV05 ir IL-8 liuciferazės minimalios indukcijos ribos (MIT) apskaičiuotos naudojant vandens tirpumo vertę, pateiktą *EPI Suite*TM.

⁴ CV05 – mažiausia koncentracija, kuriai esant cheminių medžiagų Inh-GAPLA nesiekia 0,05.

⁵ MIT – mažiausios koncentracijos, kurioms esant cheminė medžiaga atitinka teigiamo rezultato kriterijus.

3.4. priedėlis

INDEKSAI IR SPRENDIMO PRIĖMIMO KRITERIJAI

nIL8LA (nSLO-LA)

Dėl IL8LA (SLO-LA) ir dėl GAPLA (SLR-LA) atitinkamai matuojamas i koncentracijos vertės ($i = 0-11$) pasikartojimas j kartų ($j = 1-4$). Normalizuotas IL8LA, žymimas kaip nIL8LA (nSLO-LA), apibrėžiamas taip:

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

Tai yra pagrindinis matavimo vienetas atliekant šį tyrimą.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Tai, kiek kartų padidėja vidutinis nIL8LA (nSLO-LA), kartojantis i koncentracijai, palyginti su jo verte esant 0 koncentracijai, yra pagrindinis šio tyrimo matas (Ind-IL8LA). Šis santykis apibūdinamas tokia formule:

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

Pagrindinė laboratorija pasiūlė, kad bandomosios cheminės medžiagos teigiamu rezultatu būtų laikoma vertė 1,4. Ši vertė pagrįsta tos pagrindinės laboratorijos ankstesnių duomenų tyrimu. Tada duomenų tvarkymo grupė naudojo šią vertę visuose tinkamumo patvirtinimo tyrimo etapuose. Pagrindinis rezultatas, Ind-IL8LA, yra 2 aritmetinių vidurkių santykis, kaip parodyta lygtyje.

95 % pasikliautinis intervalas (95 % PI)

Pagal šį santykį galima apskaičiuoti 95 % pasikliautinąjį intervalą (95 % PI) siekiant parodyti šio pagrindinio rezultato mato tikslumą. Apatinė 95 % PI riba ≥ 1 reiškia, kad nIL8LA, esant i koncentracijai, yra kur kas didesnis negu tirpiklio kontrolinio bandinio. 95 % PI galima nustatyti keliais būdais. Atlikdami šį tyrimą taikėme metodą, vadinamą Fieller'io teorema. Ši 95 % pasikliautinąjo intervalo teorema gauta pagal tokią formulę:

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

kurioje:

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

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

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

$t_{0.975(v)}$ yra centrinio t skirstinio 97,5 procentilis, esant laisvės laipsniui v , kai:

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

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Inh-GAPLA yra vidutinio GAPLA (SLR-LA), gauto kartojančios i koncentracijai, santykis, gautas palyginus su atitinkama tirpiklio kontrolinio bandinio verte, išreikštas formule

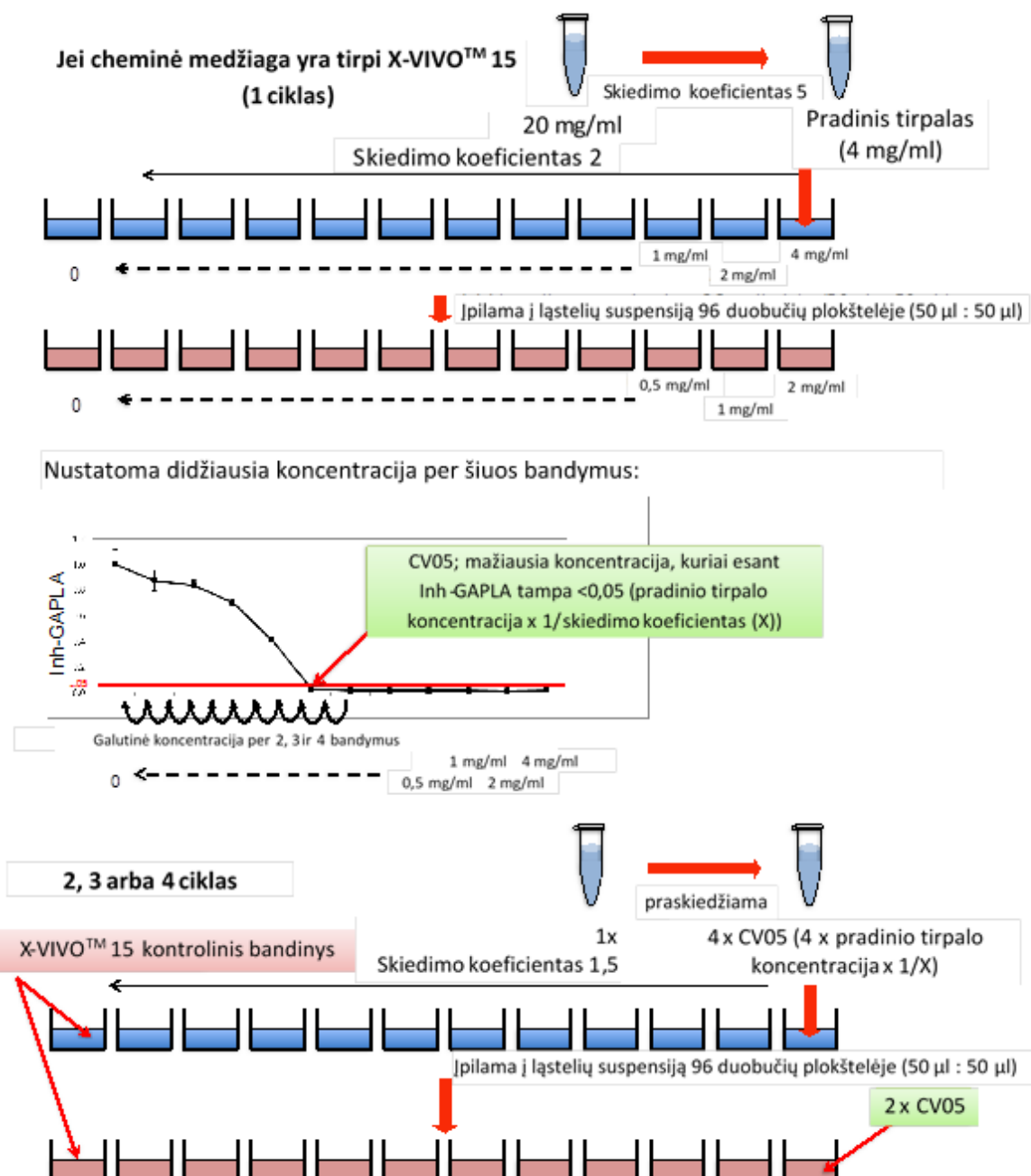
$$Inh - GAPLA_i = \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij}\} / \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j}\}.$$

Kadangi GAPLA yra nIL8LA vardiklis, labai maža jo vertė lemia didelį nIL8LA pokytį. Todėl, esant labai mažai (mažesnei nei 0,05) Inh-GAPLA vertei, Ind-IL8LA vertės gali būti laikomos nepakankamai tiksliomis.

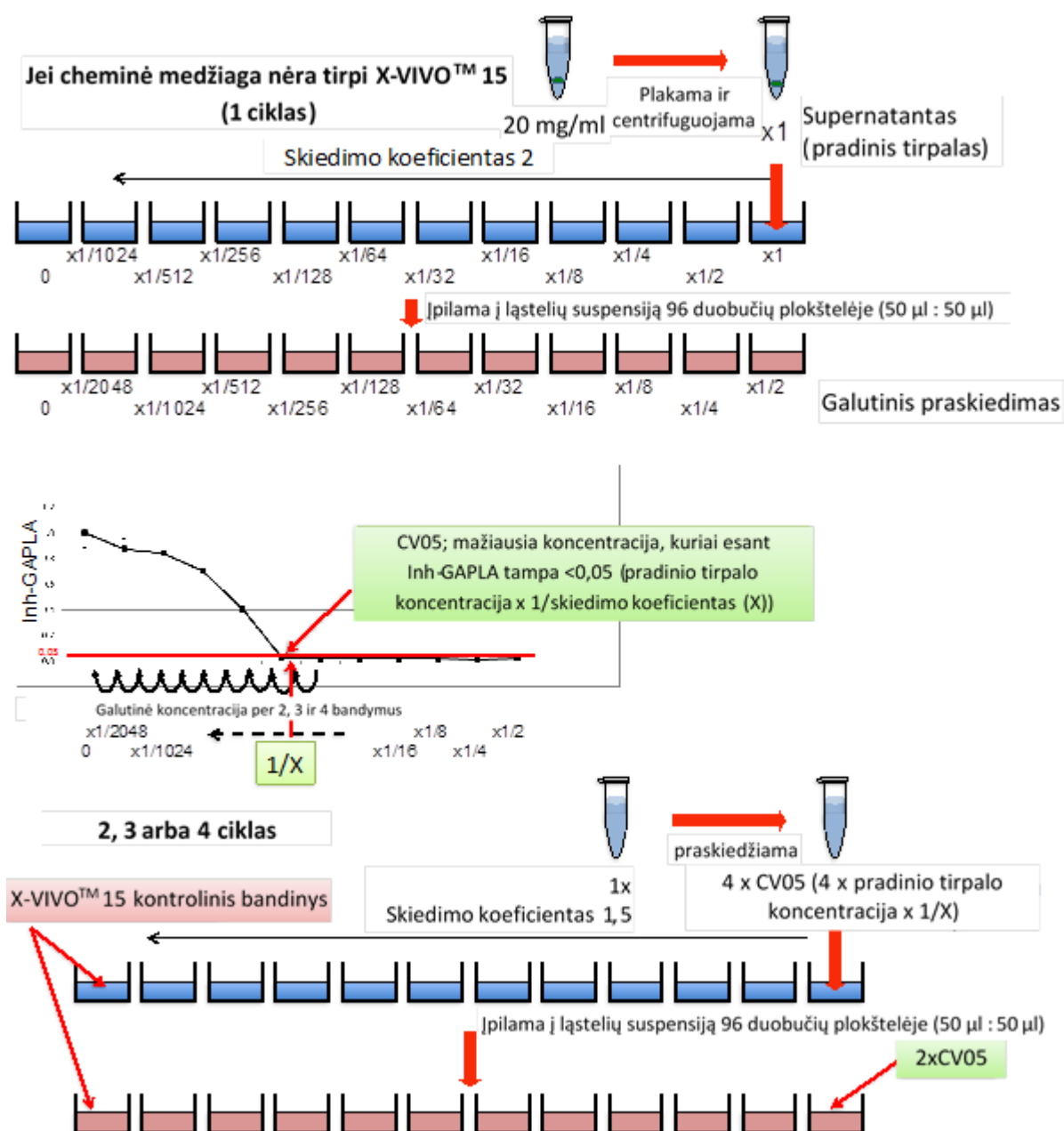
3.5. priedėlis

**METODŲ, PAGAL KURIUOS IŠTIRPINAMOS CHEMINĖS MEDŽIAGOS ATLIEKANT
IL-8 LUC TYRIMĄ, TAIKYMO SCHEMA**

- a) Kai cheminės medžiagos ištirpsta X-VIVO™ 15 esant 20 mg/ml koncentracijai

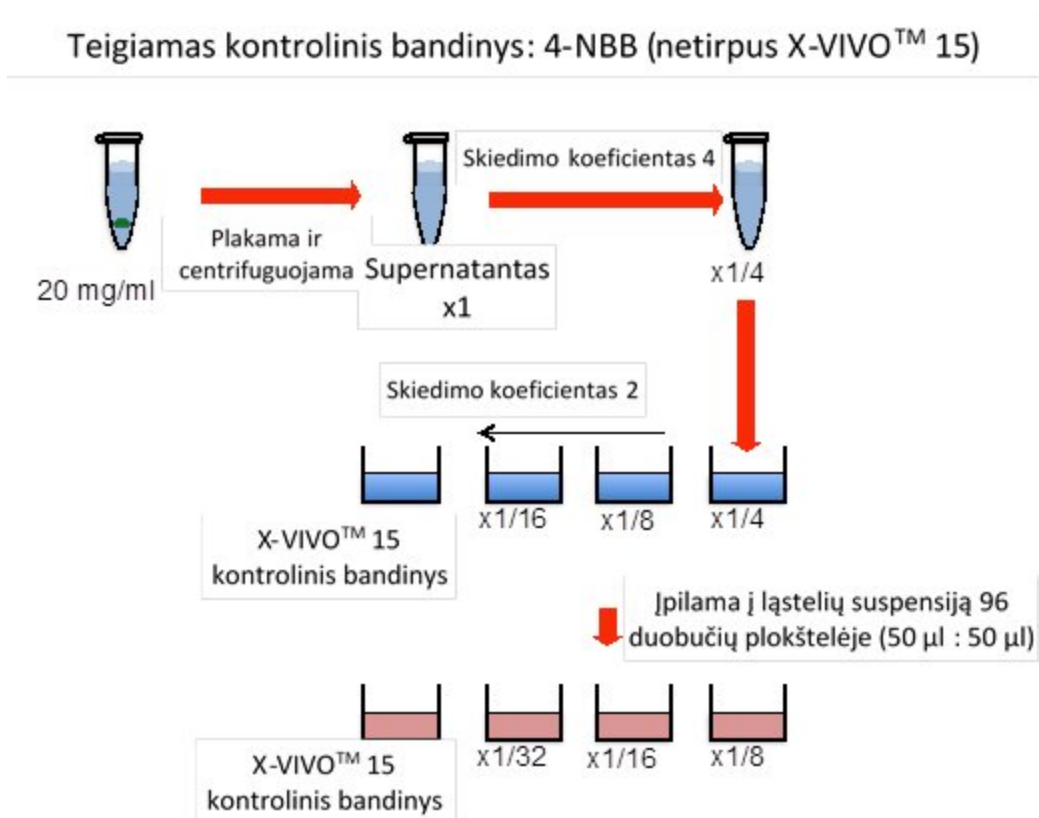


b) Kai cheminės medžiagos nėra tirpios X-VIVO™ 15 esant 20 mg/ml koncentracijai



3.6. priedėlis

METODO, PAGAL KURĮ IŠTIRPINAMAS 4-NBB, NAUDOJAMAS TEIGIAMAM KONTROLINIAM BANDINIUI PER IL-8 LUC TYRIMĄ, SCHEMA



cc

9) C dalis papildoma šiais skyriais:

„C.52 IŠPLĖSTINIS MEDAKŲ (*ORYZIAS LATIPES*) VIENOS KARTOS REPRODUKCIJOS BANDYMAS (MEOGRT)

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) 240 (2015). Išplėstinis medakų vienos kartos bandymas (MEOGRT) – kompleksinis bandymo metodas, pagal kurį, veikiant bandomąją medžiaga kelias žuvų kartas, gaunami duomenys, svarbūs cheminių medžiagų, įskaitant įtariamą endokrininę sistemą galinčias ardyti chemines medžiagas, ekologinių pavojų ir rizikos vertinimui. Atliekant MEOGRT bandymą, bandomosios medžiagos ekspozicija trunka iki antros (F2) kartos išsiritimo (iki dviejų savaičių po apvaisinimo). Norint pagrįsti, kad būtų naudinga pratęsti F2 kartos tyrimą ir po išsiritimo, reikėtų atlikti papildomus tyrimus; kol kas nėra pakankamai informacijos, kad būtų galima nustatyti reikiamas sąlygas ar kriterijus F2 kartos bandymo pratęsimui pagrįsti. Vis dėlto šis bandymo metodas gali būti atnaujinamas, atsižvelgiant į naują informaciją ir duomenis. Pavyzdžiui, gairės dėl F2 kartos tyrimo pratęsimo iki reprodukcijos galėtų būti naudingos tam tikromis aplinkybėmis (pvz., kai cheminių medžiagų biokoncentracijos geba yra didelė arba turima žinių apie poveikį kelioms kartoms tiriant kitus taksonus). Šis bandymo metodas gali būti naudojamas vertinant cheminių medžiagų, įskaitant endokrininę sistemą galimai ardančias chemines medžiagas, galimą lėtinį poveikį žuvis. Pagal šį metodą pagrindinis dėmesys skiriamas galimam reikšmingam poveikiui populiacijai (tai yra neigiamas poveikis išgyvenamumui, vystymuisi, augimui ir reprodukcijai), apskaičiuojant nepastebėto poveikio koncentraciją (NOEC) arba poveikio koncentraciją (ECx), nors reikėtų pažymėti, kad ECx metodai retai tinka šio pobūdžio didelio masto tyrimams, kai didinti bandomųjų koncentracijų skaičių, siekiant nustatyti norimą ECx vertę, gali būti nepraktiška ir kartu gali kilti reikšmingų gyvūnų gerovės problemų dėl didelio naudojamų gyvūnų skaičiaus. Kai nereikia vertinti cheminių medžiagų poveikio kelioms kartoms arba cheminės medžiagos nėra endokrininę sistemą galinčios ardyti medžiagos, gali būti tinkamesni kiti bandymų metodai (1). Japoninė medaka (*Oryzias latipes*) yra pagal šį bandymo metodą naudoti tinkama rūšis, nes jos gyvenimo ciklas yra trumpas ir galima nustatyti jos genetinę lytį (2), kuri pagal šį bandymo metodą laikoma esminės svarbos dalyku. Šio metodo aprašyme išdėstyti konkretūs metodai ir stebimos vertinamosios baigtys tinka tik japoninei medakai. Kitoms smulkių žuvų rūšims (pvz., zibrinei danijai) gali būti pritaikytas panašus bandymo protokolas.

2. Pagal šį bandymo metodą matuojamos kelios biologinės vertinamosios baigtys. Pagrindinis dėmesys skiriamas galimam neigiamam poveikiui reikšmingiems populiacijos parametrams, įskaitant išgyvenamumą, bendrą vystymąsi, augimą ir reprodukciją. Antra, siekiant pateikti informacijos apie susijusius mechanizmus ir nustatyti sąsają su rezultatais, gautais atlikus kitokius lauko ir laboratorinius tyrimus, kai iš patirties (*a posteriori*) turima įrodymų, kad cheminė medžiaga gali turėti endokrininę sistemą ardantį poveikį (pvz., androgeninis ar estrogeninis veikimas, nustatytas kitais bandymais ir tyrimais), kitos naudingos informacijos gaunama matuojant *vitelogenino* (*vtg*) mRNR (arba vitelogenino baltymo, VTG) kiekius, fenotipinius antrinius lytinius požymius, susijusius su genetinė lytimi, ir vertinant histopatologiją. Pažymėtina, kad jei nekyla įtarimų, kad bandomoji cheminė medžiaga arba jos metabolitai gali būti endokrininę sistemą ardančios medžiagos, gali nereikėti matuoti šių antrinių vertinamųjų baigčių ir gali būti tinkamesni tokie tyrimai, kuriems reikia mažiau išteklių ir mažiau intensyvių bandymų su gyvūnais (1). Pagal šį bandymo metodą vartojamų terminų apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

3. Dėl riboto cheminių medžiagų, kurių bandymai atlikti, ir patvirtinant šio gana sudėtingo tyrimo tinkamumą dalyvavusių laboratorijų skaičiaus numatoma, kad kai jau bus atlikta pakankamai tyrimų, kad būtų galima nustatyti šio naujo tyrimo plano poveikį, šis bandymo metodas bus peržiūrėtas ir, jei reikės, pakeistas atsižvelgiant į įgytą patirtį. Jo duomenys gali būti naudojami 5-uoju lygmeniu (*Level 5*) pagal EBPO endokrininę sistemą ardančių medžiagų bandymų ir vertinimų konceptualiąją sistemą (3). Pagal šį bandymo metodą iš pradžių suaugusios (F0 kartos) žuvis yra veikiamos bandomąja chemine medžiaga reprodukcijos etape. Veikimas bandomąja medžiaga tęsiamas vystantis ir dauginantis F1 kartos žuvims ir iki F2 kartos išsiritimo iš ikrų; taigi, atliekant šį tyrimą galima vertinti ir struktūrinio, ir aktyvinamojo endokrininio poveikio kelius. Aiškinant su endokrinine sistema susijusias vertinamąsias baigtis galima taikyti įrodomosios duomenų galios nustatymo metodą.
4. Bandymui turėtų būti naudojamas pakankamas individų skaičius, kad būtų garantuotas pakankamas gebėjimas vertinti su reprodukcija susijusias vertinamąsias baigtis (žr. 3 priedėlį), kartu užtikrinant, kad naudojamų gyvūnų skaičius būtų minimalus (tik tiek, kiek būtina), dėl gyvūnų gerovės priežasčių. Kadangi naudojama daug bandomųjų gyvūnų, svarbu kruopščiai apsvarstyti, ar reikia atlikti šį bandymą, atsižvelgiant į esamus duomenis, kuriuose jau gali būti aktualios informacijos apie daugelį MEOGRT bandymo vertinamųjų baigčių. Šiuo atžvilgiu gali šiek tiek padėti EBPO toksiškumo žuvims bandymų programa (1).

5. Šis bandymo metodas sukurtas daugiausia tam, kad būtų galima nustatyti vienos cheminės medžiagos poveikį. Tačiau jei reikia atlikti mišinio bandymą, vertėtų apsvarstyti, ar taip gauti rezultatai bus tinkami naudoti numatomu reglamentavimo tikslu.
6. Prieš pradedant bandymą svarbu turėti informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos fizikines ir chemines savybes, ypač kad būtų galima paruošti stabilius cheminių medžiagų tirpalus. Taip pat būtina taikyti pakankamai jautrų analizės metodą tikrinant bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertes.

BANDYMO PRINCIPAS

7. Bandymas pradedamas nuo to, kad lytiškai subrendę patinai ir patelės (kurių amžius yra bent 12 savaičių po apvaisinimo, toliau – s. p. a.), suskirstyti į veislines poras 3 savaites veikiami bandomąja chemine medžiaga; per tą laiką bandomoji cheminė medžiaga pagal jai būdingą toksikokinetinę elgseną pasiskirsto motininės kartos (F0) gyvūnų organizme. Ketvirtos savaitės pirmąją dieną arba kuo arčiau šios dienos surenkami žuvų ikrų, iš kurių įveisama F1 karta. Auginant F1 kartos žuvis (iš viso 15 savaičių) vertinamas išsiritimas (angl. *hatchability*) ir išgyvenamumas. Be to, 9–10 s. p. a. žuvų ėminiai paimami vystymosi vertinamosioms baigtims tirti, o nerštas vertinamas tris savaites nuo 12 iki 14 s. p. a. F2 karta pradedama auginti po reprodukcijos vertinimo trečiosios savaitės ir auginama, iki baigia išsiriti iš ikrų.

BANDYMO TINKAMUMO KRITERIJAI

8. Taikomi šie bandymo tinkamumo kriterijai:
 - vandenyje ištirpusio deguonies koncentracija turėtų būti ≥ 60 % oro soties vertės per visą bandymą;
 - vidutinė vandens temperatūra per visą tyrimą turėtų būti nuo 24 iki 26 °C. Trumpi nukrypimai nuo šio vidurkio atskiruose akvariumuose neturėtų būti didesni nei 2 °C;
 - kiekvienos kartos (F0 ir F1) kontrolinių grupių gyvūnų vidutinis vislumas turėtų būti didesnis nei 20 ikrų iš vienos poros per parą. Visų vertinimo metu gautų ikrų vaisingumas turėtų būti didesnis nei 80 %. Be to, 16 iš rekomenduojamų 24 kontrolinių veislinių porų (>65 %) vislumas turėtų būti didesnis nei 20 ikrų iš vienos poros per parą;
 - išsiritimas iš ikrų (vidutinis) turėtų būti ≥ 80 % kontrolinėse (ir F1, ir F2 kartos) grupėse;

- išgyvenamumas po išsiritimo iki 3 s. p. a. ir nuo 3 s. p. a. iki F1 kartos likvidavimo (t. y. 15 s. p. a.) kontrolinėse grupėse (F1) turėtų būti atitinkamai ≥ 80 % (vidutinis) ir ≥ 90 % (vidutinis);
- turėtų būti gauta įrodymų, kad bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos tirpale buvo tinkamai palaikomos vidutinių išmatuotų verčių ± 20 % tikslumu.

Nors vandens temperatūra nėra vienas iš tinkamumo kriterijų, tos pačios bandomosios grupės kartotiniai bandiniai neturėtų būti šiuo atžvilgiu statistiškai skirtingi vienas nuo kito, o bandomosios grupės atliekant bandymą neturėtų būti statistiškai skirtingos viena nuo kitos (remiantis kasdieniais temperatūros matavimais, neatsižvelgiant į trumpus nuokrypius).

9. Nors didesnio bandomosios medžiagos poveikio grupėse gali būti pastebimas reprodukcijos sumažėjimas, F0 kartos reprodukcija bent trečios didžiausios dozės grupėje ir visų mažesnių dozių grupėse turėtų būti pakankama, kad būtų galima pripildyti ikrų inkubatorius. Be to, F1 kartos trečios didžiausios dozės ir mažesnių dozių poveikio grupėse turėtų būti pakankamai išgyvenusių embrionų, kad būtų galima įvertinti vertinamąsias baigtis iš nesuaugusių žuvų ėminių (žr. 36 ir 38 punktus ir 9 priedėlį). Be to, išgyvenamumas po išsiritimo turi būti bent minimalus (~ 20 %) F1 kartos antros didžiausios dozės poveikio grupėje. Tai nėra tinkamumo kriterijai, tačiau tai rekomendacijos, kaip būtų galima apskaičiuoti patikimas NOEC vertes.
10. Jei pastebima, kad nukrypta nuo bandymo tinkamumo kriterijų, reikėtų apsvastyti to padarinius bandymo rezultatų patikimumui, ir tie nukrypimai bei svarstymai turėtų būti įtraukti į bandymo ataskaitą.

METODO APRAŠYMAS

Aparatūra

11. Įprasta laboratorinė įranga ir ši speciali įranga:

- a) deguonies ir pH matuokliai;
- b) įranga vandens kietumui ir šarmingumui nustatyti;
- c) tinkama temperatūros kontrolės (geriausia nuolatinės stebėsenos) aparatūra;
- d) iš chemiškai inertiškos medžiagos pagaminti indai (akvariumai), tinkamos talpos pagal rekomenduojamą žuvų įkrovą ir laikymo tankį juose (žr. 3 priedėlį);
- e) reikiamo tikslumo svarstyklės (t. y. $\pm 0,5$ mg tikslumo).

Vanduo

12. Bandymui galima naudoti bet koki vandenį, kuriame bandomosios rūšies žuvis gali ilgai gyventi ir augti. Vandens kokybė turėtų būti pastovi per visą bandymą. Siekiant užtikrinti, kad skiedimo vanduo nepadarytų netinkamo poveikio bandymo rezultatui (pvz., sudarydamas kompleksinius junginius su bandomąja chemine medžiaga) ar neigiamo poveikio veislinių žuvų produktyvumui, tam tikrais intervalais turėtų būti imami ėminiai analizei. Sunkiųjų metalų (pvz., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), pagrindinių anijonų ir katijonų (pvz., Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), pesticidų, bendrosios organinės anglies ir suspenduotų kietųjų dalelių kiekių matavimai turėtų būti atliekami, pavyzdžiui, kas šešis mėnesius, kai yra žinoma, kad skiedimo vanduo yra gana pastovios kokybės. Kai kurios skiedimui tinkamo vandens cheminės savybės nurodytos 2 priedėlyje. Vandens pH vertė turėtų būti intervale nuo 6,5 iki 8,5, bet per konkretų bandymą ji neturėtų pakisti daugiau kaip $\pm 0,5$ pH vieneto.

Ekspozicijos sistema

13. Ekspozicijos sistemos konstrukcija ir jai tinkamos medžiagos konkrečiai nenurodomos. Bandymo sistema turėtų būti pagaminta iš stiklo, nerūdijančiojo plieno ar kitos chemiškai inertiškos medžiagos, neužterštos per ankstesnius bandymus. Šiam bandymui tinkama ekspozicijos sistema gali būti nuolatinio srauto pratekamoji sistema (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13).

Bandymo tirpalai

14. Bandomosios cheminės medžiagos pradinis tirpalas turėtų būti į ekspozicijos sistemą tiekiamas tinkamu siurbliu. Pradinio tirpalo srauto sparta (debitas) turėtų būti kalibruota remiantis bandymo tirpalų tinkamumo analiziniu patvirtinimu, prieš pradedant veikimo bandomąja medžiaga etapą, ir periodiškai tikrinama tūrio matavimais per visą bandymą. Bandymo tirpalas kiekvienoje bandymo kameroje tinkamai atnaujinamas (pvz., visas jo tūris pakeičiamas ne mažiau kaip 5 kartus per parą, daugiausia iki 16 kartų per parą, arba palaikomas iki 20 ml per minutę srautas) priklausomai nuo bandomosios cheminės medžiagos stabilumo ir vandens kokybės.
15. Pasirinktų koncentracijų bandymo tirpalai ruošiami skiedžiant pradinį tirpalą. Pradinį tirpalą patartina ruošti paprasčiausiai sumaišant arba suplakant bandomąją cheminę medžiagą su skiedimo vandeniu mechaninėmis priemonėmis (pvz., maišykle ir (arba) ultragarsu). Tinkamos koncentracijos pradiniam tirpalui ruošti galima naudoti prisotinimo kolonėles ar sistemas arba pasyviojo dozavimo metodus (14). Reikėtų stengtis, kiek tik įmanoma, nenaudoti tirpiklių ar nešiklių, nes: 1) kai kurie tirpikliai patys gali būti toksiški ir (arba) sukelti nepageidaujamus ar netikėtus atsakus, 2) kai bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijos viršija jų tirpumo vandenyje gebą (taip gali dažnai nutikti

naudojant tirpiklius), gali būti netiksliai nustatytos efektyviosios jų koncentracijos, 3) per ilgesnį laiką truncančius bandymus naudojami tirpikliai gali paskatinti nemažą biologinės plėvelės, susijusios su mikroorganizmų aktyvumu, susidarymą, ir tai gali paveikti aplinkos sąlygas ir gebėjimą palaikyti tinkamas poveikio koncentracijas, ir 4) kai nėra ankstesnių duomenų, kuriais būtų patvirtinta, kad atitinkamas tirpiklis nedaro poveikio tyrimo rezultatui, naudojant tirpiklius reikia tirpiklio kontrolinio bandinio, o tai turi poveikį gyvūnų gerovei, nes bandymui atlikti reikia daugiau gyvūnų. Tiriant chemines medžiagas, kurių bandymus atlikti sunku, galima naudoti tirpiklį, kai nėra kitos išeities, ir reikėtų nustatyti geriausią metodą remiantis EBPO rekomendaciniu dokumentu Nr. 23 dėl sunkiai tiriamų medžiagų ir mišinių toksiškumo vandens organizmams bandymų (15). Tirpiklio pasirinkimas priklauso nuo bandomosios cheminės medžiagos cheminių savybių ir nuo to, ar yra ankstesnių duomenų apie to tirpiklio naudojimą. Jei naudojami tirpikliai-nešikliai, kartu su kontroliniais (neigiamais) bandiniais be tirpiklio (tik su skiedimo vandeniu) turėtų būti naudojami ir tinkami tirpiklio kontroliniai bandiniai. Tuo atveju, kai tirpiklio naudojimas neišvengiamas ir dėl to padidėja mikroorganizmų aktyvumas (susidaro biologinė plėvelė), rekomenduojama užrašyti ir ataskaitoje pranešti biologinės plėvelės susidarymo kiekviename inde duomenis per visą bandymą (bent kas savaitę). Geriausia yra palaikyti pastovią tirpiklio koncentraciją tirpiklio kontroliniame bandinyje ir visuose bandomosios medžiagos bandiniuose. Jei tirpiklio koncentracija nėra pastovi, didžiausia tirpiklio koncentracija, esanti bandinyje su bandomąja medžiaga, turėtų būti naudojama ir tirpiklio kontroliniame bandinyje. Tais atvejais, kai naudojamas tirpiklis-nešiklis, didžiausios tirpiklio koncentracijos neturėtų viršyti 100 µl/l ar 100 mg/l (15) ir rekomenduojama palaikyti kuo mažesnę tirpiklio koncentraciją (pvz., <20 µl/l), kad būtų išvengta galimo tirpiklio poveikio matuojamoms vertinamosioms baigtims (16).

Bandomieji gyvūnai

Žuvų atranka ir laikymas

16. Bandomoji rūšis yra japoninė medaka *Oryzias latipes*, pasirinkta dėl jos trumpo gyvenimo ciklo ir galimybės nustatyti genetinę lytį. Nors panašų bandymo protokolą galima pritaikyti ir kitų smulkių rūšių žuvims, pagal šį bandymo metodą aprašyti konkretūs metodai ir stebimos vertinamosios baigtys tinka tik japoninei medakai (žr. 1 punktą). Medakas yra lengva veisti nelaisvėje; yra paskelbta jų auginimo metodų (17) (18) (19) ir turima duomenų, gautų iš jų trumpalaikio žūstamumo, ankstyvosios gyvenimo stadijos ir viso gyvenimo ciklo bandymų (5) (6) (8) (9) (20). Visų laikomų žuvų apšvietimo režimas yra 16 val. šviesos ir 8 val. tamsos laikotarpis. Žuvis šeriamos gyvų sūriavandenių krevečių *Artemia* spp. nauplijais, kuriuos, jei būtina, galima papildyti pirktiniais žuvų pašaro

dribsniais. Pirktiniai žuvų pašaro dribsniai turėtų būti reguliariai analizuojami, ar juose nėra teršalų.

17. Jei laikomasi tinkamos žuvų priežiūros praktikos, specialaus jų auginimo protokolo laikytis nereikia. Pavyzdžiui, medakas galima auginti 2 l tūrio induose, po 240 žuvų lervų kiekviename inde, iki 4 s. p. a., vėliau jas galima auginti 2 l tūrio induose po 10 žuvų viename inde iki 8 s. p. a., o tada į 2 l tūrio indus perkeliama po dvi žuvis (veislinės poros).

Žuvų aklimatizacija ir atranka

18. Žuvis bandymui reikėtų rinktis iš vienos laboratorinės populiacijos, aklimatizuotos bent dvi savaites prieš bandymą panašiomis, kaip bandymo, vandens kokybės ir apšvietimo sąlygomis (pastaba: šis aklimatizacijos laikotarpis nėra paruošiamasis laikotarpis bandymo vietoje, *in situ*). Rekomenduojama bandymui žuvis imti iš vietoje išaugintos kultūros, nes suaugusių žuvų gabenimas joms kelia stresą ir gali sukliudyti patikimai neršti. Žuvis turėtų būti šeriamos sūriavandenių krevečių nauplijais dukart per dieną per visą laikymo laikotarpį ir veikimo bandomąja medžiaga etape; jei reikia, šis pašaras papildomas pirktiniais žuvų pašaro dribsniais. Pradedant šį bandymą būtina turėti bent 42 veislines žuvų poras (54 veislines poras, jei reikia naudoti tirpiklio kontrolinį bandinį, iš dalies todėl, kad trūksta ankstesnių duomenų, kuriais būtų galima pagrįsti tik tirpiklio kontrolinio bandinio naudojimą), kad būtų užtikrintas pakankamas dauginimasis. Be to, kiekvieną F0 kartos veislinę porą reikėtų patikrinti ir įsitikinti, kad jos genai yra XX-XY (t. y. normalus kiekvienos lyties lytinių chromosomų kompleksas), kad nebūtų įtraukta spontaninių XX patinų (žr. 39 punktą).
19. Auginamų žuvų gaištamumo aklimatizacijos etape duomenis reikėtų užrašyti, o po 48 val. stabilizacijos laikotarpio taikomi šie kriterijai:
 - jei auginamos populiacijos gaištamumas per septynias paras iki perkėlimo į bandymo sistemą yra didesnis nei 10 %, visa ta partija atmetama;
 - jei gaištamumas toje populiacijoje per septynias paras prieš perkėlimą į bandymo sistemą yra nuo 5 % iki 10 % – prie 2 savaičių aklimatizacijos laikotarpio pridedamos dar septynios papildomos aklimatizacijos paros; jei per tas septynias papildomas paras gaištamumas yra didesnis nei 5 %, visa ta partija atmetama;
 - jei gaištamumas toje populiacijoje per septynias paras prieš perkėlimą į bandymo sistemą yra mažesnis nei 5 % – ta partija laikoma tinkama.
20. Dviejų savaičių aklimatizacijos laikotarpiu prieš bandymą ir veikimo bandomąja medžiaga laikotarpiu žuvis neturėtų būti gydomos nuo ligų, o jei įmanoma, gydymo nuo ligų reikėtų visiškai išvengti. Klinikinių ligos požymių turinčios žuvis neturėtų būti naudojamos

tyrimui. Auginimo laikotarpiu prieš bandymą reikėtų pildyti stebėjimo ir bet kokios ligų profilaktikos bei gydymo žurnalą.

21. Pradedant veikimo bandomąja medžiaga etapą, turėtų būti naudojamos lytiškai dimorfiškos, genetinę lytį turinčios suaugusios žuvys iš laboratorijos turimų reprodukcijai subrendusių gyvūnų, augintų 25 ± 2 °C temperatūroje, išteklių. Tos žuvys turėtų būti patvirtintos kaip tinkamos veisimui (t. y. jau turėjusios gyvybingų palikuonių) per savaitę iki veikimo bandomąja medžiaga pradžios. Visoje bandymui naudojamų žuvų grupėje individų masės intervalas pagal lytį bandymo pradžioje neturėtų daugiau kaip ± 20 % nukrypti nuo tos pačios lyties individų masės aritmetinio vidurkio. Prieš bandymą reikėtų pasverti žuvų poėminį ir nustatyti vidutinę masę. Pasirinktų žuvų amžius turėtų būti bent 12 s. p. a., patelės turėtų sverti ≥ 300 mg, patinai ≥ 250 mg.

BANDYMO PLANAS

Bandomosios medžiagos koncentracijos vertės

22. Rekomenduojama naudoti penkių bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos verčių bandinius kartu su kontroliniu (-iais) bandiniu (-iais). Renkantis bandomosios medžiagos koncentracijos verčių intervalą reikėtų atsižvelgti į visus informacijos šaltinius, įskaitant kiekybinius medžiagos struktūros ir savybių ryšius (QSAR), palyginimą su analogiškais medžiagomis (analogijos metodas) ir bandymų su žuvimis rezultatus, kaip antai pagal ūmaus gaištamumo tyrimų (šio priedo C.1 skyrius), trumpalaikės žuvų reprodukcijos tyrimo (šio priedo C.48 skyrius) ir kitus bandymų metodus, pvz., pateiktus šio priedo C.15, C.37, C.41, C.47 arba C.49 skyriuose (21) (22) (23) (24) (25) (26), jei tokios informacijos yra, arba, jei būtina, atlikti intervalo nustatymo bandymą, galbūt apimančią reprodukcijos etapą. Jei reikia, intervalo nustatymo bandymas gali būti atliekamas panašiomis (vandens kokybės, bandymo sistemos, gyvūnų įkrovos) sąlygomis į tas, kurios naudojamos per galutinį bandymą. Jei būtina naudoti tirpiklį ir dėl jo neturima ankstesnių duomenų, per intervalo nustatymo bandymą galima kartu nustatyti to tirpiklio tinkamumą. Didžiausia bandomosios medžiagos koncentracija neturėtų viršyti jos tirpumo vandenyje ribos, 10 mg/l arba 1/10 96h-LC50 vertės (27). Mažiausia koncentracija turėtų būti nuo 10 iki 100 kartų mažesnė nei didžiausia koncentracija. Naudojant penkias koncentracijos vertes per šį bandymą galima ne tik išmatuoti dozės ir atsako santykius, bet ir gauti mažiausios pastebėto poveikio koncentracijos (LOEC) ir nepastebėto poveikio koncentracijos (NOEC) vertes, kurios reikalingos rizikos vertinimui pagal kai kurias reglamentavimo programas ar jurisdikcijas. Apskritai bandomosios cheminės medžiagos nominaliųjų koncentracijų skirtumo koeficientas tarp gretimų dozių yra $\leq 3,2$.

Kartotiniai bandiniai bandomosiose grupėse ir kontrolinėse grupėse

23. Kiekvienai bandomosios medžiagos koncentracijai turėtų būti naudojamos bent šešios kartotinės bandymo kameros (žr. 7 priedėlį). Reprodukcijos (išskyrus F0 kartos reprodukciją) etape kartotinių bandinių struktūra padvigubinama, siekiant vertinti vislumą, ir kiekviename kartotiniame bandinyje laikoma tik viena veislinė pora (žr. 42 punktą).
24. Kartu su įvairių bandomosios medžiagos koncentracijų bandiniais turėtų būti papildomai naudojamas skiedimo vandens kontrolinis bandinys ir, jei reikia, tirpiklio kontrolinis bandinys. Kontrolinių bandinių kartotinių kamerų skaičius turėtų būti dvigubai didesnis, kad būtų užtikrinta pakankama statistinė galia (t. y. reikėtų naudoti bent dvylika kontrolinių bandinių kontrolinėse grupėse). Reprodukcijos etape kartotinių kontrolinių bandinių skaičius padvigubinamas (t. y. mažiausiai 24 kartotiniai bandiniai ir kiekviename kartotiniame bandinyje tik viena veislinė pora). Po reprodukcijos kontroliniuose kartotiniuose bandiniuose turėtų būti ne daugiau kaip po 20 embrionų (žuvų).

PROCEDŪRA

Bandymo pradžia

25. Aktyvaus reprodukcinio amžiaus suaugusios žuvis, naudojamos pradedant F0 kartos bandymą, atrenkamos pagal du kriterijus: amžių (paprastai daugiau kaip 12 s. p. a., bet patartina ne daugiau kaip 16 s. p. a.) ir masę (patelės turėtų sverti ≥ 300 mg, patinai ≥ 250 mg).
26. Šias nurodytas sąlygas atitinkančios patelių ir patinų poros perkeliama atskiromis poromis į kiekvieną kartotinio bandinio indą, t. y. bandymo pradžioje turi būti dvylika kartotinių bandinių kontrolinėse grupėse ir šeši kartotiniai bandiniai chemine medžiaga veikiamose grupėse. Šiems bandymo indams atsitiktine tvarka skiriama tam tikra bandomosios medžiagos dozė (pvz., T1–T5 ir kontrolinis bandinys) ir kartotinis bandinys (pvz., A–L kontrolinėse grupėse ir A–F bandomojoje grupėje), tada jie įdedami į ekspozicijos sistemą, užtikrinant tinkamą tirpalo srautą į kiekvieną indą.

Veikimo bandomąja medžiaga sąlygos

27. Visi bandymo parametrai ir sąlygos išsamiai išdėstyti 3 priedėlyje. Laikantis šių specifikacijų kontrolinės grupės žuvų vertinamųjų baigčių vertės turėtų būti panašios į tas, kurios nurodytos 4 priedėlyje.
28. Bandymo metu vandenyje ištirpęs deguonis, pH ir temperatūra turėtų būti matuojami bent viename kiekvienos bandomosios grupės ir kontrolinės grupės bandymo inde. Šiuos

(išskyrus temperatūros) matavimus veikimo bandomąja medžiaga laikotarpiu reikėtų atlikti bent kartą per savaitę. Vidutinė vandens temperatūra per visą tyrimą turėtų būti nuo 24 iki 26 °C visu bandymo laikotarpiu. Veikimo bandomąja medžiaga laikotarpiu temperatūra turėtų būti matuojama kiekvieną dieną. Vandens pH vertė turėtų būti intervale nuo 6,5 iki 8,5, bet per konkretų bandymą ji neturėtų pakisti daugiau kaip $\pm 0,5$ pH vieneto. Vienos bandomosios grupės kartotiniai bandiniai neturėtų būti statistiškai skirtingi vienas nuo kito, o bandomosios grupės atliekant bandymą neturėtų būti statistiškai skirtingos viena nuo kitos (remiantis kasdieniais temperatūros matavimais, neatsižvelgiant į trumpus nuokrypius).

Ekspozicijos trukmė

29. Pradedant bandymą, lytiškai subrendusios reprodukcijai F0 kartos žuvis veikiama bandomąja medžiaga tris savaites. Ketvirtą savaitę, maždaug 24 bandymo dieną, pradedama auginti F1 karta, o F0 veislinių porų žuvis humaniškai numarinamos ir užrašomi jų masės ir ilgio duomenys (žr. 34 punktą). Tada F1 kartos žuvis veikiama bandomąja medžiaga dar 14 savaitių (iš viso F1 kartai tenka 15 savaitių poveikis), o F2 karta – dvi savaites iki išsiritimo iš ikrų. Visa bandymo trukmė yra preliminariai 19 savaitių (t. y. iki F2 kartos išsiritimo). Bandymo tvarkaraštis pateikiamas 2 lentelėje ir išsamiau paaiškintas 9 priedėlyje.

Šėrimo režimas

30. Žuvis galima šerti sūriavandenėmis krevetėmis *Artemia* spp. (24 valandų amžiaus nauplijais) iki soties, o jei reikia, ir papildomai pirktiniais žuvų pašaro dribsniais. Pirktiniai žuvų pašaro dribsniai turėtų būti reguliariai analizuojami, ar juose nėra teršalų, kaip antai chloro organinių pesticidų, policiklinių aromatinių angliavandenilių (PAA) ar polichlorintųjų bifenilų (PCB). Reikėtų stengtis nenaudoti tokių pašarų, kuriuose yra didesnis endokrininę sistemą veikiančių medžiagų (pvz., fitoestrogenų), galinčių paveikti bandymo rezultatą, kiekis. Nesuvalytas pašaras ir išmatos iš bandymo indų turėtų būti pašalinami taip dažnai, kaip reikia, pvz., kruopščiai išvalant kiekvieno indo dugną sifonu. Kiekvieno indo šonus ir dugną taip pat reikėtų nuvalyti (pvz., nugrindyti mentele) vieną ar du kartus per savaitę. Žuvų šėrimo režimo pavyzdys pateiktas 5 priedėlyje. Šėrimo normos priklauso nuo žuvų skaičiaus kartotiniame bandinyje. Taigi jei kartotiniame bandinyje nugaišta dalis žuvų, šėrimo norma sumažinama.

Analizinis nustatymas ir matavimai

31. Prieš pradedant veikimo bandomąja medžiaga etapą reikėtų įsitikinti, kad cheminės medžiagos tiekimo sistema tinkamai veikia. Turėtų būti nustatyti visi reikiami analizės metodai, taip pat reikėtų pakankamai žinoti apie tos cheminės medžiagos stabilumą

bandymo sistemoje. Atliekant bandymą, tinkamais intervalais nustatomos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos (patartina tai daryti bent kartą per savaitę) viename kiekvienos bandomosios grupės kartotiniame bandinyje, kas savaitę renkantis tikrinti vis kitą kartotinį bandinį toje pačioje bandomojoje grupėje.

32. Bandymo metu turėtų būti tinkamais intervalais (pvz., bent tris kartus per savaitę) tikrinami skiesto ir pradinio tirpalo srautai (debitas). Rekomenduojama rezultatus pagrįsti išmatuotomis koncentracijos vertėmis, tačiau jei bandomosios cheminės medžiagos koncentracija tirpale buvo tinkamai palaikoma $\pm 20\%$ vidutinių išmatuotų verčių tikslumu per visą bandymą, rezultatus galima pagrįsti arba nominaliosiomis, arba išmatuotomis vertėmis. Tuo atveju, kai cheminės medžiagos labai kaupiasi žuvyse, bandomosios medžiagos koncentracijos gali sumažėti žuvims augant. Tokiais atvejais rekomenduojama atitinkamai pritaikyti bandymo tirpalo atnaujinimo spartą kiekvienoje kameroje, kad būtų palaikomos kuo pastovesnės bandomosios medžiagos koncentracijos.

Stebėjimai ir matuojamos vertinamosios baigtys

33. Matuojamos vertinamosios baigtys yra vislumas, vaisingumas, išsiritimas, augimas ir išgyvenamumas, vertinant galimą poveikį populiacijos lygiu. Taip pat reikėtų kasdien stebėti gyvūnų elgesį ir užrašyti pastabas dėl bet kokio neįprasto elgesio. Kitos mechaninio pobūdžio vertinamosios baigtys yra kepenų vitelogenino (*vlg*) mRNR arba VTG baltymo kiekiai, nustatomi imuniniu tyrimu (28), lyties fenotipiniai požymiai, tokie kaip patinams būdingi analinio peleko gumburėliai, histologinis lytinių liaukų (gonadų) lyties vertinimas ir histopatologinis inkstų, kepenų ir lytinių liaukų vertinimas (žr. vertinamųjų baigčių sąrašą 1 lentelėje). Visos šios konkrečios vertinamosios baigtys vertinamos nustačius individo genetinę lytį pagal tai, ar yra medakos vyriškąją lytį lemiantis genas *dmy*, ar jo nėra (žr. 41 punktą). Papildomai vertinamas laikas iki neršto. Be to, paprastus fenotipinius lyčių santykius galima nustatyti naudojant informaciją apie suskaičiuotus analinio peleko gumburėlius, taip identifikuojant atskirą medaką kaip fenotipinį patiną arba patelę. Šiuo bandymo metodu nesitikima nustatyti nedidelių nukrypimų nuo tikėtinų lyčių santykio, nes dėl palyginti nedidelio žuvų, esančių kiekviename kartotiniame bandinyje, skaičiaus nepakanka statistinės galios. Be to, atliekant histopatologinį vertinimą, įvertinama lytinė liauka ir atliekamos kur kas patikimesnės analizės, vertinant lytinės liaukos fenotipą genetinės lyties kontekste.
34. Pagrindinis šio bandymo metodo tikslas yra įvertinti galimą populiacijai reikšmingą bandomosios cheminės medžiagos poveikį. Mechanistinės vertinamosios baigtys (VTG, antriniai lytiniai požymiai ir tam tikras histopatologinis poveikis lytinėms liaukoms) taip pat gali padėti nustatyti, ar koks nors poveikis patiriamas dėl endokrininės sistemos

veikimo. Tačiau šioms mechaninio pobūdžio vertinamosioms baigtims gali turėti įtakos ir sisteminis bei kitoks toksiškumas, todėl taip pat galima išsamiau įvertinti kepenų ir inkstų histopatologiją, siekiant geriau suprasti bet kokius organizmo atsakus, nustatytus tiriant mechaninio pobūdžio vertinamąsias baigtis. Jei neatliekama šių išsamių vertinimų, vis vien reikėtų atkreipti dėmesį į dideles anomalijas, atsitiktinai pastebėtas atliekant histopatologinį vertinimą, ir apie jas pranešti ataskaitoje.

Humaniškas žuvų numarinimas

35. Nutraukus F0 ir F1 kartų žuvų veikimą bandomąja chemine medžiaga, kai imamas nesuaugusių žuvų poėminis, žuvis turėtų būti numarinamos tinkamais anestetiko tirpalo kiekiais (pvz., trikaino metansulfonato, MS-222 (CAS.886-86-2), 100–500 mg/l), buferiniame tirpale su 300 mg/l NaHCO₃ (natrio hidrokarbonato, CAS.144-55-8), kuriuo sumažinamas gleivinių dirginimas. Jei yra požymių, kad žuvis patiria didelių kančių (kurios yra labai didelės ir galima patikimai prognozuoti žūtį), ir jos laikomos gaištančiomis, reikėtų tuos gyvūnus anestezuoti ir numarinti, o per duomenų analizę traktuoti kaip nugaišusius gyvūnus. Kai žuvis numarinamos dėl liguistumo, reikėtų tai užrašyti ir pranešti ataskaitoje. Priklausomai nuo to, kuriame tyrimo etape žuvis numarinamos, galima pasilikti žuvis histopatologinei analizei (užfiksuoti žuvis, kad būtų galima atlikti histopatologinę analizę).

Žuvų ikrų ir lervų tvarkymas

Veislinių porų ikrų rinkimas naujai kartai įveisti

36. F0 kartos žuvų ikrų F1 kartai įveisti renkami 4 bandymo savaitės pirmą dieną (arba, jei reikia, dvi pirmas dienas), o F1 kartos ikrų F2 kartai įveisti renkami 18 bandymo savaitę. 18 bandymo savaitę F1 kartos žuvis yra suaugusios (15 savaičių po apvaisinimo, s. p. a.). Svarbu, prieš pradedant rinkti ikus, prieš vieną dieną pašalinti visus ikus iš kiekvieno indo, taip užtikrinant, kad visi surinkti veislinės poros ikrų būtų vienos vados. Po neršto medakos patelė kartais nešiojasi ikus prikibusius prie savo kūno, arti išeinamosios angos, kad galėtų juos padėti ant tinkamo substrato. Kadangi bandymo inde substrato nėra, ikus galima rasti arba prikibusius prie patelės, arba indo dugne. Priklausomai nuo jų buvimo vietos, ikrų atsargiai nuimami nuo patelės arba išsiurbiami iš dugno sifonu 4 bandymo savaitę (F0 kartos) ir 18 savaitę (F1 kartos). Visi surinkti vienos bandomosios grupės ikrų sudedami kartu prieš juos paskirstant į inkubavimo kameras.
37. Išnerštus ikus jungiančios gijos turėtų būti pašalintos. Apvaisinti ikrų (iki 20) paimami iš kiekvienos veislinės poros (1 pora kiekviename kartotiniame bandinyje), sudedami kartu pagal bandomąją grupę ir sistemingai paskirstomi į tinkamas inkubavimo kameras (6, 7

priedėliai). Naudojant kokybišką stereomikroskopą (skrodimo mikroskopą) galima įžiūrėti ankstyvus apvaisinimo, vystymosi požymius, tokius kaip apvaisinimo membranos (choriono) pakilimas, tolesnis ląstelių dalijimasis ar blastulės susidarymas. Inkubavimo kameras galima įdėti į atskirus inkubavimo akvariumus, paruoštus kiekvienai bandomajai grupei (tokiu atveju juose turi būti matuojami vandens kokybės parametrai ir bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos), arba į kartotinio bandinio akvariumą, kuriame bus laikomos išsiritusios lervos (pvz., eleuteroembriono stadijoje). Jei ikrus reikia rinkti ir antrą dieną (23 bandymo dieną), visus per abi dienas surinktus ikrus reikėtų sudėti kartu, o tada sistemingai perskirstyti į kiekvienos bandomosios grupės kartotinius bandinius.

Ikrų priežiūra iki išsiritimo

38. Apvaisinti ikrų nuolat judinami, pvz., ikrų inkubatoriuje oro burbulais arba vertikalčiai supant ikrų inkubatorių. Apvaisintų ikrų (embrionų) žūstamumas tikrinamas ir užrašomas kiekvieną dieną. Negyvi ikrų pašalinami iš inkubatorių (9 priedėlis). 7 dieną po apvaisinimo (d. p. a.) judinimas sustabdomas arba sumažinamas, kad apvaisinti ikrų nusėstų į inkubatoriaus dugną. Tai palengvina išsiritimą, kuris paprastai vyksta per vieną ar dvi tolesnes dienas. Kiekvienos bandomosios grupės ir kontrolinės grupės išsiritę gyvūnai (jaunos lervos; eleuteroembrionai) suskaičiuojami (jungtinio kartotinio bandinio pagrindu). Apvaisinti ikrų, iš kurių dar nėra išsiritusios lervos per dukart ilgesnį laiką nei iki vidutinės (medianinės) išsiritimo kontrolinėje grupėje dienos (paprastai 16 ar 18 d. p. a.), laikomi negyvybingais ir pašalinami.
39. Dvylika išsiritusių lervų perkeliama į kiekvieną kartotinio bandinio indą. Išsiritusios lervos iš inkubavimo kamerų sudedamos kartu ir sistemingai paskirstomos į kartotinių bandinių indus (7 priedėlis). Tai galima daryti atsitiktine tvarka išrenkant išsiritusią lervą iš jungtinės bandomosios grupės ir paeiliui, taip pat atsitiktine tvarka, dedant po vieną lervą į kiekvieną kartotinio bandinio akvariumą. Kiekviename inde turėtų būti vienodas skaičius ($n = 12$) išsiritusių lervų (daugiausia 20 lervų kiekviename inde). Jei išsiritusių lervų nepakanka visiems bandomosios grupės kartotiniams bandiniams užpildyti, rekomenduojama užtikrinti, kad būtų kuo daugiau kartotinių bandinių, kuriuose būtų po 12 išsiritusių lervų. Išsiritusias lervas galima saugiai perkelti plačiaangėmis stiklo pipetėmis. Bet kokios atliekamos išsiritusios lervos humaniškai numarinamos anestetiku. Per kelias savaites iki veislinių porų sudarymo reikėtų užrašyti, kurią dieną pastebėtas pirmas neršto atvejis kiekviename kartotiniame bandinyje.

Veislinių porų sudarymas

Pelekų kirpimas ir genotipinės lyties nustatymas

40. Genotipinės lyties nustatymas iš pelekų nuokarpų atliekamas 9–10 s. p. a. (t. y. F1 kartos žuvų 12 ar 13 bandymo savaitę). Visos inde esančios žuvys anestezuojamos (patvirtintais metodais, pvz., IACUC) ir paimamas mažas audinio ėminys iš kiekvienos žuvies uodeginio peleko galo iš nugaros ar pilvo pusės, kad būtų galima nustatyti individo genotipinę lytį (29). Vieno kartotinio bandinio žuvis galima laikyti mažuose narveliuose (jei įmanoma, po vieną žuvį narvelyje) tame kartotinio bandinio inde, arba kiekviename narvelyje galima laikyti po dvi žuvis, jeigu įmanoma jas vieną nuo kitos atskirti. Vienas būdas jas skirti yra skirtingai įpjauti uodeginį peleką (pvz., vienos žuvies peleko galą iš pilvo pusės, kitos – iš nugaros pusės) imant audinio ėminį.
41. Medakos genotipinė lytis nustatoma iš identifikuoto ir nustatytos sekos geno *dmy*, kuris yra Y chromosomoje. Geno *dmy* buvimas reiškia, kad tai yra XY individas, nepriklausomai nuo jo fenotipo, o jei geno *dmy* nėra, tai yra XX individas, nepriklausomai nuo fenotipo (30); (31). Iš kiekvieno peleko nuokarpas išgaunama deoksiribonukleorūgštis (DNR) ir galima nustatyti, ar genas *dmy* yra, ar jo nėra, polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodais (žr. šio priedo C.41 skyriaus 9 priedėlį, arba 3 ir 4 priedėlius (29) literatūros šaltinyje).

Veislinių porų sudarymas

42. Informacija apie genotipinę lytį naudojama sudarant XX-XY veislines poras nepriklausomai nuo išorinio fenotipo, kuris gali būti pakitęs dėl bandomosios cheminės medžiagos poveikio. Kitą dieną po to, kai nustatoma kiekvienos žuvies genotipinė lytis, atsitiktine tvarka atrenkamos dvi XX žuvys ir dvi XY žuvys iš kiekvieno kartotinio bandinio ir sudaromos dvi XX-XY veislinės poros. Jei kartotiniame bandinyje nėra dviejų XX ar dviejų XY žuvų, tinkamas žuvis reikėtų gauti iš kitų tos bandomosios grupės kartotinių bandinių. Pagrindinė užduotis yra gauti rekomenduojamą kartotinių veislinių porų skaičių (12) kiekvienoje bandomojoje grupėje ir kontrolinėse grupėse (24). Žuvis, turinčios akivaizdžių anomalijų (plaukimo pūslės problemų, stuburo deformacijų, kraštutinių dydžio skirtumų ir kt.), sudarant veislines poras būtų atmetamos. F1 kartos reprodukcijos etape kiekviename kartotinio bandinio inde turėtų būti tik viena veislinė pora.

Nesuaugusių žuvų ėminių ėmimas ir vertinamųjų baigčių vertinimas

Ne veislinių porų žuvų ėminių ėmimas

43. Po veislinių porų sudarymo likusios žuvys, kurios nepasirinktos tolesniam veisimui, yra humaniškai numarinamos, kad būtų galima išmatuoti nesuaugusių (F1 kartos) žuvų vertinamąsias baigtis 12 ar 13 bandymo savaitę. Nepaprastai svarbu žuvis tvarkyti taip, kad vis dar būtų galima atsekti konkrečios žuvies genotipinę lytį, nustatytą išrenkant veislines

poras. Visi surinkti duomenys analizuojami atsižvelgiant į konkrečios žuvies genotipinę lytį. Kiekviena žuvis naudojama matuojant įvairias vertinamąsias baigtis, įskaitant jauniklių (nesuaugusių žuvų) išgyvenamumo lygio nustatymą (nuo 7 iki 12 ar 13 bandymo savaitės (F1)), augimą į ilgį (galima matuoti standartinį ilgį, jei uodeginis pelekas yra sutrumpintas imant ėminių genetinės lyties analizei; visą ilgį galima matuoti, jei ėminiui dėl *dmy* geno buvo paimta tik dalis uodeginio peleko galo iš nugaros ar pilvo pusės) ir kūno masę (t. y. šlapio kūno masę, nusauginus sugeriamuoju popieriumi), kepenų *vtg* mRNR (arba VTG) ir analinio peleko gumburėlius (žr. 1 ir 2 lenteles). Įsidėmėtina, kad veislinių porų žuvų masę ir ilgį taip pat būtina žinoti apskaičiuojant vidutinį žuvų augimą tam tikroje bandomojoje grupėje.

Audinių ėminių ėmimas ir vitelogenino kiekio matavimas

44. Kepenys išskrodžiamos ir turėtų būti laikomos ≤ -70 °C temperatūroje iki *vtg* mRNR (arba VTG) matavimo. Žuvies uodega, įskaitant analinį peleką, užkonservuojama tinkamo (pvz., Davidson'o) fiksatoriaus tirpale arba nufotografuojama, kad vėliau būtų galima suskaičiuoti analinio peleko gumburėlius. Tuo pat metu, jei norima, galima paimti ir užkonservuoti ir kitų audinių (t. y. lytinės liaukos) ėminus. Kepenų VTG koncentracija turėtų būti kiekybiškai nustatyta pagal homologinės IFA (ELISA) metodą (žr. rekomenduojamas medakai tinkamas procedūras šio priedo C.48 skyriaus 6 priedėlyje); arba galima naudoti JAV aplinkos apsaugos agentūros (EPA) (29) nustatytus *vtg* mRNR kiekybinio nustatymo metodus, t. y. *vtg I* geno mRNR gaunant iš kepenų ėminio ir suskaičiuojant *vtg I* geno kopijas (iš 1 ng visos mRNR) kiekybinės PGR metodu. Vietoj *vtg* geno kopijų skaičiaus nustatymo kontrolinėse ir bandomosiose grupėse galima rinktis techniškai mažiau sudėtingą metodą, kuriam reikia mažiau išteklių, – nustatyti *vtg I* ekspresijos santykinį pokytį (kiek kartų ji pakito) kontrolinėse ir bandomosiose grupėse.

Antriniai lytiniai požymiai

45. Normaliomis sąlygomis tik lytiškai subrendę medakos patinai turi gumburėlius, išsivysčiusius ant kai kurių analinio peleko spindulių sujungtų plokštelių; tai yra antrinis lytinis požymis ir galimas biologinis žymuo, iš kurio galima spręsti apie endokrininę sistemą ardančią poveikį. Analinio peleko gumburėlių (sujungtų plokštelių su gumburėliais skaičiaus) skaičiavimo metodas pateiktas 8 priedėlyje. Kiekvieno individo analinio peleko gumburėlių skaičius taip pat naudojamas jį klasifikuojant kaip patiną arba patelę pagal išorinį fenotipą, kad būtų galima apskaičiuoti paprastąjį lyčių santykį kiekviename kartotiniame bandinyje. Medaka, kurios peleko gumburėlių skaičius yra bet koks didesnis už 0, laikoma patinu, o medaka, kurios analinio peleko gumburėlių skaičius yra 0, laikoma patele.

Vislumo ir vaisingumo vertinimas

46. F0 kartos vislumas ir vaisingumas vertinami 1–3 bandymo savaites, o F1 kartos 15–17 bandymo savaites. Kiekvienos veislinės poros ikrai kasdien renkami 21 dieną iš eilės. Ikrai atsargiai nuimami nuo tinkleliu pagautų patelių ir (arba) sifonu nusiurbiami nuo akvariumo dugno kiekvieną rytą. Kiekvieno kartotinio bandinio veislinės poros vislumo ir vaisingumo duomenys užrašomi kiekvieną dieną. Vislumas apibrėžiamas kaip išnerštų ikrų skaičius, o vaisingumas praktiškai apibrėžiamas kaip apvaisintų ir gyvybingų ikrų skaičius, nustatytas skaičiavimo metu. Suskaičiuoti ikrus reikėtų kuo greičiau po jų surinkimo.
47. Kartotinių bandinių žuvų vislumo duomenys kasdien užrašomi kaip kiekvienos veislinės poros ikrų skaičius, kuris analizuojamas pagal rekomenduojamas statistines procedūras, naudojant kartotinių bandinių vidurkius. Vaisingumas kartotiniame bandinyje yra visų iš veislinės poros gautų apvaisintų ikrų bendras skaičius, padalytas iš visų išnerštų tos poros ikrų bendro skaičiaus. Statistiškai vaisingumas analizuojamas kaip santykinis dydis kiekviename kartotiniame bandinyje. Išsiritimas kartotiniame bandinyje yra išsiritusių lervų skaičius, padalytas iš įdėtų embrionų skaičiaus (paprastai 20). Statistiškai išsiritimas analizuojamas kaip santykinis dydis kiekviename kartotiniame bandinyje.

Suaugusių žuvų ėminių ėmimas ir vertinamųjų baigčių vertinimas

Veislinių žuvų porų ėminių ėmimas

48. Po 17 bandymo savaitės (t. y. po to, kai sėkmingai įveisiama F2 karta), F1 kartos suaugusios žuvys humaniškai numarinamos ir įvertinamos įvairios vertinamosios baigtys (žr. 1 ir 2 lenteles). Padaromas analinio peleko atvaizdas, kad būtų galima vertinti analinio peleko gumburėlius (žr. 8 priedėlį), ir (arba) uodega nupjaunama iškart po išėinamosios angos ir užfiksuojama, kad būtų galima gumburėlius suskaičiuoti vėliau. Jei norima, galima tuo pat metu paimti ir išsaugoti uodeginio peleko dalį, kad būtų galima patikrinti genetinę lytį (pagal *dmy* geną). Jei reikia, galima paimti audinio ėminį, kad būtų galima pakartoti *dmy* analizę ir patikrinti konkrečios žuvies genetinę lytį. Atveriamas kūno ertmė, kad galėtų įsigerti tinkamas (pvz., Davidson'o) fiksatorius, prieš panardinant visą kūną į fiksavimo tirpalą. Tačiau jei prieš fiksuojant atliekama tinkama permeabilizacija, kūno ertmės atverti nereikia.

Histopatologija

49. Atliekamas kiekvienos žuvies histologinis vertinimas siekiant nustatyti lytinės liaukos audinio patologiją (30); (29). Kaip nurodyta 33 punkte, sisteminis arba kitoks toksikiškumas gali turėti įtakos kitoms mechaninio pobūdžio vertinamosioms baigtims, vertinamoms per šį tyrimą (t. y. VTG, antriniais lytiniais požymiais ir tam tikram histopatologiniam

poveikiui lytinėms liaukoms). Todėl taip pat galima išsamiau įvertinti kepenų ir inkstų histopatologinius pakitimus, kad būtų geriau suprantami bet kokie atsakai, nustatomi tiriant mechanistines vertinamąsias baigtis. Jei neatliekama šių išsamių vertinimų, vis vien reikėtų atkreipti dėmesį į dideles anomalijas, atsitiktinai pastebėtas atliekant histopatologinį vertinimą, ir apie jas pranešti ataskaitoje. Būtų galima pradėti vertinimą „iš viršaus į apačią“ nuo didžiausios dozės bandomosios grupės (palyginti su kontroline grupe) iki tos bandomosios grupės, kuri jokio poveikio nepatyrė, tačiau rekomenduojama remtis histopatologinio tyrimo gairėmis (29). Paprastai visi ėminiai apdorojami / išskrodžiami, o tada juos ištiria patologas. Jei tiriama principu „iš viršaus į apačią“, pažymėtina, kad pagal procedūrą, kuri vadinama „Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices“ (RSCABS; tai yra Rao-Scott'o patikslintas Cochrane-Armitage'o trendo kriterijus pagal „pjūvius“ – angl. *slices*), remiamasi prielaida, kad didinant dozes didėja ir biologinis poveikis (patologija). Taigi, vertinimo galia sumažėja, jei vertinama tik viena didelė dozė, be jokių tarpinių dozių. Jei nebūtina atlikti statistinės analizės siekiant nustatyti, kad didžiausia dozė neturi jokio poveikio, šis metodas gali būti priimtinas. Lytinės liaukos fenotipas taip pat nustatomas atliekant šį vertinimą.

Kiti stebėjimai

50. Pagal MEOGRT metodą pateikiama duomenų, kurie gali būti naudojami (pvz., pagal įrodomosios duomenų galios nustatymo metodą) vienu metu vertinant bent dviejų bendrų tipų nepalankios baigties kelius (angl. *adverse outcome pathways*, AOP), kurių baigtis – reprodukcijos funkcijos sutrikimas: a) endokrininio poveikio kelius, kai sutrikdoma endokrininės sistemos pagumburio, hipofizės ir lytinių liaukų (HPG) ašis, ir b) poveikio kelius, dėl kurių sumažėja išgyvenamumas, augimas (ilgis ir masė) ir reprodukcija dėl toksiškumo ne per endokrininę sistemą. Vertinamosios baigtys, paprastai matuojamos atliekant lėtinio toksiškumo bandymus, tokius kaip viso gyvenimo ciklo bandymas ir ankstyvosios gyvenimo stadijos bandymas, taip pat yra įtrauktos į šį bandymą ir gali būti naudojamos vertinant pavojus, kylančius ir dėl neendokrininių toksinių cheminės medžiagos veikimo būdų, ir dėl endokrininio toksinio poveikio kelių. Per bandymą reikėtų kasdien stebėti gyvūnų elgesį ir užrašyti pastabas dėl bet kokio neįprasto elgesio. Be to, reikėtų užrašyti duomenis apie bet koki gaištamumą ir apskaičiuoti išgyvenamumą iki žuvų skaičiaus sumažinimo (6 ar 7 bandymo savaitę), po šio skaičiaus sumažinimo likusių žuvų išgyvenamumą iki nesuaugusių žuvų ėminių ėmimo (9–10 s. p. a.) ir išgyvenamumą nuo suporavimo iki suaugusių žuvų ėminių ėmimo.

1 lentelė. MEOGRT* bandymo vertinamųjų baigčių apžvalga

Gyvenimo stadija	Vertinamoji baigtis	Karta
------------------	---------------------	-------

Embrionai (2 s. p. a.)	Išsiritimas (% ir laikas iki išsiritimo)	F1, F2
Jaunikliai (4 s. p. a.)	Išgyvenamumas	F1
Nesuaugusios žuvys (9 ar 10 s. p. a.)	Išgyvenamumas	F1
	Augimas (ilgis ir masė)	
	Vitelogeninas (mRNR arba baltymas)	
	Antriniai lytiniai požymiai (analinio peleko gumburėliai)	
	Lyčių santykis pagal išorinius požymius	
	Laikas iki pirmojo neršto	
Suaugusios žuvys (12–14 s. p. a.)	Reprodukcija (vislumas ir vaisingumas)	F0, F1
Suaugusios žuvys (15 s. p. a.)	Išgyvenamumas	F1
	Augimas (ilgis ir masė)	
	Antriniai lytiniai požymiai (analinio peleko gumburėliai)	
	Histopatologija (lytinių liaukų, kepenų, inkstų)	

* Šios vertinamosios baigtys turi būti statistiškai analizuojamos.

TVARKARAŠTIS

51. MEOGRT bandymo tvarkaraštis parodytas 2 lentelėje. Per MEOGRT bandymą 4 savaites bandomąja medžiaga veikiamos F0 kartos suaugusios žuvys ir 15 savaičių – F1 kartos žuvys, o antrosios kartos (F2) veikimo bandomąja medžiaga laikotarpis trunka iki išsiritimo (2 s. p. a.). MEOGRT bandymo metu vykdoma veikla apibendrinta 9 priedėlyje.

2 lentelė. MEOGRT bandymas: veikimo bandomąja medžiaga ir vertinamųjų baigčių matavimo tvarkaraštis.

MEOGRT veikimo bandomąja medžiaga ir vertinamųjų baigčių tvarkaraštis																			
F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																	1	2	
Bandymo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Gyvenimo stadija (sutartinės spalvos)				Embrionai				Lervos				Jaunikliai				Nesuaugusios žuvis		Suaugusios žuvis	
Vertinamosios baigtys																			
Vislumas	F ₀														F ₁				
Vaisingumas	F ₀														F ₁				
Išsiritimas					F ₁														F ₂
Išgyvenamumas						F ₁						F ₁						F ₁	
Augimas				F ₀								F ₁						F ₁	
Vitelogeninas												F ₁							
Antrinė lytis												F ₁						F ₁	
Histopatologija																		F ₁	
Bandymo savaitė	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

- Bandymo planas apima 7 kartotinių bandinių grupes
 - 5 grupės – cheminės medžiagos dozių bandomosios grupės
 - 2 grupės kontroliniams bandiniams (4 grupės, jei naudojamas tirpiklis)
- Grupės vidaus sandara
 - 12 kartotinių bandinių skiriama reprodukcijai, suaugusių žuvų patologijai ir ALP tirti (10–18 sav.)
 - 6 kartotiniai bandiniai skiriami išsiritimui, išgyvenamumui, VTg; taip pat nesuaugusių žuvų ALP ir augimui tirti (1–9 sav.)

ALP – antriniai lytiniai požymiai; sav. – savaitės;
VTG – vitelogeninas.

DUOMENŲ PATEIKIMAS ATASKAITOJE

Statistinė analizė

52. Kadangi nustatoma visų bandymui naudojamų žuvų genotipinė lytis, kiekvienos genotipinės lyties (t. y. XY patinų ir XX patelių) duomenys turėtų būti analizuojami atskirai. Jei to nebus daroma, labai sumažės bet kokios analizės statistinė galia. Statistines duomenų analizes patartina atlikti pagal procedūras, aprašytas EBPO dokumente dėl ekotoksiškumo duomenų statistinės analizės dabartinių metodų (taikymo gairėse) (32). 10 priedėlyje pateikta daugiau rekomendacijų dėl statistinės analizės.

53. Bandymo planas ir statistinių kriterijų pasirinkimas turėtų būti tokie, kad būtų galima pakankamai patikimai nustatyti biologiškai svarbius vertinamųjų baigčių pokyčius, kai

ataskaitoje reikia pateikti NOEC (32). Reikiamų poveikio koncentracijos verčių ir parametrų pateikimas ataskaitose gali priklausyti nuo reglamentavimo sistemos. Turėtų būti nustatytas kiekvienos vertinamosios baigties procentinis pokytis, kurį svarbu aptikti arba apskaičiuoti. Kad tai būtų įmanoma, reikėtų atitinkamai priderinti bandymo planą. Nėra tikėtina, kad visų vertinamųjų baigčių procentinis pokytis būtų toks pats, taip pat nėra tikėtina, kad būtų praktiškai įmanoma suplanuoti tokį bandymą, kuris atitiktų šiuos kriterijus dėl visų vertinamųjų baigčių, todėl svarbu, tinkamai planuojant bandymą, sutelkti dėmesį į tas vertinamąsias baigtis, kurios yra svarbios tam bandymui. 10 priedėlyje pateikta statistinė struktūrinė diagrama ir rekomendacijos, kurios turėtų padėti apdoroti duomenis ir pasirinkti tinkamiausią statistinį kriterijų arba modelį. Galima taikyti ir kitus statistinius metodus, jei jie yra moksliškai pagrįsti.

54. Būtina analizuoti variacijas kiekvienoje kartotinių bandinių grupėje, atliekant dispersinės analizės ar faktorinės analizės lentelės procedūras, ir naudoti pakankamai tinkamą statistinės analizės metodų remiantis šia analize. Kad būtų galima keleriopai palyginti atskirų koncentracijų bandinių ir kontrolinių bandinių rezultatus, rekomenduojama atlikti žingsnio žemyn procedūrą (pvz., taikant Jonckheere-Terpstra kriterijų) tiriant tolydžiuosius atsakus. Kai duomenys neatitinka monotoniško koncentracijos ir atsako priklausomybės ryšio, turėtų būti taikomas Dunnett'o kriterijus arba Dunn'o kriterijus (po tinkamos duomenų transformacijos, jei ji reikalinga).
55. Vislumo tyrimui ikrai skaičiuojami kas dieną, tačiau analizuojamas gali būti bendras ikry skaičius arba pakartotinių skaičiavimų duomenys. 10 priedėlyje išsamiai parodyta, kaip analizuojama ši vertinamoji baigtis. Histopatologiniams duomenims, kurie pateikiami kaip poveikio stiprumo balai, sukurtas naujas statistinis kriterijus, Rao-Scott'o patikslintas Cochran-Armitage'o trendo kriterijus pagal pjūvius (angl. *Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices*, RSCABS) (33).
56. Ataskaitoje reikėtų pranešti apie bet kokias bandomosios cheminės medžiagos paveiktose bandomosiose grupėse nustatytas vertinamąsias baigtis, kurios reikšmingai skiriasi nuo atitinkamų kontrolinių grupių.

Aktualūs duomenų analizės aspektai

Reikalavimų neatitinkančių dozių bandomųjų grupių naudojimas

57. Nustatant, ar kuriame nors kartotiniame bandinyje arba visoje bandomojoje grupėje yra aiškaus toksiškumo požymių ir jų nereikėtų įtraukti į analizę, svarbu atsižvelgti į kelis veiksnius. Aiškus toksiškumas apibrėžiamas kaip >4 gyvūnų žūtys bet kuriame kartotiniame bandinyje nuo 3 s. p. a. iki 9 s. p. a., kurių negalima paaiškinti technine

klaida. Kiti aiškaus toksiškumo požymiai yra kraujavimas, neįprastas elgesys, nenormalūs plaukimo judesiai, nesimaitinimas ir bet kokie kiti klinikiniai ligos požymiai. Dėl nemirtinų toksiškumo požymių gali reikėti atlikti kokybinius vertinimus ir jie visada turėtų būti atliekami lyginant su skiedimo vandens kontroline grupe (kuriai naudotas tik švarus vanduo). Jei nustatomas aiškus toksiškumas didžiausios dozės bandomojoje grupėje arba grupėse, rekomenduojama tų bandomųjų grupių neįtraukti į analizę.

Tirpiklio kontroliniai bandiniai

58. Tirpiklio naudojimas turėtų būti laikomas tik kraštutine priemone, kai jau apsvarstyti visi kiti galimi cheminės medžiagos tiekimo būdai. Jei naudojamas tirpiklis, kartu turėtų būti naudojamas skiedimo vandens kontrolinis bandinys. Baigus bandymą turėtų būti įvertintas galimas tirpiklio poveikis. Tai daroma atliekant tirpiklio kontrolinės grupės ir skiedimo vandens kontrolinės grupės statistinį palyginimą. Svarbiausios vertinamosios baigtys, į kurias reikia atsižvelgti atliekant šią analizę, yra augimo parametrai (masė), nes jie gali būti paveikti bendrojo toksiškumo. Jei nustatoma statistiškai reikšmingų šių vertinamųjų baigčių skirtumų tarp skiedimo vandens ir tirpiklio kontrolinių grupių, reikėtų, vadovaujantis profesine nuovoka, nuspręsti, ar tai kenkia bandymo tinkamumui. Jei abi kontrolinės grupės skiriasi, cheminės medžiagos paveiktas bandomąsias grupes reikėtų palyginti su tirpiklio kontroline grupe, nebent būtų žinoma, kad geriau atlikti palyginimą su skiedimo vandens kontroline grupe. Jei nėra statistiškai reikšmingo skirtumo tarp abiejų kontrolinių grupių, rekomenduojama bandomosios cheminės medžiagos paveiktas bandomąsias grupes palyginti su jungtinėmis (tirpiklio ir skiedimo vandens) kontrolinėmis grupėmis, nebent būtų žinoma, kad geriau būtų lyginti tik su skiedimo vandens ar tik su tirpiklio kontroline grupe.

Bandymo ataskaita

59. Bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga: fizinė būseną ir, jei tinka, fizikinės ir cheminės savybės;

- cheminio identifikavimo duomenys.

Vienkomponentė medžiaga:

- fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos svarbios fizikinės ir cheminės savybės;
- cheminis identifikavimas, toks kaip IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, priemaišų cheminė tapatybė (kai tinka ir jei praktiškai įmanoma) ir kt. (įskaitant bendrosios organinės anglies kiekį, jei tinka).

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

- kuo išsamesnis apibūdinimas: cheminė tapatybė (žr. pirmiau), kiekybinė sudėtis ir svarbios sudedamųjų dalių fizikinės ir cheminės savybės.

Bandomųjų gyvūnų rūšis:

- mokslinis pavadinimas, padermė (jei žinoma), gavimo šaltinis ir apvaisintų ikų surinkimo metodas bei vėlesnis apdorojimas.

Bandymo sąlygos:

- apšvietimo laikotarpis (-iai);
- bandymo planas (pvz., kamerų dydis, medžiaga ir vandens tūris, bandymo kamerų ir kartotinių bandinių skaičius, išsiritusių lervų skaičius kiekviename kartotiniame bandinyje);
- pradinių tirpalų paruošimo metodas ir atnaujinimo dažnumas (reikėtų nurodyti tirpiklį ir jo koncentraciją, kai jis naudojamas);
- bandomosios cheminės medžiagos dozavimo metodas (pvz., siurbiai, skiedimo sistemos);
- regeneravimo našumas pagal šį metodą ir ir nominaliosios bandymui naudojamos koncentracijos vertės, kiekybinio nustatymo riba, išmatuotų verčių vidurkiai ir jų standartiniai nuokrypiai bandymo induose bei metodas, pagal kurį jie nustatyti, taip pat įrodymas, kad tie matavimai parodo bandomosios cheminės medžiagos koncentracijas realiaame tirpale;
- skiedimo vandens savybės: pH, kietumas, temperatūra, ištirpusio deguonies koncentracija, bendras chloro kiekis (jei matuojamas), bendroji organinė anglis (jei matuojama), suspenduotos kietosios dalelės (jei matuojamos), bandymo terpės druskingumas (jei matuojamas) ir bet kokie kiti atlikti matavimai;
- nominaliosios bandomosios medžiagos koncentracijos vertės, išmatuotų verčių vidurkiai ir jų standartiniai nuokrypiai;
- bandymų induose esančio vandens kokybė, pH, kietumas, temperatūra (matuojama kasdien) ir ištirpusio deguonies koncentracija;
- išsami informacija apie šėrimą (pvz., pašarų rūšis, šaltinis, duodamas kiekis ir dažnis).

Rezultatai:

- įrodymai, kad kontroliniai bandiniai atitinka bendruosius tinkamumo patvirtinimo kriterijus;

- šie kontrolinės grupės (ir tirpiklio kontrolinės grupės, kai ji naudojama) duomenys: F1 ir F2 kartų gyvūnų išsiritimas ir laikas iki išsiritimo, F1 išgyvenamumas po išsiritimo, F1 augimas (kūno ilgis ir masė), F1 genotipinė lytis ir lytinė diferenciacija (pvz., antriniai lytiniai požymiai, remiantis analinio peleko gumburėliais ir lytinių liaukų histologija), F1 fenotipinė lytis, F1 antriniai lytiniai požymiai (analinio peleko gumburėliai), F1 *vtg* mRNR (ar VTG baltymas), F1 histopatologinis (lytinių liaukų, kepenų ir inkstų) vertinimas, F0 ir F1 reprodukcija (vislumas ir vaisingumas) (žr. 1 ir 2 lenteles);
 - statistinės analizės metodas (regresinė analizė ar dispersinė analizė) ir duomenų apdorojimas (taikyti statistiniai kriterijai ir modeliai);
 - nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC) vertinant kiekvieną atsaką;
 - mažiausia pastebėto poveikio koncentracija (LOEC) vertinant kiekvieną atsaką (kai $p = 0,05$); kiekvieno vertinto atsako EC_x vertė, jei taikoma, ir pasikliautinieji intervalai (pvz., 90 % ar 95 %), taip pat jos apskaičiavimui naudoto priderinto modelio grafikas, koncentracijos ir atsako priklausomybės kreivės krypties koeficientas, regresijos modelio formulė, įvertinti modelio parametrai ir jų standartinės paklaidos;
 - bet koks nukrypimas nuo šio bandymo metodo ir nukrypimai nuo priimtino kriterijų ir apsvarstytas galimas to poveikis bandymo rezultatui.
60. Teikiant vertinamųjų baigčių matavimų rezultatus turėtų būti pateiktos vidutinės vertės ir jų standartiniai nuokrypiai (jei įmanoma, tiek kartotinio bandinio, tiek koncentracijos vertės pagrindu).

LITERATŪRA

- (1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, *Series on Testing and Assessment* (No. 171), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (1) Padilla S., Cowden J., Hinton D. E., Yuen B., Law S., Kullman S. W., Johnson R., Hardman R. C., Flynn K. and Au D. W. T. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. *Current Protocols in Toxicology* 39: 1-36.
- (2) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. *Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment* (No. 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (3) Benoit D. A., Mattson V. R., Olson D. L. (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 I. J., 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) Nakamaura 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*. Paskelbta <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html>.
- (13) Adolfsson-Erici M., Åkerman G., Jahnke A., Mayer P. and McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. *Chemosphere* 86: 593-599.
- (14) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. *OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment* (No. 23.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (15) Hutchinson T. H., Shillabeer N., Winter M. J. and Pickford D. B. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. *Aquatic Toxicology* 76: 69-92.
- (16) Denny J. S, Spehar R. L, Mead K. E and Yousuff S. C. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.
- (17) Koger C. S., Teh S. J. and Hinton D. E. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Biology of Reproduction* 61: 1287-1293.
- (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) Šio priedo C.15 skyrius. Trumpalaikio toksiškumo žuvims bandymas embriono ir trynio maišelio stadijose.
- (21) Šio priedo C.37 skyrius. 21 dienos trukmės žuvų tyrimas. Trumpalaikis estrogeninio bei androgeninio veikimo ir aromatazės slopinimo atrankos tyrimas.
- (22) Šio priedo C.41 skyrius. Žuvų lytinio vystymosi bandymas.
- (23) Šio priedo C.48 skyrius. Trumpalaikis žuvų reprodukcijos tyrimas.
- (24) Šio priedo C.47 skyrius. Toksiškumo ankstyvųjų gyvenimo stadijų žuvims bandymas.
- (25) Šio priedo C.49 skyrius. Ūmaus toksiškumo žuvų embrionams (FET) bandymas.
- (26) Wheeler J. R., Panter G. H., Weltje L. and Thorpe K. L. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. *Chemosphere* 92: 1067-1076.
- (27) Tatarazako N., Koshio M., Hori H., Morita M. and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50: 301-308.
- (28) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. *Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment* (No. 227). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (29) Nanda I., Hornung U., Kondo M., Schmid M. and Scharl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. *Genetics* 163: 245-251.
- (30) Shinomiya A., Otake H., Togashi K., Hamaguchi S. and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, *Zoological Science* 21: 613-619.
- (31) OECD (2014). *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application* (šio leidinio priedai parengti kaip atskiras dokumentas), OECD Publishing, Paris.

- (32) Green J. W., Springer T. A., Saulnier A. N. and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1108-1116.

1 PRIEDĖLIS

TERMINŲ APIBRĖŽTYS

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

IFA (angl. ELISA) – imunofermentinė analizė.

Vislumas – ikrų skaičius.

Vaisingumas – gyvybingų ikrų skaičius, padalytas iš vislumo vertės.

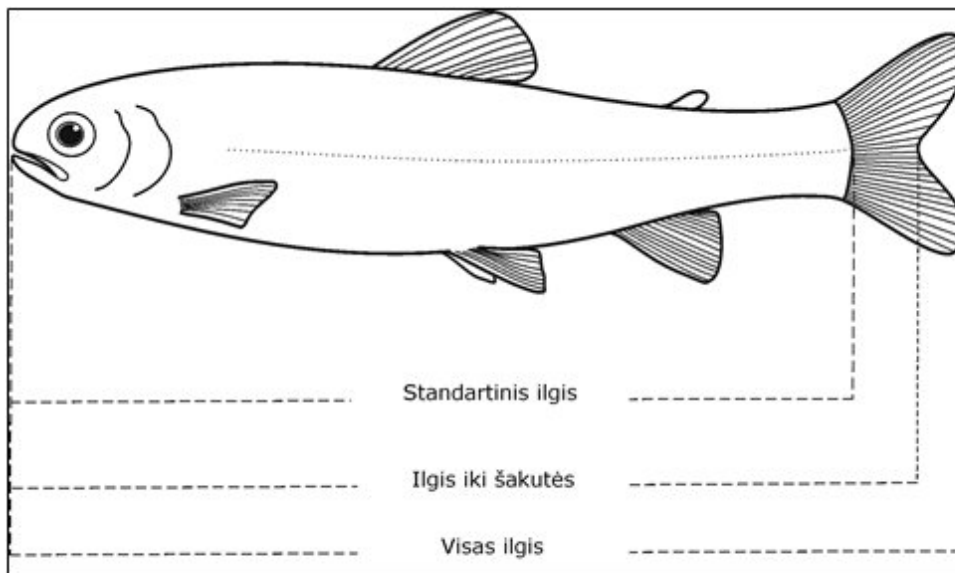
Ilgis iki šakutės (angl. *fork length*, FL) – ilgis nuo snukio galo iki uodeginio peleko vidurinių spindulių galo, naudojamas matuojant žuvis, kurių stuburo pabaigą sunku nustatyti (www.fishbase.org).

Išsiritimas – išsiritusių lervų skaičius, padalytas iš embrionų, įdėtų į inkubatorių, skaičiaus.

IACUC – Institucinis gyvūnų priežiūros ir naudojimo komitetas.

Standartinis ilgis (angl. *standard length*, SL) – žuvies ilgis, išmatuotas nuo snukio galo iki paskutiniojo slankstelio užpakalinio galo arba iki stuburo plokštės mediolateralinės dalies užpakalinio galo. Kitaip tariant, į šį matmenį neįtrauktas uodeginio peleko ilgis (www.fishbase.org).

Visas ilgis (angl. *total length*, TL) – ilgis nuo snukio galo iki uodeginio peleko ilgesnės mentės galo, paprastai matuojamas mentes prispaudus išilgai vidurio linijos. Tai yra tiesinis matmuo, matuojamas ne per kūno išlinkį (www.fishbase.org).



1 diagrama. Įvairių naudojamų ilgio matų apibūdinimas.

EC_x (x % poveikio sukelianti koncentracija) – koncentracija, kuriai esant bandomieji organizmai patiria x % poveikį per tam tikrą veikimo bandomąją medžiagą laikotarpį, palyginti su kontroliniu bandiniu. Pavyzdžiui, EC₅₀ yra koncentracija, kuri, kaip įvertinta, per tam tikrą nustatytą jos ekspozicijos laikotarpį padaro poveikį bandymo vertinamajai baigčiai pusėje (50 %) paveiktos populiacijos.

Pratekamosios srovės bandymas – toks bandymas, kai per bandymo sistemą visu bandomosios medžiagos poveikio laikotarpiu teka nuolatinis bandymo tirpalų srautas.

HPG ašis – pagumburio, hipofizės ir lytinių liaukų ašis.

IUPAC – Tarptautinė teorinės ir taikomosios chemijos sąjunga.

Įkrova – drėgna žuvų masė vandens tūrio vienetu.

Mažiausia pastebėto poveikio koncentracija (LOEC) – mažiausia bandomoji cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant pastebėtas statistiškai reikšmingas jos poveikis (esant $p < 0,05$), palyginti su kontroline grupe. Tačiau visų LOEC viršijančių bandomosios medžiagos koncentracijų kenksmingas poveikis turėtų būti lygus LOEC poveikiui arba už jį didesnis. Kai šios dvi sąlygos netenkinamos, reikėtų išsamiai paaiškinti, kaip pasirinkta LOEC (taigi ir NOEC) vertė. Rekomendacijų dėl to pateikta 5 ir 6 priedėliuose.

Vidutinė mirtina koncentracija (LC₅₀) – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant, kaip įvertinta, per visą bandymą žūsta 50 % bandomųjų organizmų.

Nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC) – bandomosios medžiagos koncentracija, kiek mažesnė už LOEC, kuri, palyginti su kontroline grupe, per nustatytą veikimo laikotarpį nepadarė statistiškai reikšmingo poveikio ($p < 0,05$).

SMILES – supaprastinto molekulių pateikimo linijine forma specifikacija (angl. *Simplified Molecular Input Line Entry Specification*).

Žuvų laikymo tankis – žuvų skaičius vandens tūrio vienetė.

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

UVCB – nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudedamieji reakcijų produktai ar biologinės medžiagos.

VTG – vitelogeninas, fosfolipoglikoproteininis kiaušinio trynio baltymų pirmtakas, kuris paprastai gaminamas visų kiaušinių dedančių gyvūnų rūšių lytiškai aktyvių patelių organizme.

s. p. a. – savaitės po apvaisinimo.

2 PRIEDĖLIS**KAI KURIOS SKIEDIMUI TINKAMO VANDENS CHEMINĖS SAVYBĖS**

Medžiaga	Ribinė koncentracija
Kietosios dalelės	5 mg/l
Bendroji organinė anglis	2 mg/l
Nejonizuotas amoniakas	1 µg/l
Bendras chloro kiekis	10 µg/l
Bendras fosforo organinių pesticidų kiekis	50 ng/l
Bendras chloro organinių pesticidų ir polichlorintųjų bifenilų kiekis	50 ng/l
Bendras organinio chloro kiekis	25 ng/l
Aliuminis	1 µg/l
Arsenas	1 µg/l
Chromas	1 µg/l
Kobaltas	1 µg/l
Varis	1 µg/l
Geležis	1 µg/l
Švinas	1 µg/l
Nikelis	1 µg/l
Cinkas	1 µg/l
Kadmis	100 ng/l
Gyvsidabris	100 ng/l
Sidabras	100 ng/l

3 PRIEDĖLIS**MEOGRT BANDYMO SĄLYGOS**

- | | |
|--|---|
| 1. Rekomenduojama rūšis | Japoninė medaka (<i>Oryzias latipes</i>) |
| 2. Bandymo tipas | Pratekamosios srovės |
| 3. Vandens temperatūra | Nominalioji bandymo temperatūra yra 25 °C. Vidutinė temperatūra per visą bandymą kiekviename inde yra 24–26 °C. |
| 4. Apšvietimo kokybė | Liuminescencinės lempos (plataus spektro ir ~150 liumenų/m ²) (~150 lux)

16 val. šviesos, 8 val. tamsos laikotarpis |
| 6. Įkrova | F0 – po 2 suaugusias žuvis kartotiniame bandinyje; F1 – iš pradžių ne daugiau kaip po 20 ikrų (embrionų) kartotiniame bandinyje, išsiritus sumažinama iki 12 embrionų kartotiniame bandinyje, o vėliau po 2 suaugusias žuvis (XX-XY veislinė pora), 9–10 s. p. a., laikoma kartu reprodukcijos etapui |
| 7. Mažiausias bandymo kameros naudojamasis tūris | 1,8 l (pvz., bandymo kameros dydis 18x9x15 cm) |
| 8. Bandymo tirpalų tūrio keitimas | Visas tūris pakeičiamas ne mažiau kaip 5 kartus per parą, daugiausia iki 16 kartų per parą (arba palaikomas 20 ml/min. srautas) |
| 9. Bandomųjų organizmų amžius | F0: >12 s. p. a., bet rekomenduojama ne daugiau kaip 16 s. p. a. bandymo pradžioje |
| 10. Organizmų skaičius kiekviename kartotiniame bandinyje | F0: 2 žuvis (patino ir patelės pora); F1: ne daugiau kaip 20 žuvų (ikrų) kiekviename kartotiniame bandinyje (gautų iš F0 ir F1 veislinių porų) |
| 11. Bandomųjų grupių skaičius | 5 bandomosios cheminės medžiagos dozių bandomosios grupės ir tinkama kontrolinė grupė arba grupės |
| 12. Kartotinių bandinių skaičius kiekvienoje bandomojoje grupėje | Ne mažiau kaip 6 kartotiniai bandiniai kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos dozės bandomojoje grupėje ir ne mažiau kaip 12 kartotinių bandinių kontrolinėje grupėje ir tirpiklio kontrolinėje grupėje, jei ji naudojama (kartotinių bandinių skaičius padvigubinamas F1 reprodukcijos etape) |
| 13. Bandymui naudojamų organizmų skaičius | Mažiausiai 84 F0 kartos žuvis ir 504 F1 kartos žuvis (jei naudojama tirpiklio kontrolinė grupė, bandymui naudojamos 108 F0 kartos žuvis ir 648 F1 kartos žuvis). Skaičiuojamas vienetas yra individas po |

	eleuteroembriono stadijos.
14. Šėrimo režimas	Žuvys šeriamos sūriavandenėmis krevetėmis <i>Artemia</i> spp. (24 valandų amžiaus nauplijais) iki soties ir, jei reikia, papildomai pirktiniais žuvų pašaro dribsniais (tinkamo šėrimo režimo, kad būtų užtikrintas pakankamas augimas ir vystymasis, taigi sėkminga reprodukcija, pavyzdys pateiktas 6 priedėlyje).
15. Aeravimas	Neaeruojama, nebent ištirpusio deguonies kiekis sumažėtų iki <60 % oro soties vertės.
16. Skiedimo vanduo	Švarus paviršinių telkinių, gręžinio ar regeneruotas vanduo arba vandentiekio vanduo, iš kurio pašalintas chloras.
17. Veikimo bandomąja medžiaga laikotarpis	Preliminariai 19 savaičių (nuo F0 iki F2 išsiritimo)
18. Biologinės vertinamosios baigtys (pirminės)	išsiritimas (F1 ir F2); išgyvenamumas (F1, nuo išsiritimo iki 4 s. p. a. (lervos stadijos pabaigos, jauniklio stadijos pradžios), nuo 4 iki 9 (ar 10) s. p. a. (nuo jauniklio stadijos pradžios iki nesuaugusios žuvies) ir nuo 9 iki 15 s. p. a. (nuo nesuaugusios iki suaugusios žuvies, iki likvidavimo)); augimas (F1, ilgis ir masė 9 ir 15 s. p. a.); antriniai lytiniai požymiai (F1, analinio peleko gumburėliai 9 ir 15 s. p. a.); vitelogeninas (F1, <i>vtg</i> mRNR ar VTG baltymas 15 s. p. a.); fenotipinė lytis (F1, nustatyta per lytinių liaukų histologinį tyrimą 15 s. p. a.); reprodukcija (F0 ir F1, vislumas ir vaisingumas 21 dieną); laikas iki neršto (F1); ir histopatologija (F1, lytinių liaukų, kepenų ir inkstų 15 s. p. a.)
19. Bandymo tinkamumo kriterijai	Vandenyje ištirpęs deguonis sudaro ≥ 60 % oro soties vertės; vidutinė vandens temperatūra 24–26 °C per visą bandymą; sėkminga ≥ 65 % patelių reprodukcija kontrolinėje (-ėse) grupėje (-ėse); vidutinis vislumas ≥ 20 ikrų per dieną kontrolinėje (-ėse) grupėje (-ėse); išsiritimas ≥ 80 % (vidutinis) kontrolinėse grupėse (ir F1, ir F2 kartos); išgyvenamumas po išsiritimo iki 3 s. p. a. ≥ 80 % (vidutinis) ir nuo 3 s. p. a. iki tos kartos likvidavimo ≥ 90 % (vidutinis) kontrolinėse grupėse (F1); bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos tirpale turėtų būti tinkamai palaikomos ± 20 % vidutinių išmatuotų verčių tikslumu.

4 priedėlis

REKOMENDACIJOS DĖL ĮPRASTŲ KONTROLINIŲ VERČIŲ

Reikėtų pažymėti, kad šios kontrolinės vertės nustatytos remiantis tik keliais tinkamumo patvirtinimo tyrimais ir gali būti keičiamos, atsižvelgiant į tolesnę patirtį.

Augimas

Išmatuojami visų žuvų, paimtų ėminiams 9 (ar 10) ir 15 savaitę po apvaisinimo (s. p. a.), ilgis ir masė. Pagal šį protokolą turėtų būti gauta tokia šlapio kūno masė: 9 s. p. a. patinų 85–145 mg, patelių 95–150 mg. 15 s. p. a. patinų masė turėtų būti 250–330 mg, patelių 280–350 mg. Nors pavienės žuvys gali nemažai nukrypti nuo šių intervalų, jei vidutinė kontrolinių žuvų masė labai nuo jų nutolę, ypač jei ji būtų mažesnė, tai reikštų, kad yra problemų, susijusių su šėrimu, temperatūros kontrole, vandens kokybe, ligomis arba keliais iš šių veiksnių.

Išsiritimas

Išsiritimo sėkmė kontrolinėse grupėse paprastai yra apie 90 %, tačiau neretai šios vertės yra mažesnės, net apie 80 %. Jei išsiritimo sėkmė mažesnė nei 75 %, tai gali reikšti, kad besivystantys ikrai nepakankamai judinami ar nepakankamai atsargiai tvarkomi, pavyzdžiui, laiku nepašalinus negyvų ikrų gali įsiveisti grybelinė infekcija.

Išgyvenamumas

Išgyvenamumo lygis nuo išsiritimo iki 3 s. p. a. ir po 3 s. p. a. kontrolinėse grupėse paprastai yra 90 % arba didesnis, tačiau net kai išgyvenamumas ankstyvose gyvenimo stadijose yra mažesnis ir siekia 80 %, tai dar nėra priežastis nerimauti. Jei išgyvenimo lygis kontrolinėse grupėse yra mažesnis nei 80 %, vertėtų dėl to susirūpinti – tai gali reikšti, kad akvariumai nepakankamai valomi, todėl žuvų lervos žūsta dėl ligų ar uždūsta dėl per mažo vandenyje ištirpusio deguonies kiekio. Gaištamumas gali padidėti ir dėl sužalojimų, patiriamų, kai valomi indai, ir dėl žuvų lervų įtraukimo į indo vandens nuleidimo sistemą.

Vitelogenino genas

Nors absoliutieji *vitelogenino* (*vlg*) geno kiekiai, išreiškiami kaip jo kopijos/ng iš visos mRNR, gali būti įvairiose laboratorijose nustatomi labai skirtingi dėl jose naudojamų procedūrų arba instrumentų, santykinis *vlg* kiekis kontrolinių patelių organizme turėtų būti apie 200 kartų didesnis nei kontrolinių patinų. Neretai šis santykis yra net 1 000–2 000, tačiau mažesnis nei 200 santykis yra abejotinas ir gali reikšti, kad yra problemų dėl ėminių užteršimo ar dėl atliekamos procedūros ir (arba) naudojamų reagentų.

Antriniai lytiniai požymiai

Patinų antrinių lytinių požymių, apibrėžiamų kaip bendras analinio peleko gumburėlių segmentų peleko spinduliuose skaičius, normalus intervalas yra 40–80 segmentų 9–10 s. p. a. Iki 15 s. p. a. šis intervalas (kontrolinių patinų) turėtų pasiekti apie 80–120, o kontrolinių patelių – 0. Dėl neaiškių priežasčių retais atvejais kai kurie patinai dar neturi gumburėlių iki 9 s. p. a., bet kadangi visų kontrolinių patinų peleko gumburėliai išauga iki 15 s. p. a., taip tikriausiai yra dėl pavėluoto vystymosi. Kai peleko gumburėlių turi kontrolinės patelės, tai reiškia, kad toje populiacijoje yra XX patinų.

XX patinai

Normalus bendras XX patinų buvimo dažnis auginamų žuvų kultūroje, atrodo, yra apie 4 % arba mažesnis esant 25 °C temperatūrai; temperatūrai didėjant tokių atvejų dažnėja. Reikėtų imtis priemonių, kad XX patinų dalis populiacijoje būtų minimali. Kadangi atrodo, jog XX patinų buvimas turi genetinį komponentą, taigi yra paveldimas, jų dažnį populiacijoje galima veiksmingai sumažinti stebint pradinę žuvų kultūrą ir užtikrinant, kad jos dauginimui nebūtų naudojami XX patinai.

Neršto eiga

Prieš atliekant vislumo vertinimą turėtų būti kiekvieną dieną stebima neršto eiga kontroliniuose kartotiniuose bandiniuose. Kontrolines poras galima kokybiškai įvertinti apžiūrint, ar nėra požymių, kad vyksta nerštas. Iki 12–14 s. p. a. turėtų pradėti neršti dauguma kontrolinių porų. Jei iki šio laiko pradėjusių neršti porų yra nedaug, tai reiškia, kad gali būti problemų, susijusių su žuvų sveikata, branda ar gerove.

Vislumas

Sveikos, gerai šeriamos 12–14 s. p. a. medakos paprastai neršia kasdien, apie 15–50 ikrų per dieną. 16 iš rekomenduojamų 24 kontrolinių veislinių porų (>65 %) ikrų dėjimas turėtų būti daugiau kaip 20 ikrų vienai porai per dieną ir gali siekti net apie 40 ikrų per dieną. Mažesnis skaičius gali reikšti, kad veislinės poros yra nesubrendusios, nepakankamai gerai šeriamos ar ligotos.

Vaisingumas

Kontrolinių neršiančių porų apvaisintų ikrų procentinė dalis paprastai yra apie 90 %, o neretai net iki 95 % ar didesnė. Kai kontrolinių porų ikrų apvaisinimas yra mažesnis nei 80 %, tai yra įtartina ir gali reikšti, kad tie individai yra nesveiki arba jų auginimo sąlygos nėra idealios.

5 priedėlis

ŠĖRIMO REŽIMO PAVYZDYS

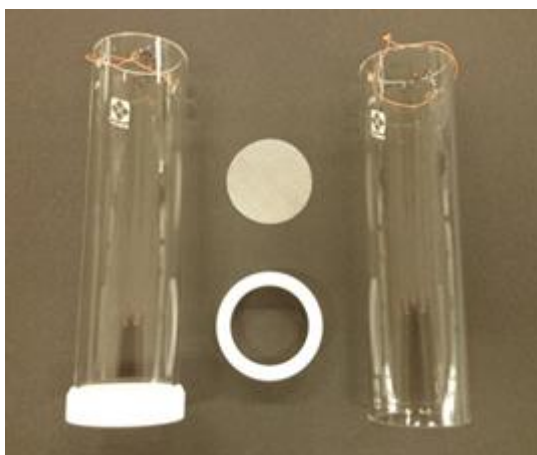
Tinkamo šėrimo režimo, kad būtų užtikrintas pakankamas augimas ir vystymasis, taigi sėkminga reprodukcija, pavyzdys pateiktas 1 lentelėje. Nukrypimai nuo šio šėrimo režimo gali būti priimtini, tačiau patartina tuos pakeitimus išbandyti ir įsitikinti, kad palaikomas tinkamas augimas ir dauginimasis. Siekiant laikytis siūlomo šėrimo režimo reikia prieš pradedant bandymą nustatyti sausą sūriavandenių krevečių masę viename sūriavandenių krevečių suspensijos tūrio vienetė. Tai galima nustatyti pasveriant iš tam tikro sūriavandenių krevečių suspensijos tūrio vieneto gautą sausą masę, 24 valandas džiovintą 60 °C temperatūroje, iš anksto pasvertose lėkštelėse. Siekiant atsižvelgti į suspensijoje esančių druskų masę, tokį patį to paties druskos tirpalo, kuris naudojamas krevečių suspensijai, tūrio vienetai taip pat reikėtų išdžiovinti, pasverti ir jo masę atimti iš išdžiovintos sūriavandenių krevečių suspensijos masės, arba sūriavandenės krevetės galima nukošti ir nuplauti distiliuotu vandeniu prieš išdžiovinant, kad nereikėtų papildomai sverti vien druskos ėminio. Ši informacija naudojama perskaičiuojant lentelėje pateiktą informaciją iš sausos sūriavandenių krevečių masės į sūriavandenių krevečių suspensijos, kuri bus naudojama kiekvienai žuviai šerti, tūrį. Be to, rekomenduojama kartą per savaitę pasverti sūriavandenių krevečių suspensijos alikvotines dalis ir įsitikinti, kad žuvims šerti naudojamas reikiamas sūriavandenių krevečių sausos masės kiekis.

1 lentelė. Šėrimo režimo pavyzdys

Laikas (po išsiritimo)	Sūriavandenės krevetės (sausos masės mg 1 žuviai per dieną)
1 diena	0,5
2 diena	0,5
3 diena	0,6
4 diena	0,7
5 diena	0,8
6 diena	1,0
7 diena	1,3
8 diena	1,7
9 diena	2,2
10 diena	2,8
11 diena	3,5
12 diena	4,2
13 diena	4,5
14 diena	4,8
15 diena	5,2
16–21 dienos	5,6
4 savaitė	7,7
5 savaitė	9,0
6 savaitė	11,0
7 savaitė	13,5
8 savaitė – iki numarinimo	22,5

6 priedėlis**IKRŲ INKUBAVIMO KAMEROS PAVYZDŽIAI****A pavyzdys**

Šis inkubatorius sudarytas iš nupjauto stiklinio centrifugavimo mėgintuvėlio, prijungto nerūdijančio plieno mova ir pritvirtinto užsukamuoju centrifugos kamščeliu. Per šį kamštelį į vidų įkištas mažas stiklinis arba nerūdijančio plieno vamzdelis, siekiantis arti išgaubto dugno; per jį nesmarkiai pučiami oro burbulai, taip suspenduojant ikrus ir sumažinant saprofitinių grybinių infekcijų perdavimą tarp ikrų, o kartu palengvinant cheminių medžiagų apykaitą tarp inkubatoriaus ir indo, kuriame jis laikomas.

B pavyzdys

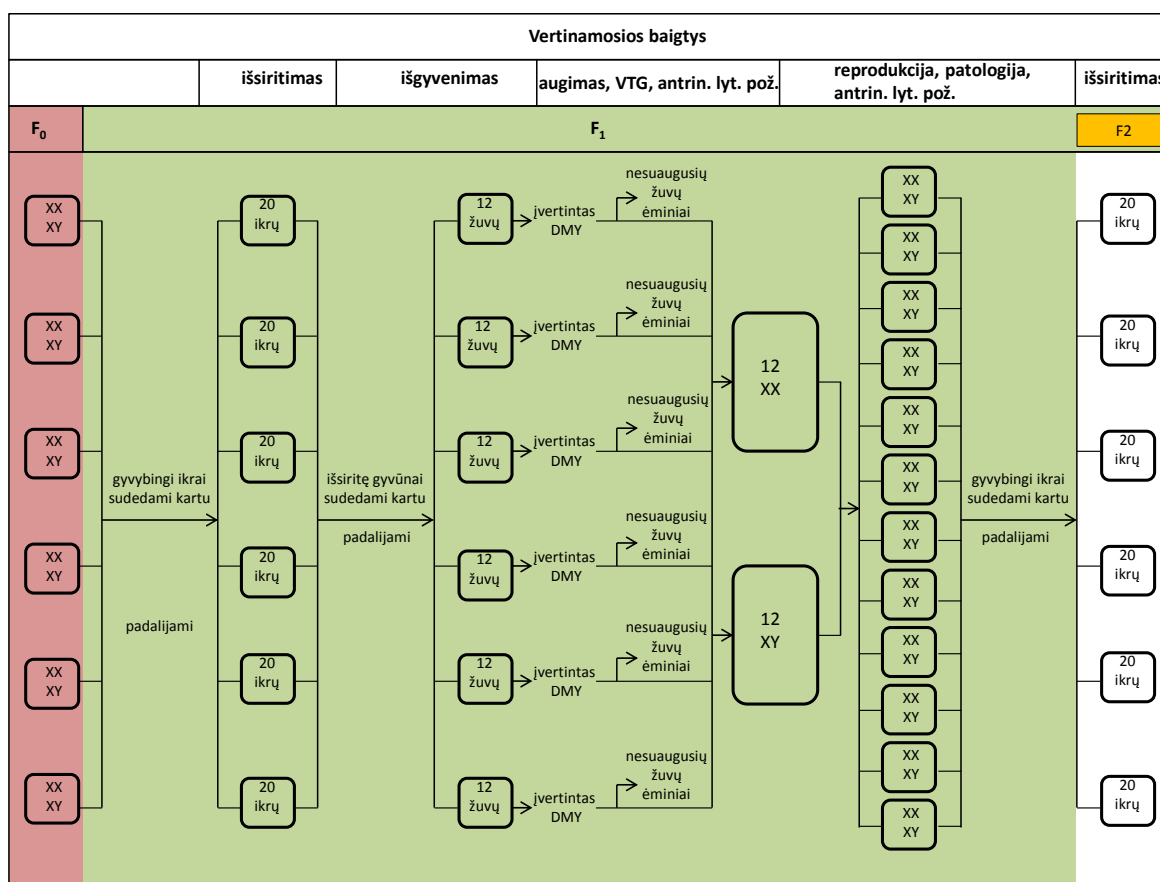


Šis inkubatorius sudarytas iš stiklinio cilindro (5 cm skersmens ir 10 cm aukščio) ir nerūdijančio plieno tinklelio (0,25 ϕ ir 32 dydžio tinklelis), kuris pritvirtinamas prie cilindro dugno PTFE žiedu. Inkubatoriai su medakų ikras pakabinami ant laikančiosios sijos, įleidžiami į indus ir vertikalčiai purtomi (apie 5 cm amplitudė) tinkamu ciklu (maždaug kas 4 sekundes).

7 priedėlis

KARTOTINIŲ BANDINIŲ SUJUNGIMO IR SUDARYMO SCHEMA PAGAL MEOGRT BANDYMO METODĄ

1 diagrama. Kartotinių bandinių sujungimas ir pakartotinis sudarymas atliekant MEOGRT bandymą. Šioje diagramoje parodyta viena bandomoji grupė arba ½ kontrolinės grupės. Kadangi kartotiniai bandiniai sujungiami, juose esantys gyvūnai nėra nuolat identifikuojami per visą bandymą. Atminkite, kad „ikrais“ vadinami gyvybingi, apvaisinti ikrai (lygiaverčiai embrionams).



Bandomųjų grupių ir kartotinių bandinių paruošimas

Pagal šį bandymo metodą rekomenduojama sudaryti penkių bandomosios cheminės medžiagos dozių bandomąsias grupes naudojant techniškai gryną medžiagą ir neigiamą kontrolinį bandinį. Kartotinių bandinių skaičius kiekvienoje bandomojoje grupėje per visą MEOGRT bandymą nėra pastovus, o kartotinių bandinių skaičius kontrolinėje grupėje yra dukart didesnis nei bet kurioje atskiroje bandomosios cheminės medžiagos bandomojoje grupėje. F₀ kartos žuvų kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos dozės bandomojoje grupėje yra šeši kartotiniai bandiniai, o neigiamoje kontrolinėje grupėje yra 12 kartotinių

bandinių. Naudoti tirpiklių labai nerekomenduojama, o jeigu jie vis dėlto naudojami, ir tirpiklio naudojimą, ir jo pasirinkimą reikėtų pagrįsti MEOGRT ataskaitoje. Be to, jei naudojamas tirpiklis, reikalingi dviejų tipų kontroliniai bandiniai: a) tirpiklio kontrolinis bandinys ir b) neigiamas kontrolinis bandinys. Kiekvienoje iš šių dviejų kontrolinių grupių turėtų būti visas kartotinių bandinių komplektas visuose etapuose pagal MEOGRT bandymo tvarkaraštį. Per visą F1 kartos bandomųjų organizmų vystymosi procesą (ir F2 kartos, iki išsiritimo) ši kartotinių bandinių struktūra tebėra tokia pati. Tačiau suaugusių gyvūnų etape, kai sudaromos F1 veislinės poros, reprodukcinių porų kartotinių bandinių skaičių kiekvienoje bandomojoje grupėje geriausia padvigubinti; taigi yra iki 12 kartotinių porų kiekvienoje bandomosios cheminės medžiagos bandomojoje grupėje ir 24 kartotinės poros kontrolinėje grupėje (ir dar 24 kartotinės poros tirpiklio kontrolinėje grupėje, jei reikia). Išsiritimas iš F1 porų išnerštų embrionų nustatomas esant tai pačiai kartotinių bandinių struktūrai kaip ir dėl F0 porų išnerštų embrionų – tai reiškia, kad iš pradžių yra šeši kartotiniai bandiniai kiekvienoje bandomosios cheminės medžiagos bandomojoje grupėje ir 12 kartotinių bandinių kontrolinėje grupėje arba grupėse.

8 priedėlis

ANALINIO PELEKO GUMBURĖLIŲ SKAIČIAVIMAS

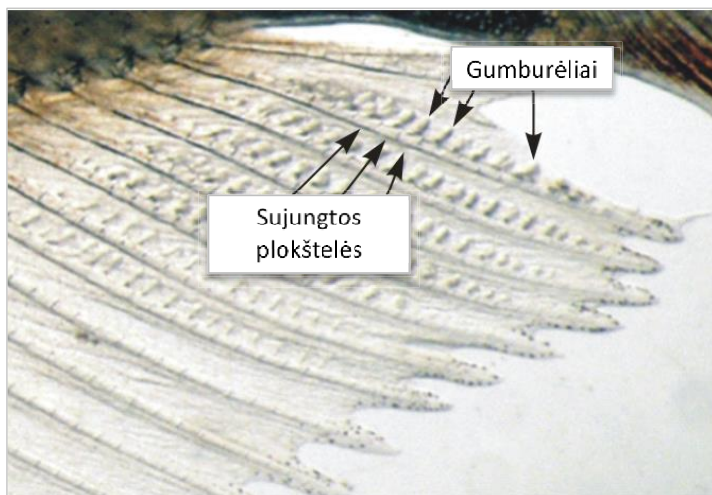
Svarbiausios medžiagos ir reagentai

- Stereomikroskopas (gali būti su prijungtu fotoaparatu);
- fiksatorius, pvz., Davidson'o (Bouin'o fiksatoriaus naudoti nerekomenduojama), jei gumburėliai skaičiuojami ne iš nuotraukos.

Procedūros

Po skrodimo reikėtų padaryti analinio peleko atvaizdą, kad būtų galima patogiai suskaičiuoti analinio peleko gumburėlius. Nors rekomenduojamas metodas yra fotografavimas, analinį peleką galima užfiksuoti maždaug 1 minutę palaikant Davidson'o fiksatoriuje ar kitame tinkamame fiksavimo tirpale. Svarbu fiksuojamą analinį peleką laikyti paplokščią, kad būtų lengviau suskaičiuoti gumburėlius. Žuvies skerdeną su analiniu peleku galima laikyti Davidson'o fiksatoriuje ar kitame tinkamame fiksavimo tirpale iki analizės. Suskaičiuojamas sujungtų plokštelių (žr. **1 diagramą**) su gumburėliais, kyšančiais iš sujungtos plokštelės užpakalinės briaunos, skaičius.

1 diagrama. Analinio peleko gumburėliai



9 priedėlis

IŠSAMUS MEOGRT BANDYMO TVARKARAŠTIS

1–3 bandymo savaitės (F0)

F0 kartos neršiančios žuvys, atitinkančios atrankos kriterijus (žr. 16–20 punktus), tris savaites veikiamos bandomąja chemine medžiaga, kad per tą laiką ji paveiktų besivystančias gametas ir lytinių liaukų audinius. Kiekviename kartotinio bandinio inde laikoma viena veislinių žuvų pora (veislinę porą sudaro XX patelė ir XY patinas). Išneršti ikrai renkami, skaičiuojami ir vaisingumas vertinamas 21 dieną iš eilės, pradedant nuo 1 bandymo dienos.

4 bandymo savaitė (F0 ir F1)

Patartina apvaisintus ir gyvybingus ikrus (embrionus) surinkti per vieną dieną, tačiau jei embrionų nepakanka, galima embrionus surinkti per dvi dienas. Jei embrionai surenkami per dvi dienas, visi per pirmąją dieną surinkti embrionai atitinkamose bandomosiose grupėse sudedami kartu su tais, kurie surinkti antrąją dieną. Tada visi kartu sudėti embrionai kiekvienoje bandomojoje grupėje atsitiktine tvarka paskirstomi į kiekvieną iš kartotinių bandinių inkubatorių, po 20 embrionų į kiekvieną inkubatorių. Apvaisintų ikų (embrionų) žūstamumas tikrinamas ir užrašomas kiekvieną dieną. Negyvi ikrai šalinami iš inkubatorių (apvaisintų ikų žūtį, ypač ankstyvose vystymosi stadijose, galima nustatyti iš pastebimai sumažėjusio skaidrumo ir pakitusios spalvos dėl baltymų koaguliacijos ir (arba) nusėdimo, kai atsiranda baltas matinis atspalvis; OECD (210)).

Pastaba. Jei vienos bandomosios grupės ikrus reikia rinkti ir antrą dieną, tuomet visų bandomųjų grupių (įskaitant kontrolines grupes) ikrai turi būti renkami pagal šią procedūrą. Jei po antrosios rinkimo dienos kurioje nors bandomojoje grupėje yra surinkta nepakankamai embrionų, kad būtų galima įdėti po 20 embrionų į kiekvieną inkubatorių, toje konkrečioje bandomojoje grupėje embrionų skaičius sumažinamas iki 15 embrionų, dedamų į kiekvieną inkubatorių. Jei nepakanka embrionų, kad būtų galima įdėti po 15 embrionų į kiekvieną inkubatorių, kartotinių inkubatorių skaičių reikia sumažinti tiek, kad embrionų būtų pakankamai ir būtų galima dėti po 15 iš jų į kiekvieną inkubatorių. Papildomai galima įtraukti ir daugiau F0 kartos veislinių porų į kiekvieną bandomąją grupę ir kontrolines grupes, kad būtų gauta daugiau ikų, siekiant surinkti rekomenduojamą skaičių – po 20 ikų kiekviename kartotiniame bandinyje.

24 bandymo dieną F0 veislinių porų žuvys humaniškai numarinamos ir užrašomi jų masės ir ilgio duomenys. Jei reikia, F0 veislės poras galima laikyti papildomas 1–2 dienas, kad būtų galima iš naujo įveisti F1 kartą.

5–6 bandymo savaitės (F1)

Likus vienai arba dviem dienoms iki numatomo išsiritimo pradžios, sustabdykite arba

sumažinkite inkubuojamų ikrų judinimą, kad paspartintumėte išsiritimą. Kadangi embrionai ritasi kiekvieną dieną, išsiritusios lervos sudedamos kartu kiekvienoje bandomojoje grupėje ir sistemingai paskirstomos į kiekvieną kartotinį konkrečios bandomosios grupės lervų laikymo indą, kuriame turi būti ne daugiau kaip 12 išsiritusių lervų. Tai daroma atsitiktine tvarka išrenkant išsiritusias lervas ir dedant po vieną lervą paeiliui į kartotinius bandinius vieną po kito, jų nesirenkant, eilės tvarka pripildant konkrečios bandomosios grupės kartotinius bandinius, kad visuose tos bandomosios grupės kartotiniuose bandiniuose būtų po 12 išsiritusių lervų. Jei išsiritusių lervų nepakanka visiems kartotiniams bandiniams pripildyti, reikia užtikrinti, kad pradedant F1 etapą būtų kuo daugiau kartotinių bandinių, kuriuose būtų po 12 išsiritusių lervų.

Ikrai, iš kurių dar nėra išsiritusios lervos per dukart ilgesnį laiką negu iki vidutinės (medianinės) kontrolinės išsiritimo dienos, laikomi negyvybingais ir pašalinami. Išsiritusių lervų skaičius užrašomas ir apskaičiuojama išsiritimo sėkmė (išsiritimas) kiekviename kartotiniame bandinyje.

7–11 bandymo savaitės (F1)

Žuvų lervų išgyvenimas visuose kartotiniuose bandiniuose kiekvieną dieną tikrinamas ir užrašomas. 43 bandymo dieną užrašomas kiekviename kartotiniame bandinyje išgyvenusių žuvų skaičius, taip pat pradinis į kartotinį bandinį įdėtų išsiritusių lervų skaičius (nominalusis skaičius 12). Taip galima apskaičiuoti procentinį išgyvenamumą nuo išsiritimo iki nesuaugusių žuvų stadijos.

Bandymo savaitės (F1)

78–85 bandymo dienomis paimamas nedidelis ėminys iš kiekvienos žuvies uodeginio peleko, kad būtų galima nustatyti kiekvienos žuvies genotipinę lytį (t. y. iš pelekų nuokarpų). Ši informacija naudojama sudarant veislines poras.

Per tris dienas po to, kai nustatoma kiekvienos žuvies genotipinė lytis, atsitiktine tvarka sudaroma 12 veislinių porų kiekvienoje bandomojoje grupėje ir 24 poros kiekvienoje kontrolinėje grupėje. Atsitiktine tvarka išrenkama po dvi XX ir XY žuvis iš kiekvieno kartotinio bandinio, tada jos sudedamos kartu pagal lytį ir iš jų atsitiktinės atrankos būdu sudaroma veislinė pora (t. y. XX-XY pora). Sudaroma ne mažiau kaip 12 kartotinių bandinių kiekvienos cheminės medžiagos dozės bandomojoje grupėje ir ne mažiau kaip 24 kartotiniai bandiniai kontrolinėje grupėje; kiekviename kartotiniame bandinyje yra viena veislinė pora. Jei kartotiniame bandinyje nėra dviejų XX ar dviejų XY žuvų, kurias būtų galima sudėti kartu, tuomet atitinkamos lyties genotipo žuvis reikėtų gauti iš kitų tos bandomosios grupės kartotinių bandinių.

Likusios žuvys (daugiausia 8 žuvys iš kiekvieno kartotinio bandinio) humaniškai numarinamos ir paimami ėminiai įvairioms nesuaugusių žuvų vertinamosioms baigtims tirti. Visų nesuaugusių žuvų ėminių geno *dmy* duomenys (XX ar XY) saugomi, siekiant

užtikrinti, kad visus vertinamųjų baigčių duomenis būtų galima susieti su kiekvienos konkrečios žuvies genetinė lytimi.

13–14 bandymo savaitės (F1)

Veikimas bandomąja medžiaga tęsiamas, kol nesuaugusių žuvų veislinės poros tampa suaugusiomis žuvimis. 98 bandymo dieną (t. y. vieną dieną prieš pradėdant rinkti ikrus) iš akvariumų pašalinami ir nuo patelių nuimami visi ikrų.

15–17 bandymo savaitės (F1)

Išneršti ikrų kasdien renkami 21 dieną iš eilės kiekviename kartotiniame bandinyje, vertinamas vislumas ir vaisingumas.

18 bandymo savaitė (kartojama ta pati procedūra kaip ir 4 bandymo savaitę) (F1 ir F2)

120 bandymo dieną, ryte, surenkami ikrų iš kiekvieno kartotinio bandinio indo. Surinkti ikrų įvertinami ir apvaisinti kiekvienos veislinės poros ikrų (pašalinus juos jungiančias gijas) sudedami kartu kiekvienoje bandomojoje grupėje ir sistemingai paskirstomi į ikrų inkubavimo kameras – po 20 apvaisintų ikrų kiekviename inkubatoriuje. Inkubatorius galima sudėti į atskirus inkubatorių laikymo indus, paruoštus kiekvienai bandomajai grupei, arba į kartotinio bandinio indą, kuriame po išsiritimo bus laikomos išsiritusios lervos. Patartina, kad embrionai būtų surinkti per vieną dieną; tačiau jei embrionų nepakanka, embrionus galima surinkti per dvi dienas. Jei embrionai surenkami per dvi dienas, visi per pirmąją dieną surinkti embrionai atitinkamose bandomosiose grupėse sudedami kartu su tais, kurie surinkti antrąją dieną. Tada visi kartu sudėti embrionai kiekvienoje bandomojoje grupėje atsitiktine tvarka paskirstomi į kiekvieną iš kartotinių bandinių inkubatorių, po 20 embrionų į kiekvieną inkubatorių. Pastaba. Jei vienos bandomosios grupės ikrus reikia rinkti ir antrą dieną, tuomet visų bandomųjų grupių (įskaitant kontrolines grupes) ikrų turi būti renkami pagal šią procedūrą. Jei po antrosios rinkimo dienos kurioje nors bandomojoje grupėje yra surinkta nepakankamai embrionų, kad būtų galima įdėti po 20 embrionų į kiekvieną inkubatorių, toje konkrečioje bandomojoje grupėje embrionų skaičius sumažinamas iki 15 embrionų, dedamų į kiekvieną inkubatorių. Jei nepakanka embrionų, kad būtų galima įdėti po 15 embrionų į kiekvieną inkubatorių, kartotinių inkubatorių skaičių reikia sumažinti tiek, kad embrionų būtų pakankamai ir būtų galima dėti po 15 iš jų į kiekvieną inkubatorių.

121 bandymo dieną (arba 122 bandymo dieną, siekiant įsitikinti, kad sėkmingai įveista F2 karta), F1 veislinės poros humaniškai numarinamos ir analizuojamos tiriant suaugusių žuvų vertinamąsias baigtis. Jei reikia, F1 veislinės poras galima laikyti papildomas 1–2 dienas, kad būtų galima iš naujo įveisti F2 kartą.

19–20 bandymo savaitės (F2)

Likus vienai arba dviem dienoms iki numatomo išsiritimo pradžios, sustabdykite arba sumažinkite inkubuojamų ikrų judinimą, kad paspartintumėte išsiritimą. Jei bandymas baigiamas tada, kai baigia išsiristi F2 karta, kiekvieną dieną išsiritusios lervos suskaičiuojamos ir pašalinamos (embrionai, kurie neišsirita per pratęstą inkubavimo laikotarpį, skaičiuojama kaip dukart ilgesnė trukmė negu iki vidutinės (medianinės) išsiritimo kontrolės dienos, laikomi negyvybingais).

10 priedėlis

STATISTINĖ ANALIZĖ

Per MEOGRT bandymą gaunami tokio pobūdžio biologiniai duomenys, kurie yra būdingi ne vien šiam bandymui, ir yra sukurta daug tinkamų statistinių metodikų, pagal kurias galima tinkamai analizuoti panašius duomenis (išskyrus patologijų duomenis), priklausomai nuo tų duomenų savybių, įskaitant normalumą, dispersijos vienalytiškumą, ar pats tyrimo planas yra palankus hipotezės tikrinimui arba regresinei analizei, ar taikytini parametriniai, ar neparametriniai kriterijai, ir kt. Pagal bendrą principą siūlomos statistinės analizės atitinka EBPO rekomendacijas dėl ekotoksiškumo duomenų (EBPO, 2006), o 2 diagramoje pateikta MEOGRT duomenų analizės sprendimų priėmimo schema.

Daroma prielaida, kad dažniausiai duomenų rinkiniuose bus gaunami monotoniški atsakai. Papildomai reikėtų apsvarstyti klausimą, ar taikyti vienpusį statistinį kriterijų, ar dvipusį statistinį kriterijų. Jei nėra biologinių priežasčių, dėl kurių vienpusis kriterijus būtų netinkamas, siūloma taikyti vienpusius kriterijus. Nors tolesniame skirsnyje rekomenduojami tam tikri statistiniai kriterijai, jei būtų sukurta tinkamesnių ir (arba) didesnės galios statistinių metodų, taikytinų konkrečioms per MEOGRT bandymą gautiems duomenims, tie statistiniai kriterijai būtų naudojami, siekiant pasinaudoti tais pranašumais.

MEOGRT duomenys turėtų būti analizuojami atskirai pagal genotipinę lytį. Lytį pakeitusių žuvų (XX patinų arba XY patelių) duomenis galima analizuoti pagal dvi strategijas: 1) atmesti visus lytį pakeitusių žuvų duomenis per visą bandymą, išskyrus duomenis apie lyties pakeitimo paplitimą kiekviename kartotiniame bandinyje; 2) palikti visų lytį pakeitusių žuvų duomenis duomenų rinkinyje ir analizuoti pagal genotipą.

Histopatologiniai duomenys

Histopatologiniai duomenys ataskaitoje pateikiami kaip poveikio stiprumo balai, kurie vertinami pagal naujai sukurta statistinę procedūrą, vadinamą „Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices“ (RSCABS; tai yra Rao-Scott'o patikslintas Cochrane-Armitage'o trendo kriterijus pagal „pjūvius“ – angl. *slices*) (Green *et al.*, 2014). Pagal šią Rao-Scott'o pataisą išlaikoma informacija apie kartotinius bandinius; atliekant procedūrą pagal „pjūvius“ įtraukiama biologinė tikimybė, kad didėjant bandomosios medžiagos koncentracijoms, poveikio stiprumo balai paprastai didėja. Dėl kiekvienos diagnozės gautas RSCABS rezultatas parodo, kuriose bandomosiose grupėse patologija yra labiau paplitusi negu kontrolinėse grupėse, ir susijęs poveikio stiprumo lygis.

Vislumo duomenys

Vislumo duomenų analizės atliekamos pagal žingsnio žemyn Jonckheere-Terpstra arba Williams'o kriterijų nustatant dozės poveikį, jei duomenys atitinka monotonišką koncentracijos ir atsako priklausomybės ryšį. Taikant žingsnio žemyn kriterijų, visi

palyginimai atliekami esant 0,05 reikšmingumo lygiui ir nekoreguojant dėl palyginimų skaičiaus. Duomenys turėtų atitikti monotonišką koncentracijos ir atsako priklausomybės ryšį, tačiau galima tai patikrinti, vizualiai patikrinant duomenis arba sudarant bandomųjų grupių vidurkių tiesinius ir kvadratinis kontrastus po duomenų rangų transformacijos. Jei nėra taip, kad kvadratinis kontrastas yra reikšmingas, o tiesinis kontrastas – nereikšmingas, taikomas trendo kriterijus. Kitu atveju naudojamas Dunnett'o kriterijus nustatant dozės poveikį, jei duomenys yra normaliai pasiskirstę ir jų dispersijos vienalytės. Jei tie reikalavimai netenkinami, taikomas Dunn'o kriterijus su Bonferonni-Holm'o pataisa. Visi nurodyti kriterijai taikomi nepriklausomai nuo bet kokio bendrai taikomo F kriterijaus ar Kruskal-Wallis'o kriterijaus. Daugiau informacijos pateikta OECD (2006).

Ikrų skaičiavimui galima naudoti alternatyvius metodus, tokius kaip apibendrintasis tiesinis modelis su Poisson'o paklaidomis (be transformacijos), jei tai statistiškai pagrįsta (Cameron ir Trividi, 2013). Jei naudojamas alternatyvus metodas, patartina pasikonsultuoti su statistikos specialistais.

Kasdienis vienos kartos ikrų skaičiavimas

ANOVA modelis yra išreiškiamas formule $Y = \text{Laikas} * \text{Laikas} + \text{Dozė} + * \text{Dozė} + \text{Laikas} * \text{Dozė} + * \text{Laikas} * \text{Dozė}$, atsižvelgiant į atsitiktinį poveikį, tokį kaip Kartotinis bandinys ($\text{Karta} * \text{Dozė}$), ir $\text{Laikas} * \text{Kartotinis bandinys}(\text{Dozė})$, taigi yra galimi abiejų tipų nelygios dispersijos komponentai per kelias kartas. „Laikas“ šioje formulėje yra ikrų skaičiavimo dažnis (pvz., kas dieną arba kas savaitę). Tai yra pakartotinė matų analizė, o koreliacijos tarp tų pačių kartotinių bandinių stebėjimų atitinka kartotinių matavimų pobūdį, būdingą šiems duomenims.

Pagrindinis dozės poveikis tiriamas taikant Dunnett'o (ar Dunnett-Hsu) kriterijų, koreguojant dėl palyginimų skaičiaus. Reikia atlikti pataisas dėl pagrindinio kartos arba laiko poveikio, nes šių dviejų veiksnių „kontrolinio“ lygio nėra ir kiekvienos lygių poros palyginimas gali būti reikšmingas. Dėl šių dviejų rūšių pagrindinio poveikio, jei F kriterijus, taikomas pagrindiniam poveikiui, yra reikšmingas esant 0,05 reikšmingumo lygiui, galima atlikti porinius palyginimus tarp kelių to veiksnio lygių, esant 0,05 reikšmingumo lygiui, be tolesnių pataisų.

Šis modelis apima dviejų ir trijų veiksnių sąveikas, todėl pagrindinis (pavyzdžiui, laiko) poveikis gali nebūti reikšmingas, nors laikas turi reikšmingą poveikį rezultatams. Taigi, jei dviejų ar trijų veiksnių, įskaitant laiką, sąveika yra reikšminga esant 0,05 reikšmingumo lygiui, palyginimai tarp įvairių laiko lygių, esant 0,05 reikšmingumo lygiui, gali būti priimtini be tolesnių pataisų.

Tada taikomi F kriterijai dėl dozės reikšmingumo laiko atžvilgiu – vadinamieji pjūviai ANOVA lentelėje. Jeigu, pavyzdžiui, pjūvis dėl dozės (F_1 kartos, laiko vertė – 12) yra reikšmingas esant 0,05 reikšmingumo lygiui, poriniai palyginimai pagal dozę (F_1 kartos, laiko vertė – 12) gali būti priimtini esant 0,05 reikšmingumo lygiui, be tolesnių pataisų.

Panašūs principai tinka ir kriterijams dėl laiko (F1 kartos) ir dozės ir dėl kartos tam tikro laiko ir dozės atžvilgiu.

Galiausiai, kai palyginimai neįeina į kurią nors iš minėtų kategorijų, palyginimai turėtų būti koreguojami taikant Bonferroni-Holm'o p verčių pataisą. Daugiau informacijos apie tokių modelių analizes galima gauti iš Hocking (1985), Hochberg ir Tamhane (1987).

Kitu atveju neapdoroti duomenys yra užrašomi ir pateikiami tyrimo ataskaitoje kaip visumo duomenys (ikrų skaičius) kiekviename kartotiniame bandinyje kiekvieną dieną. Turėtų būti apskaičiuojamas kiekvieno kartotinio bandinio vidurkis iš neapdorotų duomenų, tada taikoma kvadratinės šaknies transformacija. Turėtų būti atlikta transformuotų kartotinių bandinių duomenų vidurkių vienfaktorinė ANOVA, tada taikomi Dunnett'o kontrastai. Taip pat gali būti naudinga vizualiai patikrinti kiekvienos bandomosios grupės ir (arba) kartotinio bandinio visumo duomenis naudojant sklaidos diagramą, kurioje parodomi duomenys laiko atžvilgiu. Taip bus galima neformaliai įvertinti galimą poveikį laikui bėgant.

Visi kiti biologiniai duomenys

Statistinės analizės grindžiamos pagrindine prielaida, kad tinkamai parinkus dozes, duomenys bus monotoniški. Taigi, daroma prielaida, kad duomenys yra monotoniški, ir jų monotoniškumas formaliai įvertinamas naudojant tiesinius ir kvadratinus kontrastus. Jei duomenys yra monotoniški, rekomenduojama taikyti Jonckheere-Terpstra trendo kriterijų kartotinių bandinių medianinėms vertėms (kaip rekomenduota EBPO, 2006). Jei kvadratinis kontrastas yra reikšmingas, o tiesinis kontrastas – nereikšmingas, duomenys laikomi nemonotoniškais.

Jei duomenys yra nemonotoniški, ypač dėl mažesnio bandomųjų grupių atsako į didžiausią ar dvi didžiausias dozes, vertėtų apsvarstyti, ar nereikėtų atmesti viso to duomenų rinkinio, kad analizė būtų atliekama be tų dozių bandomųjų grupių. Šį sprendimą reikės priimti vadovaujantis profesine nuovoka ir visais prieinamais duomenimis, ypač tais duomenimis, kurie parodo aiškų toksiškumą esant tų dydžių dozėms.

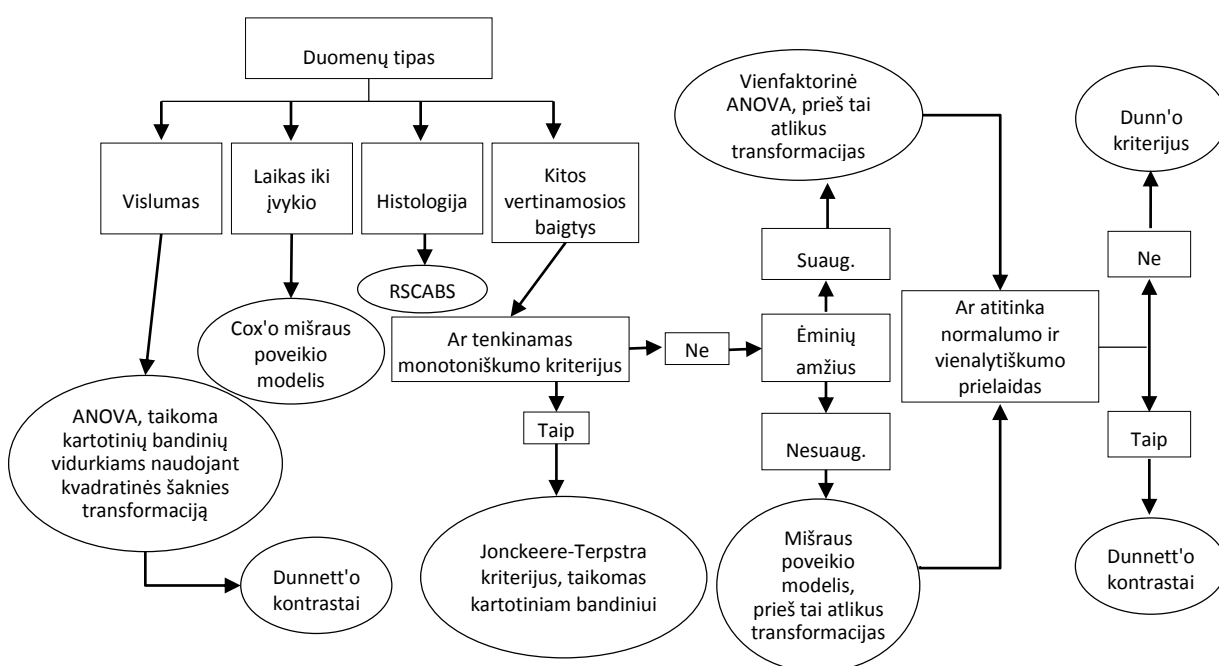
Masės ir ilgio duomenų transformacijų atlikti nerekomenduojama, nors kai kada jos gali būti reikalingos. Tačiau rekomenduojama atlikti vitelogenino duomenų logaritminę transformaciją; antrinių lytinių požymių (analinio peleko gumburėlių) duomenų kvadratinės šaknies transformaciją; procentinio išsiritimo duomenų, procentinio išgyvenamumo, lyčių santykio ir apvaisintų ikrų procentinės dalies duomenų kvadratinės šaknies arksinuso transformaciją. Laiką iki išsiritimo ir laiką iki pirmojo neršto reikėtų laikyti laiko iki įvykio duomenimis, o pavienių embrionų, neišsiritusių per nustatytą laikotarpį, arba kartotinių bandinių žuvų, kurios niekada nepradėjo neršti, duomenis traktuoti kaip atmetamus „iš dešinės“ (dešinėje grafiko pusėje). Laikas iki išsiritimo turėtų būti skaičiuojamas nuo vidutinės (medianinės) išsiritimo dienos kiekviename kartotiniame bandinyje. Šios vertinamosios baigtys turėtų būti analizuojamos naudojant mišraus poveikio Cox'o

proporcinių pavojų modelį.

Biologiniai duomenys iš suaugusių žuvų ėminių gaunami atliekant vieną matavimą kiekviename kartotiniame bandinyje, t. y. kartotinio bandinio akvariume yra viena XX žuvis ir viena XY žuvis. Todėl rekomenduojama vienfaktorinę ANOVA analizę atlikti naudojant kartotinių bandinių vidurkius. Jei patvirtinamos ANOVA prielaidos (dėl normalumo ir dispersijos vienalytiškumo, vertinant pagal ANOVA liekanas, atitinkamai taikant Shapiro-Wilks'o kriterijų ir Levene'o kriterijų), Dunnett'o kontrastai turėtų būti naudojami nustatant bandomąsias grupes, kurios skyrėsi nuo kontrolinės grupės. Kita vertus, jei ANOVA prielaidos nepatvirtinamos, reikėtų taikyti Dunn'o kriterijų nustatant, kurios bandomosios grupės skyrėsi nuo kontrolinės grupės. Panašią procedūrą rekomenduojama taikyti duomenims, išreikštiems procentiniais (vaisingumo, išsiritimo ir išgyvenamumo) dydžiais.

Biologiniai duomenys iš nesuaugusių žuvų ėminių gaunami per 1–8 matavimus iš kiekvieno kartotinio bandinio, t. y. kiekvienos genotipinės lyties individų, prisidedančių prie kartotinio bandinio vidurkio, skaičiai gali būti skirtingi. Todėl rekomenduojama naudoti mišraus poveikio ANOVA modelį, o po to taikyti Dunnett'o kontrastus, jei patvirtinamos normalumo ir dispersijos vienalytiškumo prielaidos (pagal mišraus poveikio ANOVA liekanas). Jei šios prielaidos nepatvirtinamos, reikėtų taikyti Dunn'o kriterijų nustatant, kurios bandomosios grupės skyrėsi nuo kontrolinės grupės.

2 diagrama. Atliekant MEOGRT duomenų analizę rekomenduojamų taikyti statistinių procedūrų schema.



Literatūra

- (1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: *A guidance to application* (šio leidinio priedai parengti kaip atskiras dokumentas), OECD Publishing, Paris.
- (2) Cameron A. C. and Trivedi P. K. (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, *Econometric Society Monograph* No 53, Cambridge University Press.
- (3) Hocking R. R. (1985). *The Analysis of Linear Models*, Monterey, CA: Brooks/Cole.
- (4) Hochberg Y. and Tamhane A. C. (1987). *Multiple Comparison Procedures*. John Wiley and Sons, New York.

C.53 VARLIAGYVIŲ LERVŲ AUGIMO IR VYSTYMO SI TYRIMAS (LAGDA)

IVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymų gaires Nr. 241 (2015). Poreikis sukurti ir patvirtinti tyrimą, kurį atliekant būtų galima nustatyti ir apibūdinti toksiškų cheminių medžiagų poveikio varliagyviams neigiamus padarinius, kyla iš susirūpinimo, kad aplinkoje esančios cheminės medžiagos gali kenkti tiek žmonėms, tiek laukinei gyvūnijai. EBPO varliagyvių lervų augimo ir vystymosi tyrimo (LAGDA) bandymo gairėse aprašytas toksiškumo bandymas naudojant tam tikros rūšies varliagyvius, kurį atliekant vertinamas augimas ir vystymasis nuo apvaisinimo iki ankstyvojo jaunikių periodo. Tai tyrimas (paprastai trunkantis 16 savaičių), kurio metu vertinamas ankstyvasis vystymasis, metamorfozė, išgyvenamumas, augimas ir dalinis subrendimas reprodukcijai. Jį atliekant taip pat galima matuoti kai kurias kitas vertinamąsias baigtis, taigi galima diagnostiškai įvertinti įtariamas endokrininę sistemą ardančias chemines medžiagas ar kitokias vystymuisi ir reprodukcijai toksiškas medžiagas. Šis aprašytas bandymo metodas yra pagrįstas afrikinės naguotosios varlės (*Xenopus laevis*) tinkamumo bandymams patvirtinimo darbu, atliktu JAV aplinkos apsaugos agentūros (U.S. EPA); papildomas darbas atliktas Japonijoje (1). Nors kitų rūšių varliagyviams galima pritaikyti augimo ir vystymosi bandymo protokolą, kurio svarbi dalis yra gebėjimas nustatyti genetinę lytį, konkretūs metodai ir stebimos vertinamosios baigtys, aprašyti pagal šį bandymo metodą, yra tinkami tik *Xenopus laevis*.
2. LAGDA yra aukštesnės pakopos bandymas su varliagyviais siekiant surinkti daugiau visapusiškos koncentracijos ir atsako informacijos apie neigiamą poveikį, kuri būtų tinkama naudoti nustatant ir apibūdinant pavojus ir vertinant ekologinę riziką. Šis tyrimas atitinka EBPO endokrininę sistemą ardančių medžiagų bandymų ir vertinimų konceptualiosios sistemos 4-ąją lygmenį (*Level 4*), pagal kurį tyrimai *in vivo* taip pat teikia duomenų apie neigiamą poveikį su endokrine sistema susijusioms vertinamosioms baigtims (2). Bendrąjį bandymo planą sudaro *X. laevis* embrionų, esančių 8–10 vystymosi stadijose pagal Nieuwkoop ir Faber (NF) klasifikaciją (3), veikimas mažiausiai keturių skirtingų koncentracijų (tarp kurių paprastai yra ne mažesni kaip pusiau logaritminiai intervalai) bandomąja chemine medžiaga, kartu naudojant kontrolinę grupę arba grupes, iki 10 savaičių po vidutinio (medianinio) laiko tarpsnio, kuriuo pasiekta NF 62 vystymosi stadija kontrolinėje grupėje, paimant vieną tarpinį poėminį NF 62 stadijoje (≤ 45 dienos po apvaisinimo; paprastai apie 45 dienos (d. p. a.)). Naudojami keturi kiekvienos bandomosios medžiagos koncentracijos kartotiniai bandiniai ir aštuoni kartotiniai bandiniai

kontrolinėje grupėje. Vertinamosios baigtys, vertinamos veikimo bandomąja medžiaga laikotarpiu (tuo metu, kai imamas tarpinis poėminis, ir galutinis ėminys baigiant bandymą), apima ir tas, kurios parodo bendrąjį toksiškumą: gaištamumą, elgesio anomalijas ir augimo parametrus (ilgį ir masę), taip pat vertinamąsias baigtis, nustatytas siekiant apibūdinti konkrečius endokrininei sistemai toksiškus poveikio būdus, veikiančius estrogenų, androgenų arba skydliaukės valdomus fiziologinius procesus. Pagal šį metodą pagrindinis dėmesys skiriamas galimam populiacijai reikšmingam poveikiui (t. y. neigiamam poveikiui išgyvenamumui, vystymuisi, augimui ir reprodukciniam vystymuisi), apskaičiuojant nepastebėto poveikio koncentraciją (NOEC) arba poveikio koncentraciją, sukeliančią matuojamos vertinamosios baigties x % pokytį (ECx). Vis dėlto reikėtų pažymėti, kad ECx metodai retai yra tinkami šio pobūdžio didelio masto tyrimams, kai didinti bandomosios medžiagos koncentracijos verčių skaičių, siekiant nustatyti norimą ECx, gali būti nepraktiška. Taip pat pažymėtina, kad šis metodas neapima paties reprodukcijos (dauginimosi) etapo. Pagal šį bandymo metodą vartojamų terminų apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

3. Dėl riboto cheminių medžiagų, kurių bandymai atlikti, ir patvirtinant šio gana sudėtingo tyrimo tinkamumą dalyvavusių laboratorijų skaičiaus (ypač jo tarplaboratorinis atkuriamumas dar nėra patvirtintas bandymų duomenimis) numatoma, kad kai jau bus atlikta pakankamai tyrimų, kad būtų galima nustatyti šio naujo tyrimo plano poveikį, EBPO bandymų gairės Nr. 241 bus peržiūrėtos ir, jei reikės, pakeistos atsižvelgiant į įgytą patirtį. LAGDA yra svarbus tyrimas siekiant tirti veiksnius, galinčius prisidėti prie varliagyvių populiacijų mažėjimo: cheminių medžiagų poveikio padariniai vertinami jautrių lervų stadijoje, kurioje poveikis išgyvenamumui ir vystymuisi, įskaitant normalų reprodukcinių organų vystymąsi, gali neigiamai paveikti populiacijas.
4. Šis bandymas sukurtas siekiant nustatyti apikalinį poveikį, patiriamą ir dėl endokrininių, ir dėl neendokrininių mechanizmų, ir apima diagnostines vertinamąsias baigtis, kurios yra iš dalies konkrečiai susietos su pagrindiniais endokrininės sistemos veikimo būdais. Reikėtų pažymėti, kad iki LAGDA sukūrimo dar nebuvo patvirtinto šios paskirties tyrimo, kuriam būtų naudojami varliagyviai.
5. Prieš pradėdant šį tyrimą svarbu turėti informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos fizikines ir chemines savybes, ypač kad būtų galima ruošti stabilius cheminių medžiagų tirpalus. Taip pat būtina taikyti pakankamai jautrų analizės metodą tikrinant bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertes. Per visą šį tyrimą, kuris trunka maždaug 16 savaičių, reikia iš viso 480 gyvūnų, t. y. *X. laevis* embrionų (arba 640 embrionų, jei

naudojamas tirpiklio kontrolinis bandinys), siekiant užtikrinti pakankamą bandymo patikimumą vertinant tokias populiacijas reikšmingas vertinamąsias baigtis kaip augimas, vystymasis ir reprodukcinė branda.

6. Prieš taikant šį bandymo metodą mišinio bandymui dėl reglamentavimo, vertėtų apsvarstyti, ar taip gauti rezultatai bus tinkami naudoti tuo numatomu reglamentavimo tikslu. Be to, atliekant šį tyrimą nėra tiesiogiai vertinamas vislumas, todėl jis gali būti netinkamas naudoti aukštesnės pakopos nei 4-uoju lygiu pagal EBPO endokrininę sistemą ardančių medžiagų bandymų ir vertinimų konceptualiąją sistemą.

ŠIO BANDYMO METODO MOKSLINIS PAGRINDAS

7. Didelė mūsų dabartinių žinių apie varliagyvių biologiją dalis yra gauta naudojant pavyzdinę laboratorinę rūšį *X. laevis*. Šios rūšies varles galima įprastai auginti laboratorijoje, patelėms galima paskatinti ovuliaciją naudojant žmogaus chorioninį gonadotropiną (hCG), o šių gyvūnų išteklių galima lengvai gauti iš komercinių veisėjų.
8. Varliagyvių, kaip ir visų stuburinių gyvūnų, reprodukcija yra valdoma pagumburio-hipofizės-lytinių liaukų (HPG) ašies (4). Šios endokrininės sistemos mediatoriai yra estrogenai ir androgenai, lemiantys lytiškai dimorfiškų audinių vystymąsi ir fiziologiją. Yra trys aiškos varliagyvių gyvenimo ciklo fazės, kuriose ši ašis yra ypač aktyvi: 1) lytinių liaukų diferenciacija vystantis lervoms, 2) antrinių lytinių požymių vystymasis ir lytinių liaukų subrendimas jaunikių stadijoje ir 3) suaugusių gyvūnų funkcinė reprodukcija. Kiekviename iš šių trijų vystymosi etapų gyvūnai gali būti jautrūs endokrininės sistemos trikdimui tam tikromis cheminėmis medžiagomis, tokiomis kaip estrogenai ir androgenai, dėl kurio organizmai galiausiai praranda reprodukcinį tinkamumą.
9. Lytinės liaukos pradeda vystytis NF 43 stadijoje, kai pirmiausia išsivysto bipotencinis genitalinis gūbrelis. Lytinių liaukų diferenciacija prasideda NF 52 stadijoje, kai pirmą kartą embrioninės ląstelės migruoja į besivystančių lytinių liaukų vidinį audinį (patinų) arba lieka žievės regione (patelių) (3). Apie tai, kad šiame lytinės diferenciacijos procese *Xenopus* lytinės liaukos yra jautrios cheminių medžiagų poveikiui, galinčiam jose sukelti pakitimų, pirmą kartą pranešta praėjusio amžiaus 6-ajame dešimtmetyje (5) (6). Paveikus buožgalvius estradioliu šiuo lytinių liaukų diferenciacijos laikotarpiu, patinai pakeičia lytį ir, išauginti iki subrendimo, yra visiškai funkcionalios patelės (7) (8). Patelių funkcinis lyties pakeitimas į patinus taip pat yra įmanomas; apie tai pranešta po bandymo, kurio metu buožgalviams buvo įsodinta sėklidžių audinio (9). Tačiau nors aromatazės inhibitoriaus veikimas taip pat paskatina funkcinį *X. tropicalis* lyties pakeitimą (10), tokio

poveikio *X. laevis* nenustatyta. Praeityje toksiškų medžiagų poveikis lytinių liaukų diferenciacijai vertintas atliekant lytinių liaukų histologinį tyrimą metamorfozės stadijoje, o lyties pakeitimą buvo įmanoma nustatyti tik lyčių santykio analize. Dar visai neseniai nebuvo jokių būdų tiesiogiai nustatyti *Xenopus* genetinę lytį, tačiau neseniai nustačius su lytimi susijusius *X. laevis* požymius, dabar galima nustatyti genetinę lytį ir tiesiogiai atskirti lytį pakeitusius gyvūnus (11).

10. Vystantis jaunikliams patinams, didėja testosterono kiekis kraujyje ir kartu atsiranda antriniai lytiniai požymiai, taip pat vystosi sėklidės. Patelių kiaušidės gamina estradiolį, todėl kraujo plazmoje atsiranda vitelogenino (VTG), kiaušidėse – vitelogenininių ovocitų, ir vystosi kiaušintakiai (12). Kiaušintakiai yra patelių antrinis lytinis požymis; jie funkcionuoja bręstant ovocitams reprodukcijos metu. Ovocitų išorė padengiama gleivių apvalkalu, kai jie slenka kiaušintakiais ir surenkami ikrų maišelyje, paruošti apvaisinimui. Atrodo, kad kiaušintakių vystymąsi reguliuoja estrogenai, nes jų vystymasis siejasi su estradiolio kiekiais *X. laevis* (13) ir *X. tropicalis* (12) varlių kraujyje. Pranešama, kad dėl polichlorintųjų bifenilų junginių (14) ir 4-*tert*-oktilfenolio (15) poveikio kiaušintakiai ėmė vystytis patinams.

BANDYMO PRINCIPAS

11. Pagal šio bandymo planą *X. laevis* NF 8–10 vystymosi stadijų embrionai yra per vandenį veikiami keturių skirtingų koncentracijų bandomąja chemine medžiaga, kartu naudojant kontrolinę grupę arba grupes, iki 10 savaičių po vidutinio (medianinio) laiko tarpsnio, kuriuo pasiekta NF 62 vystymosi stadija kontrolinėje grupėje, taip pat paimant vieną NF 62 stadijos tarpinį poėminį. Nors labai hidrofobiškas chemines medžiagas taip pat gali būti įmanoma dozuoti per pašarą, kol kas turima nedaug patirties, susijusios su šio poveikio būdo naudojimu per šį tyrimą. Naudojami keturi kiekvienos bandomosios medžiagos koncentracijos kartotiniai bandiniai ir aštuoni kartotiniai bandiniai kiekvienoje naudojamoje kontrolinėje grupėje. Vertinamosios baigtys, vertinamos veikimo bandomąja medžiaga laikotarpiu, apima tas, kurios parodo bendrąjį toksiškumą (t. y. gaištamumas, elgesio anomalijos ir augimo parametrai (ilgis ir masė)), taip pat vertinamąsias baigtis, nustatytas siekiant apibūdinti konkrečius endokrininei sistemai toksiškus poveikio būdus, veikiančius estrogenų, androgenų arba skydliaukės valdomus fiziologinius procesus (t. y. skydliaukės histopatologija, lytinių liaukų ir lytinių liaukų latakų histopatologija, vystymosi sutrikimai, vitelogeninas kraujo plazmoje (nebūtinai) ir genotipinis / fenotipinis lyčių santykis).

BANDYMO TINKAMUMO KRITERIJAI

12. Taikomi šie bandymo tinkamumo kriterijai:

- vandenyje ištirpusio deguonies koncentracija turėtų būti ≥ 40 % oro soties vertės per visą bandymą;
- vandens temperatūra turėtų būti 21 ± 1 °C intervale, o jos skirtumai tarp vienos grupės kartotinių bandinių ir tarp bandomųjų grupių neturėtų būti didesni nei 1,0 °C;
- bandymo tirpalo pH turėtų būti palaikomas intervale tarp 6,5 ir 8,5, o skirtumai tarp vienos grupės kartotinių bandinių ir tarp bandomųjų grupių neturėtų būti didesni nei 0,5;
- turėtų būti gauta įrodymų, kad bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos tirpale buvo tinkamai palaikomos vidutinių išmatuotų verčių ± 20 % tikslumu;
- veikimo bandomąja medžiaga laikotarpiu gaištamumas kiekviename kontrolinių grupių kartotiniame bandinyje turėtų būti ≤ 20 %;
- pradedant tyrimą pasirinktos naudoti vados gyvybingumas turėtų būti ≥ 70 %;
- vidutinis (medianinis) laiko tarpsnis, kuriuo pasiekta NF 62 vystymosi stadija kontrolinėse grupėse, turėtų būti ≤ 45 dienos.
- bandomųjų organizmų vidutinė masė NF 62 stadijoje ir užbaigus tyrimą kontroliniuose bandiniuose ir tirpiklio kontroliniuose bandiniuose (jei jie naudojami) turėtų siekti atitinkamai $1,0 \pm 0,2$ ir $11,5 \pm 3$ g.

13. Nors tai nėra tinkamumo kriterijus, rekomenduojama analizei pateikti ne mažiau kaip trijų bandomosios medžiagos poveikio dozių tris reikalavimus atitinkančius kartotinius bandinius. Per didelis gaištamumas, kuris kenkia bandomajai grupei, apibrėžiamas kaip >4 gyvūnų žūtys (>20 %) dviejuose arba daugiau kartotinių bandinių, kurių negalima paaiškinti technine klaida. Analizei reikėtų pateikti ne mažiau kaip trijų bandomosios medžiagos dozių bandomųjų grupių, kuriose nepastebėta aiškaus toksiškumo, bandinius. Aiškaus toksiškumo požymiai gali būti, be kita ko, plūduriavimas paviršiuje, gulėjimas indo dugne, aukštiekninkas arba nenormalus plaukimas, retas pakilimas į paviršių ir nereagavimas į dirgiklius, morfologinės anomalijos (pvz., galūnių deformacijos), kraujuojančios žaizdos ir pilvo edema.

14. Tuo atveju, jei pastebima, kad nukrypta nuo bandymo tinkamumo kriterijų, reikėtų apsvarstyti to padarinius bandymo rezultatų patikimumui, ir tie nukrypimai bei svarstymai turėtų būti įtraukti į bandymo ataskaitą.

METODŲ APRAŠYMAS

Aparatūra

15. Įprasta laboratorinė įranga ir ši speciali įranga:

- a) temperatūros reguliavimo aparatūra (pvz., šildytuvai arba vėsintuvai, kuriais galima nustatyti 21 ± 1 °C temperatūrą);
- b) termometras;
- c) dviejų okuliarų stereomikroskopas ir skrodimo įrankiai;
- d) skaitmeninė kamera, kurios skiriamoji geba ne mažesnė kaip 4 megapikseliai, su mikroskopinio fotografavimo funkcija (jei reikia);
- e) analizinės svarstyklės, kuriomis galima sverti iki 0,001 mg ar 1 µg tikslumu;
- f) ištirpusio deguonies matuoklis ir pH matuoklis;
- g) šviesos stiprio matuoklis, kuris matuoja liuksais.

Vanduo

Šaltinis ir kokybė

16. Galima naudoti bet kokį skiedimo vandenį, kuris gaunamas vietoje (pvz., šaltinio vandenį ar per aktyvintąsias anglis filtruotą vandentiekio vandenį), kuriame gali normaliai augti ir vystytis *X. laevis*; reikėtų turėti įrodymų, kad šios varlės normaliai auga šiame vandenyje. Kadangi iš įvairių vietų paimto vietos vandens kokybė gali būti labai skirtinga, reikėtų atlikti vandens kokybės analizę, ypač jei nėra ankstesnių duomenų apie to vandens tinkamumą varliagyvių lervoms auginti. Sunkiųjų metalų (pvz., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), pagrindinių anijonų ir katijonų (pvz., Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), pesticidų, bendrosios organinės anglies ir suspenduotų kietųjų dalelių kiekių matavimai turėtų būti atlikti prieš pradedant bandymą ir (arba) atliekami, pavyzdžiui, kas šešis mėnesius, kai yra žinoma, kad skiedimo vanduo yra gana pastovios kokybės. Kai kurios skiedimui tinkamo vandens cheminės savybės nurodytos 2 priedėlyje.

Jodido koncentracija bandymo vandenyje

17. Varliagyvių lervos per vandenį ir su pašaru turėtų gauti pakankamai jodido, kad jų skydliaukė galėtų gaminti skydliaukės hormonus, reikalingus normaliai metamorfozei. Šiuo metu dar nėra empiriškai parengtų gairių dėl minimalių jodido koncentracijų pašare ar vandenyje, reikalingų tinkamam vystymuisi užtikrinti; tačiau jodido pakankamumas gali turėti įtakos skydliaukės sistemos atsakui į skydliaukę veikiančias medžiagas ir yra žinoma, kad jodidas reguliuoja skydliaukės bazinį aktyvumą, todėl į tai derėtų atsižvelgti aiškinant skydliaukės histopatologinio tyrimo rezultatus. Remiantis ankstesniu darbu įrodyta, kad šis tyrimas sėkmingai atliekamas tada, kai jodido (I^-) koncentracijos skiedimo

vandenyje yra 0,5–10 µg/l. Būtų geriausia, kad minimali jodido koncentracija skiedimo vandenyje per visą bandymą būtų 0,5 µg/l (jo dedant natrio ar kalio druskos pavidalu). Jei bandymo vanduo regeneruojamas iš dejonizuoto vandens, į jį dedamo jodo koncentracija turėtų būti ne mažesnė kaip 0,5 µg/l. Ataskaitoje reikėtų nurodyti išmatuotas jodido koncentracijas bandymo vandenyje (t. y. skiedimo vandenyje) ir bandymui naudojamo vandens papildymą jodu arba kitomis druskomis (jei naudojamos). Jodo kiekis taip pat gali būti matuojamas ne tik bandymo vandenyje, bet ir pašare (-uose).

Ekspozicijos sistema

18. Šis bandymas sukurtas naudojant pratekamąją skiediklio sistemą. Sistemos komponentai, kurie liečiasi su vandeniu, turėtų būti pagaminti iš stiklo, nerūdijančiojo plieno ir (arba) kitų chemiškai inertinių medžiagų. Bandomosios medžiagos poveikiui tirti skirti indai turėtų būti stiklo arba nerūdijančiojo plieno akvariumai, o indo naudojamas tūris turėtų būti nuo 4,0 iki 10,0 l (minimalus vandens gylis 10–15 cm). Šioje sistemoje turėtų būti galima laikyti visų bandomosios medžiagos poveikio koncentracijų bandinius, kontrolinį bandinį ir tirpiklio kontrolinį bandinį (jei jis reikalingas), su keturiais kartotiniaisiais bandiniais kiekvienoje bandomojoje grupėje ir aštuoniais kartotiniaisiais bandiniais kontrolinėse grupėse. Turėtų būti palaikomas pastovus skysčio srautas į kiekvieną indą, užtikrinant ir reikiamų biologinių sąlygų palaikymą, ir cheminės medžiagos veikimą. Rekomenduojama palaikyti tinkamus srautus (pvz., kad visas vanduo inde būtų pakeičiamas bent 5 kartus per parą), kad būtų išvengta cheminės medžiagos koncentracijos mažėjimo dėl metabolizmo (tiek bandomųjų organizmų, tiek vandens mikroorganizmų, esančių akvariumuose) ar abiotinių irimo būdų (hidrolizės, fotolizės) arba išsisklaidymo (garavimo, sorbcijos). Bandymo indai turėtų būti ekspozicijos sistemoje išdėstomi atsitiktine tvarka, siekiant sumažinti galimą poveikį dėl padėties, įskaitant nežymius temperatūros, šviesos intensyvumo ir kitus skirtumus. Daugiau informacijos apie pratekamųjų ekspozicijos sistemų įrengimą galima gauti iš ASTM standartų vadovo dėl ūmaus toksiškumo bandymams su žuvimis, makrobestuburiais ir varliagyviais naudojamų medžiagų (16).

Cheminės medžiagos tiekimas į bandymo sistemą: bandymo tirpalų paruošimas

19. Ruošiant bandymo tirpalus, skirtus naudoti ekspozicijos sistemoje, bandomosios cheminės medžiagos pradinis tirpalas turėtų būti ekspozicijos sistemoje dozuojamas naudojant tinkamą siurbli ar kitą aparatūrą. Pradinio tirpalo srauto sparta (debitas) turėtų būti kalibruota remiantis bandymo tirpalų tinkamumo analiziniu patvirtinimu, prieš pradedant veikimo bandomąja medžiaga etapą, ir periodiškai tikrinama tūrio matavimais per visą bandymą. Bandymo tirpalas kiekvienoje bandymo kameroje turėtų būti atnaujinamas, kad visas jo tūris būtų pakeistas mažiausiai 5 kartus per parą.

20. Bandomosios cheminės medžiagos tiekimo į sistemą metodas gali skirtis, priklausomai nuo jos fizikinių ir cheminių savybių, todėl prieš bandymą reikėtų gauti pagrindinę informaciją apie cheminę medžiagą, kuri yra svarbi nustatant jos tinkamumą bandymui. Naudinga informacija apie bandomajai cheminei medžiagai būdingas savybes apima jos struktūrinę formulę, molekulinę masę, grynumą, stabilumą vandenyje ir šviesoje, pK_a ir K_{ow} , tirpumą vandenyje (geriausia bandymo terpėje) ir garų slėgį, taip pat lengvo biologinio skaidumo bandymo rezultatus (bandymo metodas C.4 (17) arba C.29 (18)). Tirpumas ir garų slėgis gali būti naudojami apskaičiuojant Henrio dėsnio konstantą, kuri parodys, ar gali būti bandomosios cheminės medžiagos nuostolių dėl garavimo. Reikėtų atsakingai apsvarstyti šio bandymo atlikimą tuo atveju, kai nėra minėtos informacijos, nes tyrimo planas priklausys nuo bandomosios cheminės medžiagos fizikinių ir cheminių savybių, ir be šių duomenų bandymo rezultatus gali būti sunku išaiškinti arba jie gali būti beprasmiai. Reikėtų turėti patikimą analitinį metodą, pagal kurį būtų galima nustatyti bandomosios cheminės medžiagos kiekį bandomuosiuose tirpaluose ir kurio tikslumo lygis bei aptikimo riba būtų žinomi ir paskelbti. Vandenyje tirpias bandomąsias chemines medžiagas galima ištirpinti skiedimo vandens alikvotinėse dalyse iki tokios koncentracijos, kad jas būtų galima į pratekamąją sistemą tiekti tikslinės bandymui naudojamos koncentracijos. Kai cheminės medžiagos yra skystos arba kietos kambario temperatūroje ir vidutiniškai tirpios vandenyje, gali reikėti naudoti skysčio ir skysčio arba skysčio ir kietosios medžiagos sotintuvus (pvz., stiklo pluošto kolonėlę) (19). Nors labai hidrofobiškas bandomąsias chemines medžiagas taip pat gali būti įmanoma dozuoti per pašarą, iki šiol turima nedaug patirties, susijusios su tokio poveikio būdo naudojimu per šį tyrimą.
21. Pasirinktų koncentracijų bandymo tirpalai ruošiami skiedžiant pradinį tirpalą. Pradinį tirpalą patartina ruošti paprasčiausiai sumaišant arba suplakant bandomąją cheminę medžiagą su skiedimo vandeniu mechaninėmis priemonėmis (pvz., maišykle ir (arba) ultragarsu). Tinkamos koncentracijos pradiniam tirpalui ruošti galima naudoti prisotinimo kolonėles ar sistemas arba pasyviojo dozavimo metodus (20). Patartina naudoti bandymo sistemą be pagalbinio tirpiklio, tačiau įvairios bandomosios cheminės medžiagos turi skirtingų fizikinių ir cheminių savybių, dėl kurių tikriausiai reikės skirtingais būdais ruošti vandenį cheminės medžiagos bandymui. Reikėtų stengtis, kiek tik įmanoma, nenaudoti tirpiklių ar nešiklių, nes: 1) kai kurie tirpikliai patys gali būti toksiški ir (arba) sukelti nepageidaujamus ar netikėtus atsakus, 2) kai bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijos viršija jų tirpumo vandenyje gebą (taip gali dažnai nutikti naudojant tirpiklius), gali būti netiksliai nustatytos efektyviosios jų koncentracijos, 3) per ilgesnį laiką truncančius bandymus naudojami tirpikliai gali paskatinti nemažą biologinės plėvelės, susijusios su mikroorganizmų aktyvumu, susidarymą, ir tai gali paveikti aplinkos sąlygas ir gebėjimą palaikyti tinkamas poveikio koncentracijas, ir 4) kai nėra ankstesnių

duomenų, kuriais būtų patvirtinta, kad atitinkamas tirpiklis nedaro poveikio tyrimo rezultatui, naudojant tirpiklius reikia tirpiklio kontrolinio bandinio, o tai turi reikšmingą poveikį gyvūnų gerovei, nes bandymui atlikti reikia daugiau gyvūnų. Tiriant chemines medžiagas, kurių bandymus atlikti sunku, galima naudoti tirpiklį, kai nėra kitos išeities, ir reikėtų nustatyti geriausią metodą remiantis EBPO rekomendaciniu dokumentu dėl sunkiai tiriamų medžiagų ir mišinių toksiškumo vandens organizmams bandymų (angl. *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*) (21). Tirpiklio pasirinkimas priklauso nuo bandomosios cheminės medžiagos cheminių savybių ir nuo to, ar yra ankstesnių to tirpiklio kontrolinių duomenų. Jei nėra ankstesnių duomenų, tirpiklio tinkamumą reikėtų įvertinti prieš atliekant galutinį tyrimą. Tuo atveju, kai tirpiklio naudojimas neišvengiamas ir dėl to padidėja mikroorganizmų aktyvumas (susidaro biologinė plėvelė), rekomenduojama užrašyti ir ataskaitoje pranešti biologinės plėvelės susidarymo kiekviename inde duomenis per visą bandymą (bent kas savaitę). Geriausia yra palaikyti pastovią tirpiklio koncentraciją tirpiklio kontroliniame bandinyje ir visuose bandomosios medžiagos bandiniuose. Jei tirpiklio koncentracija nėra pastovi, didžiausia tirpiklio koncentracija, esanti bandinyje su bandomąja medžiaga, turėtų būti naudojama ir tirpiklio kontroliniame bandinyje. Tais atvejais, kai naudojamas tirpiklis-nešiklis, didžiausios tirpiklio koncentracijos neturėtų viršyti 100 µl/l ar 100 mg/l (21) ir rekomenduojama palaikyti kuo mažesnę tirpiklio koncentraciją (pvz., <20 µl/l), kad būtų išvengta galimo tirpiklio poveikio matuojamoms vertinamosioms baigtims (22).

Bandomieji gyvūnai

Bandomoji rūšis

22. Bandomoji rūšis yra *X. laevis*, nes: 1) šios rūšies gyvūnai yra įprastai auginami laboratorijose visame pasaulyje, 2) juos lengva gauti iš komercinių tiekėjų ir 3) galima nustatyti jų genetinę lytį.

Suaugusių gyvūnų priežiūra ir veisimas

23. *X. laevis* tinkama priežiūra ir veisimas yra aprašyti standartizuotose gairėse (23). *X. laevis* laikymą ir priežiūrą taip pat aprašė Read (24). Siekiant paskatinti veisimąsi, suaugusių patelių ir patinų 3–5 poroms atliekama žmogaus chorioninio gonadotropino (hCG) injekcija į pilvo ertmę. Patelėms ir patinams išvirkščiamas, pvz., atitinkamai apie 800–1000 IU ir 500–800 IU hCG, ištirpinto 0,6–0,9 % fiziologiniame tirpale (arba varlėms skirtame Ringer'io tirpale – izotoniniame druskos tirpale, skirtame naudoti varliagyviams; www.hermes.mbl.edu/biologicalbulletin/compendium/comp-RGR.html). Išvirkščiami kiekiai turėtų būti apie 10 µl vienam kūno masės gramui (~1 000 µl). Vėliau, paskatinus veisimąsi, veislinės poros laikomos dideliuose induose, netrikdomos ir nekintamomis

sąlygomis, kad būtų skatinamas apglėbimas. Kiekvieno veisimo indo dugne turėtų būti antras dugnas iš nerūdijančiojo plieno tinklo (pvz., su 1,25 cm dydžio akutėmis), per kurį ikrai nukristų į indo dugną. Jei hCG injekcija varlėms atliekama vėlyvą popietę, jos paprastai padeda daugumą ikrų iki kitos dienos vėlyvo ryto. Kai išleidžiama ir apvaisinama pakankamai ikrų, suaugusius gyvūnus reikėtų išimti iš veisimo indų. Tada ikrai surenkami ir gleivių apvalkalai pašalinami apdorojant L-cisteinu (23). Reikėtų paruošti 2 % L-cisteino tirpalą ir jo pH patikslinti iki 8,1, pridendant 1 M NaOH. Šio 21 °C temperatūros tirpalo įpilama į 500 ml tūrio kūginę kolbą, į kurią sudėti vienos vados ikrai, ir atsargiai pamaišoma sukant kolbą 1–2 minutes, o tada ikrai 6–8 kartus kruopščiai nuplaunami kultūros auginimo vandeniui (21 °C temperatūros). Tada ikrai perkeliama į kristalizatorių ir patikrinama, ar >70 % iš jų yra gyvybingi, embrionų anomalijos minimalios ir juose matomas ląstelių dalijimasis.

BANDYMO PLANAS

Bandomosios medžiagos koncentracijos vertės

24. Rekomenduojama naudoti mažiausiai keturias bandomosios cheminės medžiagos koncentracijas ir tinkamus kontrolinius bandinius (įskaitant, jei reikia, tirpiklio kontrolinius bandinius). Apskritai patartina, kad skirtumas tarp koncentracijos verčių (skirtumo koeficientas) būtų ne didesnis kaip 3,2.
25. Atliekant šį bandymą reikėtų, kiek įmanoma, naudotis ankstesnių varliagyvių tyrimų rezultatais nustatant didžiausią bandomosios medžiagos koncentraciją, siekiant nesirinkti tokių koncentracijų, kurios yra pernelyg toksiškos. Nustatyti šią koncentracijos vertę gali padėti informacija, gauta, pavyzdžiui, iš kiekybinių medžiagos struktūros ir savybių ryšių tyrimų, pagal analogijos metodą ir iš ankstesnių varliagyvių tyrimų duomenų, kaip antai Varliagyvių metamorfozės tyrimo (bandymo metodas C.38) (25) ir Varlių embrionų teratogenezės tyrimo (*Xenopus*) (23) ir (arba) bandymų su žuvimis – tokių bandymų metodų kaip C.48, C.41 ir C.49 (26) (27) (28). Prieš atliekant LAGDA tyrimą galima atlikti intervalo nustatymo bandymą. Veikimą bandomąja medžiaga, siekiant nustatyti jos koncentracijos verčių intervalą, rekomenduojama pradėti per 24 valandas po apvaisinimo ir tęsti 7–14 dienų (arba, jei reikia, ilgiau), o bandomosios medžiagos koncentracijos vertės nustatomos tokios, kad skirtųsi ne daugiau kaip 10 kartų. Intervalo nustatymo bandymo rezultatai turėtų padėti nustatyti didžiausią bandomosios medžiagos koncentraciją per LAGDA bandymą. Įsidėmėtina, kad jei reikia naudoti tirpiklį, atliekant intervalo nustatymo tyrimą galima kartu nustatyti ir tirpiklio tinkamumą (t. y. ar jis gali turėti poveikį tyrimo rezultatui).

Kartotiniai bandiniai bandomosiose grupėse ir kontrolinėse grupėse

26. Turėtų būti naudojami ne mažiau kaip keturi kiekvienos bandomosios medžiagos koncentracijos kartotinių bandinių indai ir ne mažiau kaip aštuoni kartotiniai bandiniai kontrolinėse grupėse (ir, jei reikia, tirpiklio kontrolinis bandinys), t. y. kartotinių bandinių skaičius kontrolinėje grupėje ir bet kokio tirpiklio kontrolinėje grupėje turėtų būti dukart didesnis nei kartotinių bandinių skaičius kiekvienoje bandomojoje grupėje, kad būtų užtikrinta reikiama statistinė galia. Kiekviename kartotiniame bandinyje turėtų būti ne daugiau kaip 20 gyvūnų. Minimalus naudojamų gyvūnų skaičius būtų 15 (5 gyvūnai, skirti NF 62 vystymosi stadijos poėminiui, ir 10 jauniklių), tačiau papildomų gyvūnų į kiekvieną kartotinį bandinį įdedama siekiant atsižvelgti į galimą gaištamumą, kad būtų išlaikytas būtinas skaičius – 15.

PROCEDŪRA

Tyrimo apžvalga

27. Tyrimas pradedamas naudojant naujai išnerštus (NF 8–10 vystymosi stadijų) embrionus ir tęsiamas vystantis jaunikliams. Gyvūnai kasdien patikrinami, ar nenugaišo ir ar nėra neįprasto elgesio požymių. Pasiekus NF 62 vystymosi stadiją paimamas lervų poėminis (iki 5 gyvūnų iš kiekvieno kartotinio bandinio) ir ištiriamos įvairios vertinamosios baigtys (1 lentelė). Po to, kai visi gyvūnai pasiekia NF 66 vystymosi stadiją, t. y. baigiasi metamorfozė (arba praeina 70 dienų nuo tyrimo pradžios, priklausomai nuo to, kas įvyksta anksčiau), numarinama dalis atsitiktine tvarka atrinktų gyvūnų (neimant poėminių), sumažinant jų skaičių (iki 10 kiekviename inde) (žr. 43 punktą), o likę gyvūnai toliau veikiami bandomąja medžiaga iki praeina 10 savaitių po vidutinio (medianinio) laiko tarpsnio, kuriuo pasiekta NF 62 vystymosi stadija kontrolinėje grupėje. Baigiant bandymą (imant jauniklių ėminius) atliekami papildomi matavimai (1 lentelė).

Veikimo bandomąja chemine medžiaga sąlygos

28. Visi bandymo parametrai išsamiai išdėstyti 3 priedėlyje. Veikimo bandomąja medžiaga laikotarpiu turėtų būti kiekvieną dieną matuojamas bandymo tirpaluose ištirpęs deguonis, jų temperatūra ir pH. Vandens laidis, šarmingumas ir kietumas matuojami kartą per mėnesį. Matuojant vandens temperatūrą bandomuosiuose tirpaluose, skirtumai tarp vienos grupės kartotinių bandinių ir tarp bandomųjų grupių (per vieną dieną) neturėtų būti didesni nei 1,0 °C. Be to, matuojant bandomųjų tirpalų pH, skirtumai tarp vienos grupės kartotinių bandinių ir tarp bandomųjų grupių neturėtų būti didesni nei 0,5.
29. Bandymo indus galima kasdien išvalyti sifonu, pašalinant nesuvartotą pašarą ir šalinimo produktus; reikia tai daryti atsargiai, kad nebūtų kryžminio užteršimo tarp indų. Reikia su

gyvūnais elgtis atsargiai, kad jie patirtų kuo mažiau streso ir traumų, ypač kai jie perkeliama ir tvarkomi ir kai valomi akvariumai. Reikėtų vengti stresą keliančių sąlygų arba veiksmų, pvz., didelio ir (arba) nuolatinio triukšmo, akvariumų tapšnojoimo, virpesių inde.

Veikimo bandomąja chemine medžiaga trukmė

30. Veikti bandomąja medžiaga pradedami naujai išneršti (NF 8–10 stadijų) embrionai ir tai tęsiama iki praeina dešimt savaitių po vidutinio (medianinio) laiko tarpsnio, kuriuo pasiekta NF 62 vystymosi stadija (≤ 45 dienos nuo tyrimo pradžios) kontrolinėje grupėje. Bendra LAGDA tyrimo trukmė yra 16 savaitių (daugiausia 17 savaitių).

Tyrimo pradžia

31. Pradedant tyrimą turėtų būti naudojami motininiai gyvūnai, kurie jau patikrinti ir įsitikinta, kad jų palikuonys gali būti genetiškai diferencijuojami pagal lytį (5 priedėlis). Po suaugusių gyvūnų neršto embrionai surenkami, apdorojami cisteinu, pašalinant gleivių dangą, ir atliekamas jų gyvybingumo atrankinis patikrinimas (23). Apdorojimas cisteinu palengvina embrionų tvarkymą per šį patikrinimą – jie nelimpa prie paviršių. Atrankinis patikrinimas atliekamas naudojant stereomikroskopą, negyvybingus embrionus pašalinant tinkamo dydžio pipete. Patartina bandymui naudoti vienos vados embrionus, kurių gyvybingumas didesnis nei 70 %. NF 8–10 vystymosi stadijos embrionai atsitiktine tvarka paskirstomi į cheminės medžiagos poveikio bandymo indus, kuriuose yra tinkamas tūris skiedimo vandens; galiausiai kiekviename inde turi būti po 20 embrionų. Per šį perkėlimą embrionai turėtų būti tvarkomi atsargiai, kad stresas būtų kuo mažesnis ir būtų išvengta sužalojimų. Praėjus 96 valandoms po apvaisinimo, buožgalviai turėtų būti pakilę aukštyje vandens sluoksnyje ir pradėję prikibti prie indo sienelių.

Šėrimo režimas

32. Pašaro ir šėrimo normos keitimas įvairiose *X. laevis* gyvenimo stadijose yra labai svarbus LAGDA protokolo aspektas. Besaikis šėrimas lervų stadijoje paprastai sukelia dažnesnę ir sunkesnę skoliozę (8 priedėlis) ir to reikėtų vengti. Ir priešingai, nepakankamas šėrimas lervų stadijoje lemia labai nevienodą kontrolinių gyvūnų vystymosi spartą, ir tai gali sumažinti statistinę galią ar iškreipti bandymo rezultatus. 4 priedėlyje pateiktas rekomenduojamas *X. laevis* lervų ir jauniklių šėrimo racionas ir šėrimo režimai pratekamosios sistemos sąlygomis, tačiau galima rinktis ir kitokias alternatyvas, jei bandomieji organizmai pakankamai gerai auga ir vystosi. Įsidėmėtina, kad jei matuojamos konkrečiai su endokrine sistema susijusios vertinamosios baigtys, pašare neturėtų būti endokrininę sistemą veikiančių medžiagų, tokių kaip sojų miltai.

Lervų šėrimas

33. Rekomenduojamas lervų pašaras susideda iš upėtakių pradinių pašarų, granuliuotų *Spirulina* dumblių plokštelių ir auksinėms žuvelėms šerti skirtų dribsnių (pvz., *TetraFin*[®] dribsnių, gamintojas „Tetra“, Vokietija), suplaktų auginimo (arba skiedimo) vandenyje iki vientisos masės. Šiuo mišiniu šeriama tris kartus per dieną darbo dienomis ir kartą per dieną savaitgaliais. Buožgalviai taip pat šeriami gyvais sūriavandenių krevečių *Artemia* spp. 24 valandų amžiaus nauplijais dukart per dieną darbo dienomis ir kartą per dieną savaitgaliais, pradedant 8 dieną po apvaisinimo. Lervų šėrimas, kuris turėtų būti nuoseklus kiekviename bandymo inde, turėtų būti toks, kad bandomieji gyvūnai galėtų tinkamai augti ir vystytis, taigi būtų užtikrintas tyrimo rezultatų atkuriamumas ir perkeliamumas: 1) vidutinė (medianinė) trukmė iki NF 62 vystymosi stadijos kontrolinėse grupėse turėtų būti ≤ 45 dienos, ir 2) rekomenduojama vidutinė NF 62 stadijos gyvūnų masė kontrolinėse grupėse yra $1,0 \pm 0,2$ g.

Jauniklių šėrimas

34. Po to, kai baigiasi metamorfozė, šėrimo racioną sudaro aukščiausios rūšies grimztantis varlių pašaras, pvz., „Sinking Frog Food -3/32“ (gamintojas „Xenopus Express“, Florida, JAV) (4 priedėlis). Mažiems varliukams (ankstyvos stadijos jaunikliams) pašaro granulės trumpai malamos kavos malūnėliu, trintuvu ar sugrūdomos grūstuvėje, kad būtų mažesnės. Kai jaunikliai jau yra pakankamai dideli, kad suvartotų nesmulkintas granules, jų malti ar grūsti nebereikia. Gyvūnai turėtų būti šeriami kartą per parą. Jaunikliai turėtų būti šeriami taip, kad jų organizmai galėtų tinkamai augti ir vystytis: rekomenduojama kontrolinės grupės jauniklių vidutinė masė tuo metu, kai baigiamas tyrimas, yra $11,5 \pm 3$ g.

Cheminė analizė

35. Prieš pradedant tyrimą reikėtų nustatyti bandomosios cheminės medžiagos stabilumą (pvz., tirpumą, skaidumą ir lakumą) ir visus reikiamus analizės metodus, pvz., remiantis turima informacija arba žiniomis. Dozuojant bandomąją medžiagą per skiedimo vandenį, rekomenduojama prieš pradedant bandymą išanalizuoti bandymo tirpalus iš kiekvienos koncentracijos kartotinio bandinio indo, patikrinant sistemos veikimą. Veikimo bandomąją medžiagą laikotarpiu tinkamais intervalais nustatomos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos, geriausia kas savaitę bent viename kiekvienos bandomosios grupės kartotiniame bandinyje, kas savaitę renkantis tikrinti vis kitą kartotinį bandinį toje pačioje bandomojoje grupėje. Rekomenduojama rezultatus pagrįsti išmatuotomis koncentracijos vertėmis. Tačiau jei per visą bandymą bandomosios cheminės medžiagos koncentracija tirpale buvo tinkamai palaikoma ± 20 % nominaliosios koncentracijos tikslumu, bandymo rezultatus galima pagrįsti nominaliosiomis arba išmatuotomis vertėmis. Be to, išmatuotų bandomosios medžiagos koncentracijos verčių variacijos koeficientas (VK) visu bandymo

laikotarpiu kiekvienos koncentracijos bandomojoje grupėje turėtų būti 20 % arba mažesnis. Kai išmatuotosios koncentracijos nepatenka į 80–120 % nominaliosios koncentracijos verčių intervalą (pavyzdžiui, kai bandomos labai biologiškai skaidžios ar lengvai susigeriančios cheminės medžiagos), poveikio koncentracijos per pratekamosios sistemos bandymus turėtų būti nustatomos ir išreiškiamos pagal vidutinę koncentraciją (aritmetinį vidurkį).

36. Skiedimo vandens ir pradinio tirpalo srautai turėtų būti tikrinami tinkamais intervalais (pvz., tris kartus per savaitę) visu veikimo bandomąja medžiaga laikotarpiu. Tais atvejais, kai cheminių medžiagų neįmanoma aptikti esant kai kurioms arba visoms nominaliosioms jų koncentracijos vėrtėms (pvz., dėl greito irimo ar susigėrimo bandymo induose arba dėl reikšmingo cheminės medžiagos kaupimosi veikiamų gyvūnų organizmuose), rekomenduojama atitinkamai pritaikyti bandymo tirpalo atnaujinimo dažnį kiekvienoje bandymo kameroje, kad bandymo koncentracijos būtų kuo pastovesnės.

Stebėjimai ir vertinamųjų baigčių matavimai

37. Vertinamosios baigtys, vertinamos veikimo bandomąja medžiaga laikotarpiu, yra tos, kurios parodo toksiškumą, įskaitant gaištamumą, elgesio anomalijas, kaip antai klinikinius ligos požymius ir (arba) bendrąjį toksiškumą, ir augimo parametrai (ilgis ir masė), taip pat patologinės vertinamosios baigtys, kurios gali atitikti ir bendrąjį toksiškumą, ir endokrininius poveikio būdus per estrogenų, androgenų ar skydliaukės valdomus mechanizmus. Be to, baigiant tyrimą galima, jei norima, išmatuoti VTG koncentraciją kraujo plazmoje. Išmatuoti VTG gali būti naudinga siekiant suprasti tyrimo rezultatų ryšį su endokrininio poveikio mechanizmais, būdingais įtariamoms endokrininę sistemą ardančioms cheminėms medžiagoms. Vertinamosios baigtys ir matavimų laikas apibendrinti 1 lentelėje.

1 lentelė. LAGDA vertinamųjų baigčių apžvalga

Vertinamosios baigtys*	Kiekvieną dieną	Tarpinis ėminių ėmimas (lervų ėminiai)	Bandymo užbaigimas (jauniklių ėminiai)
Gaištamumas ir anomalijos	X		
Trukmė iki NF 62 stadijos		X	
Histo(pato)logija (skydliaukės)		X	
Morfometrija (augimas: masės ir ilgio duomenys)		X	X
Kepenų somatinis indeksas (LSI)			X

Genetinis / fenotipinis lyčių santykis			X
Histopatologija (lytinių liaukų, reprodukcinės latakų, inkstų ir kepenų)			X
Vitelogeninas (VTG) (nebūtinai)			X

* Visos vertinamosios baigtys statistiškai analizuojamos.

Gaištamumas ir kasdieniai stebėjimai

38. Visi bandymo indai turėtų būti kiekvieną dieną tikrinami, ar nėra nugaišusių gyvūnų, ir užrašomas jų skaičius kiekviename inde. Aptiktus negyvus gyvūnus reikėtų iškart pašalinti iš bandymo indo. Negyvi gyvūnai turėtų būti suklasifikuoti pagal vystymosi stadiją: ankstesnė nei NF 58 stadija (iki priekinių galūnių pasirodymo), NF 58–62 stadijos, NF 63–66 stadijos (nuo NF 62 stadijos iki visiško uodegos išnykimo) ar vėlesnė nei NF 66 stadija (po lervų stadijos pabaigos). Didesnis nei 20 % gaištamumas gali reikšti netinkamas bandymo sąlygas arba pernelyg toksišką bandomosios cheminės medžiagos poveikį. Gyvūnai paprastai yra jautriausi su cheminių medžiagų poveikiu nesusijusiems gaištamumo veiksniams per pirmas kelias vystymosi dienas po ikryų išneršimo ir per metamorfozės kulminaciją. Toks gaištamumas gali būti aiškus iš kontrolinių duomenų.
39. Be to, reikėtų užrašyti pastabas apie bet kokią pastebėtą neįprastą elgesį, aiškiai matomus vystymosi defektus (pvz., skoliozę) ar sužalojimus. Pastebėtus skoliozės atvejus reikėtų suskaičiuoti (dažnį) ir įvertinti balais pagal sunkumą (pvz., nežymi – N, minimali – 1, vidutinė – 2, sunki – 3; žr. 8 priedėlį). Reikėtų stengtis užtikrinti, kad vidutinės ir sunkios skoliozės dažnis būtų nedidelis (pvz., mažesnis nei 10 % kontrolinėse grupėse) per visą tyrimą, nors kai kontrolinėse grupėse yra daugiau anomalijų, tai ne visada yra pakankama priežastis nutraukti bandymą. Normaliam lervos stadijos gyvūnų elgesiui būdinga tai, kad jie kybo vandens sluoksnyje, uodegą laikydami aukščiau galvos, reguliariai ir ritmiškai judina uodegą, periodiškai pakyla į paviršių, judina žiaunų dangtelį ir reaguoja į dirgiklius. Nenormalaus elgesio požymiai būtų, pvz., plūduriavimas paviršiuje, gulėjimas indo dugne, aukštiekninkas arba neįprastas plaukimas, retas pakilimas į paviršių ir nereagavimas į dirgiklius. Stebint gyvūnus po metamorfozės, kartu su minėtomis elgesio anomalijomis reikėtų užrašyti, kada labai skiriasi pašaro kiekių suvartojimas įvairiose bandomosiose grupėse. Prie didelių vystymosi defektų ir sužeidimų galima priskirti, be kita ko, morfologinius išsigimimus (pvz., galūnių deformaciją), kraujuojančias žaizdas, pilvo edemą ir bakterines arba grybelines infekcijas. Jei ant jauniklių galvų (už šnervių) yra žaizdų, tai gali būti požymis, kad drėgnumo lygis yra nepakankamas. Šie nustatomi požymiai yra kokybiniai ir juos reikėtų laikyti panašiais į klinikinius ligos ar streso požymius ir lyginti su kontroliniais gyvūnais. Jei šie reiškiniai yra dažnesni induose su

chemine medžiaga negu kontroliniuose induose, reikėtų tai suprasti kaip aiškaus toksiškumo įrodymą.

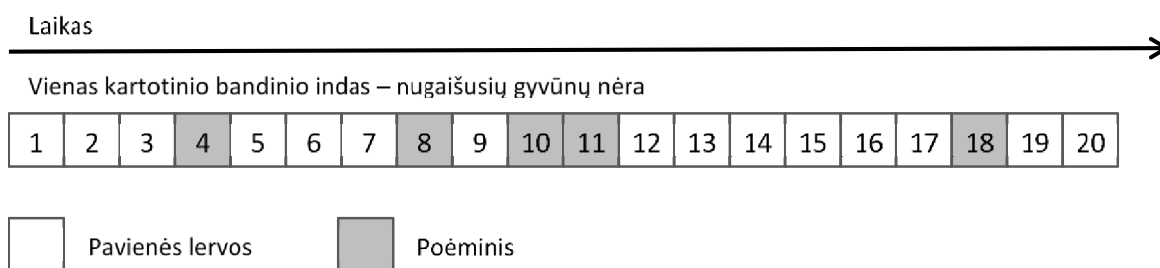
Lervų poėminis

Lervų poėminių ėmimo eiga

40. NF 62 vystymosi stadiją pasiekę buožgalviai turėtų būti išimami iš indų ir panaudojami ėminiams, arba perkeliami, kad būtų galima pradėti kitą veikimo bandomąją medžiaga etapą naujame inde, arba fiziškai atskiriami nuo likusių buožgalvių tame pačiame inde naudojant pertvarą. Božgalviai kasdien tikrinami ir užrašoma, kurią tyrimo dieną kiekvienas buožgalvis pasiekia NF 62 vystymosi stadiją. Pagrindinis skiriamasis bruožas, kuriuo grindžiamas šis vertinimas, yra galvos forma. Kai galva sumažėja tiek, kad apžiūrint atrodo maždaug tokio paties pločio kaip buožgalvio kūnas, o priekinės galūnės yra ties širdies viduriu, tas individas skaičiuojamas kaip pasiekęs NF 62 stadiją.
41. Tikslas yra paimti ėminiams iš viso penkis NF 62 stadijos buožgalvius iš kiekvieno kartotinio bandinio indo. Tai turėtų būti daroma visiškai atsitiktine tvarka, tačiau sprendimas dėl to priimamas iš anksto. Kartotinio bandymo indo galimas pavyzdys pateiktas **1 diagramoje**. Jei konkrečiame inde būtų 20 išgyvenusių buožgalvių, pirmajam individui pasiekus NF 62 stadiją, reikėtų atsitiktine tvarka pasirinkti penkis skaičius iš 1–20. 1-asis buožgalvis yra pirmasis NF 62 stadiją pasiekęs individas, o 20-asis buožgalvis – individas, kuris paskutinis pasiekė NF 62 stadiją tame inde. Panašiai ir kai inde yra 18 išgyvenusių lervų, reikėtų pasirinkti penkis atsitiktinius skaičius iš 1–18. Reikėtų atlikti šią atranką kiekviename kartotinio bandinio inde tada, kai pirmasis bandymui naudojamas individas pasiekia NF 62 stadiją. Jei imant NF 62 stadijos ėminius yra nugaišusių gyvūnų, likusius ėminius reikia iš naujo perskirstyti atsitiktine tvarka pagal tai, kiek yra likusių <NF 62 stadijos lervų ir kiek dar ėminių reikia paimti, kad iš to kartotinio bandinio būtų gauti iš viso penki ėminiai. Tą dieną, kai buožgalvis pasiekia NF 62 vystymosi stadiją, remiantis parengta ėminių ėmimo lentelė, nustatoma, ar tą individą reikia panaudoti ėminiams, ar fiziškai atskirti nuo likusių buožgalvių tolesniam veikimui bandomąją medžiaga. Pateiktame pavyzdyje (1 diagrama) pirmasis individas, pasiekęs NF 62 stadiją (t. y. 1-asis langelis), fiziškai atskiriamas nuo kitų lervų, toliau veikiamas bandomąją medžiaga ir užrašoma, kurią tyrimo dieną tas individas pasiekė NF 62 stadiją. Vėliau 2-asis ir 3-iasis individai tvarkomi taip pat kaip ir 1-asis, o po to 4-asis individas paimamas ėminiams dėl augimo ir skydliaukės histologiniam tyrimui (pagal šį pavyzdį). Ši procedūra tęsiama iki tol, kol 20-asis individas perkeliamas kartu su likusiais NF 62 stadiją pasiekusiais individais arba paimamas ėminiams. Naudojama atrankos atsitiktine tvarka procedūra turi būti tokia, kad kiekvieno bandomojo organizmo išrinkimo tikimybė būtų

vienoda. Tai galima pasiekti taikant bet kokį randomizavimo metodą, bet taip pat per NF 62 stadijos poėminių ėmimo laikotarpį kuriuo nors metu reikia kiekvieną buožgalvį pagauti tinklu.

1 diagrama. NF 62 stadijos ėminių ėmimo iš vieno kartotinio bandinio indo eiga (hipotetinis pavyzdys).



42. Iš lervų poėminio gaunamos šios vertinamosios baigtys: 1) trukmė iki NF 62 stadijos (t. y. kiek dienų praėjo nuo apvaisinimo iki pasiekta NF 62 stadija), 2) išorinės anomalijos, 3) morfometriniai parametrai (pvz., masė ir ilgis) ir 4) skydliaukės histologiniai duomenys.

Humaniškas buožgalvių numarinimas

43. Imant poėminį, NF 62 stadijos buožgalviai (5 individai iš kiekvieno kartotinio bandinio) turėtų būti numarinami 30 minučių panardinant į anestetiko tirpalą (pvz., MS-222, trikaino metansulfonato, CAS.886-86-2, 0,3 % tirpalą) tinkamą kiekį (pvz., 500 ml). MS-222 tirpalas turėtų būti paruoštas naudojant buferį – natrio hidrokarbonatą, kad pH būtų apie 7,0, nes MS-222 tirpalas be buferio yra rūgštus ir dirginantis varlių odą, todėl prastai įsigeria ir sukelia nereikalingą papildomą stresą organizmams.
44. Naudojant tinklinį graibštelį, buožgalvis išimamas iš bandymo kameros ir perkeliamas (įleidžiamas) į numarinimo tirpalą. Gyvūnas yra tinkamai numarintas ir paruoštas skrodimui, kai nebereaguoja į išorinius dirgiklius, pavyzdžiui, į užpakalinės galūnės suspaudimą žnyplėmis.

Morfometriniai parametrai (masė ir ilgis)

45. Kiekvieno buožgalvio šlapio kūno masę (miligramo tikslumu) ir ilgį nuo snukio iki išeinamosios angos (0,1 mm tikslumu) reikėtų išmatuoti iškart po to, kai jis nebereaguoja po anestetiko poveikio (2a diagrama). Galima, naudojant vaizdo analizės programinę įrangą, ilgį nuo snukio iki išeinamosios angos išmatuoti iš nuotraukos. Prieš sveriant buožgalvius reikėtų juos nusausti sugeriamuoju popieriumi, pašalinant likusio vandens perteklių. Po kūno dydžio (masės ir ilgio nuo snukio iki išeinamosios angos) matavimų

reikėtų užrašyti arba pažymėti bet kokias dideles morfologines anomalijas ir (arba) klinikinius toksiškumo požymius, tokius kaip skoliozė (žr. 8 priedėlį), petechijos ir kraujavimas, ir rekomenduojama tai užrašyti skaitmeniniuose dokumentuose. Petechijos yra mažos raudonos arba purpurinės kraujosruvos odos kapiliaruose.

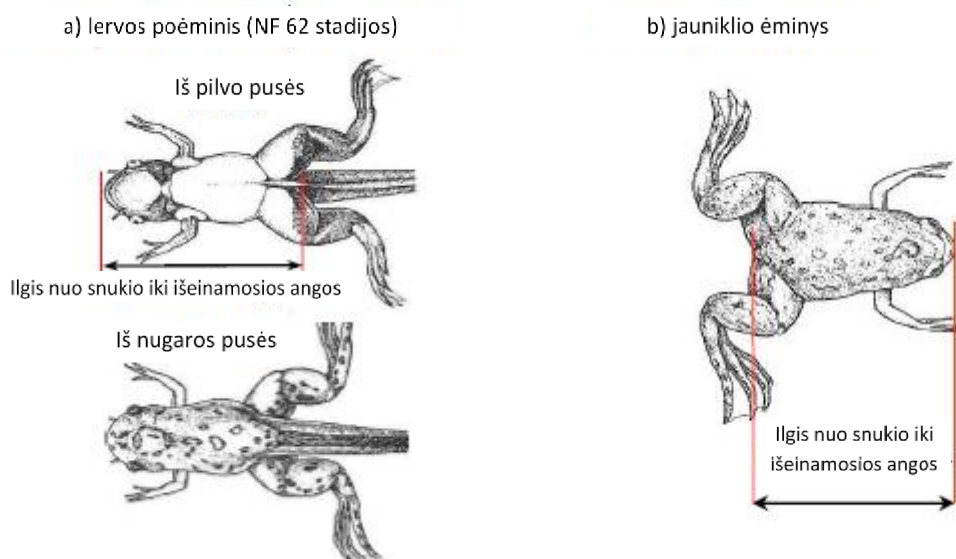
Audinio paėmimas ir užfiksavimas

46. Lervų poėminio skydliaukės paaimamos histologiniam tyrimui. Apatinė kūno dalis žemiau priekinių galūnių atskiriama ir pašalinama. Taip sutrumpinta skerdena užfiksuoja Davidson'o fiksatoriumi. Fiksatoriaus tūris inde turėtų būti bent 10 kartų didesnis nei apytikris audinių tūris. Fiksatorių reikėtų tinkamai maišyti arba palaikyti jo cirkuliaciją, kad reikiami audiniai būtų tinkamai užfiksuoti. Visi audiniai laikomi Davidson'o fiksatoriaus tirpale mažiausiai 48 valandas, bet ne ilgiau kaip 96 valandas, o tada nuplaunami dejonizuotu vandeniu ir laikomi 10 % neutraliame buferizuotame formalino tirpale (1) (29).

Skydliaukės histologinis tyrimas

47. Kiekviename lervų poėminyje (iš fiksuotų audinių) histologiškai įvertinamos skydliaukės, t. y. atliekama diagnostika ir poveikio stiprumo laipsnio nustatymas (29) (30).

2 diagrama. Gairės vertinant ilgį nuo snukio iki išeinamosios angos per LAGDA tyrimą: a) NF 62 stadijos ir b) ir jauniklių varlių. NF 62 stadijos (a) skiriamieji bruožai: galva tokio paties pločio kaip kūnas, uoslės nervo ilgis trumpesnis negu uodžiamojo stormens skersmuo (vaizdas iš nugaros pusės), o priekinės galūnės yra ties širdimi (vaizdas iš pilvo pusės). Vaizdai pritaikyti iš Nieuwkoop ir Faber (1994).



Lervų veikimo bandomąja medžiaga laikotarpio pabaiga

48. Atsižvelgiant į pradinį buožgalvių skaičių, tikėtina, kad bus nedidelė procentinė dalis individų, kurie normaliai nesivystys ir nebaigs metamorfozės (NF 66 stadijos) tinkamu laiku. Veikimas bandomąja medžiaga lervų stadijoje turėtų trukti ne ilgiau kaip 70 dienų. Bet kokie šio laikotarpio pabaigoje likę buožgalviai turėtų būti numarinti (žr. 43 punktą), išmatuota jų šlapio kūno masė ir ilgis nuo snukio iki išeinamosios angos, nustatyta vystymosi stadija pagal Nieuwkoop ir Faber (1994) ir užrašytos pastabos apie bet kokiais vystymosi anomalijas.

Gyvūnų skaičiaus sumažinimas po NF 66 stadijos

49. Nuo NF 66 stadijos (visiško uodegos išnykimo) iki bandymo pabaigos kiekviename bandymo inde turėtų būti toliau laikoma 10 individų. Todėl po to, kai visi gyvūnai pasiekia NF 66 stadiją, arba po 70 dienų (priklausomai nuo to, kas įvyksta anksčiau), jų skaičių reikėtų sumažinti. Gyvūnai po NF 66 stadijos, kurie nebus toliau naudojami bandymui, turėtų būti atrinkti atsitiktine tvarka.
50. Gyvūnai, nepasirinkti tolesniam veikimui bandomąja medžiaga, yra numarinami (žr. 43 skirsnį). Atliekamas kiekvieno gyvūno vystymosi stadijos nustatymas, šlapio kūno masės ir ilgio nuo snukio iki išeinamosios angos (2b diagrama) matavimai ir bendras skrodimas. Pažymima fenotipinė lytis (pagal lytinių liaukų morfologiją) – patelė, patinas ar neaiški lytis.

Jauniklių ėminių ėmimas

Jauniklių ėminių ėmimo eiga

51. Likę gyvūnai skiedimo vandens (ir (arba) tirpiklio, jei tinka) kontrolinėje grupėje toliau veikiami bandomąja medžiaga iki praeina 10 savaičių po vidutinio (medianinio) laiko tarpsnio, kuriuo pasiekta NF 62 vystymosi stadija. Veikimo laikotarpio pabaigoje likę gyvūnai (ne daugiau kaip 10 varlių iš kiekvieno kartotinio bandinio) numarinami ir išmatuojamos arba įvertinamos ir užrašomos įvairios vertinamosios baigtys: 1) morfometriniai parametrai (masė ir ilgis), 2) fenotipinis / genotipinis lyčių santykis, 3) kepenų masė (kepenų somatinis indeksas), 4) histopatologija (lytinių liaukų, reprodukcinių latakų, kepenų ir inkstų) ir (nebūtinai) 5) VTG kraujo plazmoje.

Humaniškas varlių numarinimas

52. Ėminiams imami jaunikliai (varlės po metamorfozės) numarinami anestetiko injekcija (pvz., 10 % MS-222 tinkamame fosfatiname buferiniame tirpale) į pilvo ertmę. Varlių ėminus galima imti po to, kai jos nebereaguoja į dirgiklius (paprastai praėjus apie 2 min.

po injekcijos, jei naudojama 10 % MS-222 dozė yra 0,01 ml/g varlės kūno masės). Nors jaunikles varlės būtų galima panardinti į didesnės koncentracijos anestetiko (MS-222) tirpalą, iš patirties žinoma, kad šiuo metodu jų anestezavimas trunka ilgiau ir tokios trukmės gali nepakakti, kad būtų galima paimti ėminius. Injekcija yra efektyvus ir greitas numarinimas prieš ėminių ėmimą. Ėminių nereikėtų pradėti imti tol, kol neįsitikinta, kad varlės nebereaguoja į dirgiklius, taigi yra negyvos. Jei yra požymių, kad varlės patiria didelių kančių (kurios yra labai didelės ir galima patikimai prognozuoti žūtį), ir jos laikomos gaištančiomis, reikėtų tuos gyvūnus anestezuoti ir numarinti, o per duomenų analizę traktuoti kaip nugaišusius gyvūnus. Kai varlės numarinamos dėl liguistumo, reikėtų tai užrašyti ir pranešti ataskaitoje. Priklausomai nuo to, kuriame tyrimo etape varlė numarinama, galima pasilikti ją histopatologinei analizei (užfiksuoti varlę, kad būtų galima atlikti tyrimą dėl galimos histopatologijos).

Morfometriniai parametrai (masė ir ilgis)

53. Šlapio kūno masės ir ilgio nuo snukio iki išeinamosios angos (2b diagrama) matavimai yra tokie patys kaip aprašytieji lervų poėminio matavimai.

VTG nustatymas kraujo plazmoje (nebūtinai)

54. VTG yra visuotinai pripažintas estrogeninių cheminių medžiagų poveikio biologinis žymuo. Atliekant LAGDA tyrimą galima išmatuoti VTG plazmoje iš jauniklių ėminių (tai gali būti ypač aktualu, jei įtariama, kad bandomoji cheminė medžiaga yra estrogenas).
55. Numarintų jauniklių užpakalinės galūnės nupjaunamos ir kraujas paimamas heparinizuotu kapiliariniu vamzdeliu (nors gali būti tinkami ir alternatyvūs kraujo paėmimo metodai, tokie kaip širdies punkcija). Kraujas išleidžiamas į mikrocentrifugos mėgintuvėlį (pvz., 1,5 ml tūrio) ir centrifuguojant gaunama plazma. Plazmos ėminiai iki VTG nustatymo turėtų būti laikomi -70°C arba žemesnėje temperatūroje. VTG koncentraciją plazmoje galima matuoti imunofermentinės analizės (IFA, angl. ELISA) metodu (6 priedėlis) arba alternatyviu metodu, tokiu kaip masės spektrometrija (31). Patartina dėl didesnio jautrumo rinktis konkrečios rūšies antikūnus.

Genetinės lyties nustatymas

56. Kiekvienos jauniklės varlės genetinė lytis įvertinama pagal požymius, nustatytus Yoshimoto *et al.* (11). Siekiant nustatyti genetinę lytį, vienos per skrodimą pašalintos užpakalinės galūnės dalis (ar visa galūnė) ar bet koks kitas audinys paimamas ir laikomas mikrocentrifugos mėgintuvėlyje (varlių audinių ėminius galima imti iš bet kurio audinio). Audinį galima laikyti -20°C ar žemesnėje temperatūroje iki deoksiribonukleorūgšties (DNR) išskyrimo. DNR iš audinių galima išskirti naudojant rinkinius, kuriuos galima

nusipirkti, o atitinkamo žymens buvimas arba nebuvimas analizuojamas polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu (5 priedėlis). Apskritai kontrolinių gyvūnų histologinės lyties ir genotipo atitiktis tuo metu, kai imami jauniklių ėminiai, kontrolinėse grupėse yra didesnė nei 95 %.

Audinių paėmimas ir fiksavimas histopatologiniam tyrimui

57. Per galutinį ėminių ėmimą histologinei analizei paimamos lytinės liaukos, reprodukciniai lataakai, inkstai ir kepenys. Atverinama pilvo ertmė, kepenys išskrodžiamos ir pasveriamos. Tada iš apatinės pilvo dalies atsargiai išimami virškinamojo trakto organai (pvz., skrandis, žarnynas), atidengiant lytines liaukas, inkstus ir reprodukcinius latakus. Bet kokios lytinių liaukų makroskopinės morfologinės anomalijos turėtų būti užrašytos. Galiausiai reikėtų pašalinti užpakalines galūnes, jei jos dar nepašalintos imant kraują. Surinktos kepenys ir skerdena su joje *in situ* paliktomis lytinėmis liaukomis turėtų būti iškart įdedamos į Davidson'o fiksatorių. Fiksatoriaus tūris inde turėtų būti bent 10 kartų didesnis nei apytikris audinių tūris. Visi audiniai laikomi Davidson'o fiksatoriaus tirpale mažiausiai 48 valandas, bet ne ilgiau kaip 96 valandas, o tada nuplaunami dejonizuotu vandeniu ir laikomi 10 % neutraliame buferizuotame formalino tirpale (1) (29).

Histopatologinis tyrimas

58. Kiekvienas jauniklio ėminys įvertinamas histologiškai, ar nėra patologijų lytinėse liaukose, reprodukciniuose latakuose, inkstuose ir kepenų audinyje, t. y. atliekama diagnostika ir poveikio stiprumo laipsnio nustatymas (32). Per šį vertinimą taip pat sužinomas lytinių liaukų fenotipas (pvz., kiaušidės, sėklidės ar hermafroditiniai organai) ir šie stebėjimai kartu su individų genetiniais lyties nustatymais gali būti naudojami apskaičiuojant fenotipinį / genotipinį lyčių santykį.

DUOMENŲ PATEIKIMAS ATASKAITOJE

Statistinė analizė

59. Atliekant LAGDA tyrimą gaunami trijų formų duomenys, kurie turi būti statistiškai analizuojami: 1) kiekybiniai tolydieji duomenys (masė, ilgis nuo snukio iki išeinamosios angos, kepenų somatinis indeksas, VTG), 2) laiko iki įvykio duomenys, vertinant vystymosi spartą (t. y. dienomis nuo tyrimo pradžios iki NF 62 stadijos), ir 3) rangų skalės duomenys, pateikiami kaip poveikio stiprumo balai ar vystymosi stadijos, nustatytos histopatologiniais vertinimais.
60. Rekomenduojama taip parengti bandymo planą ir pasirinkti statistinį kriterijų, kad būtų galima pakankamai patikimai nustatyti biologiškai svarbius vertinamųjų baigčių pokyčius,

kai ataskaitoje reikia pateikti NOEC ar ECx. Statistines duomenų analizes (apskritai atliekamas kartotinių bandinių vidurkių pagrindu) patartina atlikti pagal procedūras, aprašytas dokumente dėl ekotoksiškumo duomenų statistinės analizės dabartinių metodų (taikymo gairėse) (33). Šio bandymo metodo 7 priedėlyje pateikta rekomenduojama statistinės analizės sprendimų schema ir rekomendacijos, kaip apdoroti duomenis ir kaip pasirinkti tinkamiausią LAGDA naudoti statistinį kriterijų ar modelį.

61. Jauniklių ėminių duomenys (pvz., augimo duomenys, kepenų somatinis indeksas) turėtų būti analizuojami atskirai pagal genotipinę lytį, nes nustatoma visų varlių genotipinė lytis.

Aktualūs duomenų analizės aspektai

Reikalavimų neatitinkančių kartotinių bandinių ir bandomųjų grupių naudojimas

62. Kai kurie kartotiniai bandiniai ir bandomosios grupės gali nebeatitikti reikalavimų dėl per didelio gaištamumo, kurio priežastis yra aiškus toksiškumas, liga ar techninė klaida. Jei kuri nors bandomoji grupė nebeatitinka reikalavimų dėl ligos ar techninės klaidos, turėtų būti likę trys analizei tinkamos reikalavimus atitinkančios bandomosios grupės su trimis reikalavimus atitinkančiais kartotiniais bandiniais. Jei aiškus toksiškumas paveikia didelės dozės bandomąją grupę arba grupes, patartina, kad būtų galima pateikti analizei bent trijų dozių bandomąsias grupes su trimis reikalavimus atitinkančiais kartotiniais bandiniais (laikantis didžiausios toleruojamos koncentracijos (angl. *Maximum Tolerated Concentration*, MTC) metodo pagal EBPO bandymų gaires (34)). Kiti aiškaus toksiškumo požymiai kartu su gaištamumu gali būti poveikis elgsenai (pvz., plūduriavimas paviršiuje, gulėjimas indo dugne, aukštiekninkas arba neįprastas plaukimas, retas pakilimas į paviršių), morfologiniai pažeidimai (pvz., kraujuojančios žaizdos, pilvo edema) arba įprastų maitinimosi reakcijų slopinimas, kokybiniu atžvilgiu lyginant su kontroliniais gyvūnais.

Tirpiklio kontrolinis bandinys

63. Baigus bandymą turėtų būti įvertintas galimas tirpiklio (jei jis naudojamas) poveikis. Tai daroma atliekant tirpiklio kontrolinės grupės ir skiedimo vandens kontrolinės grupės statistinį palyginimą. Svarbiausios vertinamosios baigtys, į kurias reikia atsižvelgti atliekant šią analizę, yra augimo parametrai (masė ir ilgis), nes jie gali būti paveikti bendrojo toksiškumo. Jei nustatoma statistiškai reikšmingų šių vertinamųjų baigčių skirtumų tarp skiedimo vandens ir tirpiklio kontrolinių grupių, reikėtų, vadovaujantis profesine nuovoka, nuspręsti, ar tai kenkia bandymo tinkamumui. Jei abi kontrolinės grupės skiriasi, cheminės medžiagos paveiktas bandomąsias grupes reikėtų palyginti su tirpiklio kontroline grupe, nebent būtų žinoma, kad geriau atlikti palyginimą su skiedimo vandens kontroline grupe. Jei nėra statistiškai reikšmingo skirtumo tarp abiejų kontrolinių grupių, rekomenduojama bandomosios cheminės medžiagos paveiktas bandomąsias grupes

palyginti su jungtinėmis (tirpiklio ir skiedimo vandens) kontrolinėmis grupėmis, nebent būtų žinoma, kad geriau lyginti tik su skiedimo vandens ar tik su tirpiklio kontroline grupe.

Bandymo ataskaita

64. Bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

- fizinė būseną ir, jei tinka, fizikinės ir cheminės savybės.
- Vienkomponentė medžiaga:
 - fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos svarbios fizikinės ir cheminės savybės;
 - cheminis identifikavimas, toks kaip IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, priemaišų cheminė tapatybė (kai tinka ir jei praktiškai įmanoma) ir kt. (įskaitant bendrosios organinės anglies kiekį, jei tinka).
- Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:
 - kuo išsamesnis apibūdinimas: cheminė tapatybė (žr. pirmiau), kiekybinė sudėtis ir svarbios sudedamųjų dalių fizikinės ir cheminės savybės.

Bandomųjų gyvūnų rūšys:

- mokslinis pavadinimas, padermė (jei žinoma), gavimo šaltinis ir apvaisintų ikų surinkimo metodas bei vėlesnis apdorojimas;
- skoliozės dažnis ankstesniuose kontroliniuose bandiniuose iš tos naudojamos pradinės kultūros.

Bandymo sąlygos:

- apšvietimo laikotarpis (-iai);
- bandymo planas (pvz., kamerų dydis, medžiaga ir vandens tūris, bandymo kamerų ir kartotinių bandinių skaičius, bandomųjų organizmų skaičius kiekviename kartotiniame bandinyje);
- pradinį tirpalų paruošimo metodas ir atnaujinimo dažnumas (reikėtų nurodyti tirpiklį ir jo koncentraciją, kai jis naudojamas);
- bandomosios cheminės medžiagos dozavimo metodas (pvz., siurbliai, skiedimo sistemos);

- regeneravimo našumas pagal šį metodą ir ir nominaliosios bandymui naudojamos koncentracijos vertės, kiekybinio nustatymo riba, išmatuotų verčių vidurkiai ir jų standartiniai nuokrypiai bandymo induose bei metodas, pagal kurį jie nustatyti, taip pat įrodymas, kad tie matavimai parodo bandomosios cheminės medžiagos koncentracijas realiame tirpale;
- skiedimo vandens savybės: pH, kietumas, temperatūra, ištirpusio deguonies koncentracija, bendras chloro kiekis (jei matuojamas), bendras jodo kiekis, bendroji organinė anglis (jei matuojama), suspenduotos kietosios dalelės (jei matuojamos), bandymo terpės druskingumas (jei matuojamas) ir bet kokie kiti atlikti matavimai;
- nominaliosios bandomosios medžiagos koncentracijos vertės, išmatuotų verčių vidurkiai ir jų standartiniai nuokrypiai;
- bandymų induose esančio vandens kokybė, pH, kietumas, temperatūra (matuojama kasdien) ir ištirpusio deguonies koncentracija;
- išsami informacija apie šėrimą (pvz., pašarų rūšis, šaltinis, duodamas kiekis ir dažnis).

Rezultatai:

- įrodymai, kad kontroliniai bandiniai atitinka tinkamumo kriterijus;
- šie kontrolinės grupės (ir tirpiklio kontrolinės grupės, kai ji naudojama) bei bandomųjų grupių duomenys: gaištamumas ir pastebėtos anomalijos, trukmė iki NF 62 stadijos, skydliaukės histologinis vertinimas (tik lervų bandinio), augimas (masė ir ilgis), kepenų somatinis indeksas (tik jauniklių bandinio), genetinis / fenotipinis lyčių santykis (tik jauniklių bandinio), lytinių liaukų, reprodukcinių latakų ir kepenų histopatologinio vertinimo rezultatai (tik jauniklių bandinio) ir VTG kraujo plazmoje (tik jauniklių bandinio, jei nustatomas);
- statistinės analizės metodas ir duomenų apdorojimas (taikytas statistinis kriterijus ar modelis);
- nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC) vertinant kiekvieną atsaką;
- mažiausia pastebėto poveikio koncentracija (LOEC) vertinant kiekvieną atsaką ($\alpha = 0,05$); kiekvieno vertinto atsako ECx vertė, jei taikoma, ir pasikliautinieji intervalai (pvz., 95 %), taip pat jos apskaičiavimui naudoto priderinto modelio grafikas, koncentracijos ir atsako priklausomybės kreivės krypties koeficientas, regresijos modelio formulė, įvertinti modelio parametrai ir jų standartinės paklaidos;
- bet koks nukrypimas nuo bandymo metodo, nukrypimai nuo priimtino kriterijų ir apsvaistytas galimas to poveikis bandymo rezultatui.

65. Teikiant vertinamųjų baigčių matavimų rezultatus turėtų būti pateiktos vidutinės vertės ir jų standartiniai nuokrypiai (jei įmanoma, tiek kartotinio bandinio, tiek koncentracijos pagrindu).
66. Turėtų būti apskaičiuota vidutinė (medianinė) trukmė iki NF 62 vystymosi stadijos kontrolinėse grupėse, kuri turėtų būti pateikta kaip kartotinių bandinių medianinių verčių ir jų standartinio nuokrypio vidurkis. Taip pat bandomosiose grupėse turėtų būti apskaičiuota kiekvienos bandomosios grupės medianinė vertė ir pateikta kaip kartotinių bandinių medianinių verčių ir jų standartinio nuokrypio vidurkis.

LITERATŪRA

- (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 Disruptors. *Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment* (No 150). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (3) Nieuwkoop P. D. 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 Disruptors. *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 A. W., Kosian P. A., Korte J. J., Holcombe G. W., Woodis K. and Degitz S. J. (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 A. W., Korte J. J., Woodis K. K., Bennett B. A., Ostazeski S. and Degitz S. J. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. *General and Comparative Endocrinology* 160: 117-123.
- (13) Tobias M. L., Tomasson J. and Kelley D. B. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. *Journal of Neurobiology* 37: 441-448.
- (14) Qin Z. F., Qin X. F., Yang L., Li H. T., Zhao X. R. and Xu X. B. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. *Aquatic Toxicology* 84: 321-327.
- (15) Porter K. L., Olmstead A. W., Kumsher D. M., Dennis W. E., Sprando R. L., Holcombe G. W., Korte J. J., Lindberg-Livingston A. and Degitz S. J. (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) Šio priedo C.4 skyrius. Lengvo biologinio skaidumo bandymas.
- (18) Šio priedo C.29 skyrius. Lengvas biologinis skaidumas. CO₂ sandariuose induose (viršerdvės bandymas).
- (19) Kahl M. D., Russom C. L., DeFoe D. L. and Hammermeister D. E. (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. *Chemosphere* 39: 539-551.
- (20) Adolfsson-Erici M., Åkerman G., Jahnke A., Mayer P., McLachlan M. S. (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. *Chemosphere*, 86(6): 593-9.
- (21) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. *Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment* (No 23), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

- (22) Hutchinson T. H., Shillabeer N., Winter M. J. and Pickford D. B. (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 B. T. (2005). *Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84 pp.
- (25) Šio priedo C.38 skyrius. Varliagyvių metamorfozės tyrimas.
- (26) Šio priedo C.48 skyrius. Trumpalaikis žuvų reprodukcijos tyrimas.
- (27) Šio priedo C.41 skyrius. Žuvų lytinio vystymosi bandymas.
- (28) Šio priedo C.49 skyrius. Ūmaus toksiškumo žuvų embrionams (FET) bandymas.
- (29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. *Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment*. (No 82) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (30) Grim K. C., Wolfe M., Braunbeck T., Iguchi T., Ohta Y., Tooi O., Touart L., Wolf D. C. and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, *Toxicological Pathology* 37: 415-424.
- (31) Luna L. G. and Coady K. (2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Techniques* 5(3): 194.
- (32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. *Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment* (No 228), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. *Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment* (No 54), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

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

1 priedėlis

TERMINŲ APIBRĖŽTYS

Apikalinė vertinamoji baigtis – tokia vertinamoji baigtis, kai patiriamas poveikis populiacijos lygiu.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

IFA (angl. ELISA) – imunofermentinė analizė.

EC_x – (x % poveikio sukelianti koncentracija) – koncentracija, kuriai esant bandomieji organizmai patiria x % poveikį per tam tikrą veikimo bandomąją medžiagą laikotarpį, palyginti su kontroliniu bandiniu. Pavyzdžiui, EC₅₀ yra koncentracija, kuri, kaip įvertinta, per tam tikrą nustatytą jos ekspozicijos laikotarpį padaro poveikį bandymo vertinamajai baigčiai pusėje (50 %) paveiktos populiacijos.

d. p. a. – dienos po apvaisinimo.

Pratekamosios sistemos bandymas – toks bandymas, kai per bandymo sistemą visu bandomosios medžiagos poveikio laikotarpiu teka nuolatinis bandymo tirpalų srautas.

HPG ašis – pagumburio, hipofizės ir lytinių liaukų ašis.

IUPAC – Tarptautinė teorinės ir taikomosios chemijos sąjunga.

Mažiausia pastebėto poveikio koncentracija (LOEC) – mažiausia bandomoji cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant pastebėtas statistiškai reikšmingas jos poveikis (esant $p < 0,05$), palyginti su kontroline grupe. Tačiau visų LOEC viršijančių bandomosios medžiagos koncentracijų kenksmingas poveikis turėtų būti lygus LOEC poveikiui arba už jį didesnis. Kai šios dvi sąlygos netenkinamos, reikėtų išsamiai paaiškinti, kaip pasirinkta LOEC (taigi ir NOEC) vertė. Rekomendacijų pateikta 7 priedėlyje.

Vidutinė mirtina koncentracija (LC₅₀) – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant, kaip įvertinta, per visą bandymą žūsta 50 % bandomųjų organizmų.

Nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC) – bandomosios medžiagos koncentracija, kiek mažesnė už LOEC, kuri, palyginti su kontroline grupe, per nustatytą veikimo laikotarpį nepadaro statistiškai reikšmingo poveikio ($p < 0,05$).

SMILES – supaprastinto molekulių pateikimo linijine forma specifikacija (angl. *Simplified Molecular Input Line Entry Specification*).

Bandomoji cheminė medžiaga – taikant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

UVCB – nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudedamieji reakcijų produktai ar biologinės medžiagos.

VTG – vitelogeninas, fosfolipoglikoproteininis kiaušinio trynio baltymų pirmtakas, kuris paprastai gaminamas visų kiaušinius dedančių gyvūnų rūšių lytiškai aktyvių patelių organizme.

2 priedėlis**KAI KURIOS SKIEDIMUI TINKAMO VANDENS CHEMINĖS SAVYBĖS**

Medžiaga	Ribinė koncentracija
Kietosios dalelės	5 mg/l
Bendroji organinė anglis	2 mg/l
Nejonizuotas amoniakas	1 µg/l
Bendras chloro kiekis	10 µg/l
Bendras fosforo organinių pesticidų kiekis	50 ng/l
Bendras chloro organinių pesticidų ir polichlorintųjų bifenilų kiekis	50 ng/l
Bendras organinio chloro kiekis	25 ng/l
Aliuminis	1 µg/l
Arsenas	1 µg/l
Chromas	1 µg/l
Kobaltas	1 µg/l
Varis	1 µg/l
Geležis	1 µg/l
Švinas	1 µg/l
Nikelis	1 µg/l
Cinkas	1 µg/l
Kadmis	100 ng/l
Gyvsidabris	100 ng/l
Sidabras	100 ng/l

3 priedėlis**LAGDA BANDYMO SĄLYGOS**

1. Bandomoji rūšis	<i>Xenopus laevis</i>
2. Bandymo tipas	Pratekamosios srovės
3. Vandens temperatūra	Nominalioji temperatūra yra 21 °C. Vidutinė temperatūra per visą bandymą yra 21 ± 1 °C (skirtumai tarp vienos grupės kartotinių bandinių ir tarp bandomųjų grupių neturėtų būti didesni nei 1,0 °C)
4. Apšvietimo kokybė	Liuminescencinės (plataus spektro) lempos, 600–2 000 lux (liumenų/m ²) ties vandens paviršiumi
5. Apšvietimo laikotarpis	12 val. šviesos, 12 val. tamsos
6. Bandymo tirpalo tūris ir bandymo indas (akvariumas)	4–10 l (minimalus vandens gylis 10–15 cm) Stiklinis ar nerūdijančiojo plieno indas
7. Bandymo tirpalų tūrio keitimas	Nuolatinis, užtikrinant ir reikiamų biologinių sąlygų palaikymą, ir cheminės medžiagos veikimą (pvz., visas indo tūris pakeičiamas 5 kartus per parą)
8. Bandomųjų organizmų amžius bandymo pradžioje	Neuwkoop ir Faber (NF) 8–10 vystymosi stadijos
9. Organizmų skaičius kartotiniame bandinyje	20 gyvūnų (embrionų) kiekviename inde (kartotiniame bandinyje) pradedant veikimą bandomąja medžiaga ir 10 gyvūnų (jauniklių) kiekviename inde (kartotiniame bandinyje) po NF 66 stadijos iki veikimo bandomąja medžiaga pabaigos
10. Bandomųjų grupių skaičius	Ne mažiau kaip 4 bandomosios cheminės medžiagos dozių bandomosios grupės ir tinkama kontrolinė grupė arba grupės
11. Kartotinių bandinių skaičius kiekvienoje bandomojoje grupėje	4 kartotiniai bandiniai kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos dozės bandomojoje grupėje ir 8 kartotiniai bandiniai kontrolinėje grupėje arba grupėse
12. Kiekviena bandomosios medžiagos koncentracija veikiamų organizmų skaičius	Ne mažiau kaip 80 gyvūnų kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos dozės bandomojoje grupėje ir ne mažiau kaip 160 kartotinių bandinių gyvūnų kontrolinėje grupėje arba grupėse
13. Skiedimo vanduo	Bet koks vanduo, kuriame gali normaliai augti ir vystytis <i>X. laevis</i> (pvz., šaltinio vanduo ar per aktyvintąsias anglis filtruotas vandentiekio vanduo)

14. Aeravimas	Nebūtinamas, tačiau gali reikėti aeruoti akvariumus, jei ištirpusio deguonies kiekiai nesiekia rekomenduojamų ribų ir maksimaliai padidinamas bandomojo tirpalo srautas.
15. Bandymo tirpale ištirpęs deguonis	Ištirpęs deguonis: ≥ 40 % oro soties vertės arba $\geq 3,5$ mg/l
16. Bandymo tirpalo pH	6,5–8,5 (skirtumai tarp vienos grupės kartotinių bandinių ir tarp bandomųjų grupių neturėtų būti didesni nei 0,5)
17. Bandymo tirpalo kietumas ir šarminumas	10–250 mg CaCO_3 /l
18. Šėrimo režimas	(Žr. 4 priedėlį)
19. Veikimo bandomąja medžiaga laikotarpis	Nuo NF 8–10 vystymosi stadijos iki 10 savaičių po vidutinio (medianinio) laiko tarpsnio, kuriuo pasiekta NF 62 stadija vandens ir (arba) tirpiklio kontrolinėje grupėje (ilgiausiai 17 savaičių)
20. Biologinės vertinamosios baigtys	Gaištamumas (ir išvaizdos anomalijos), trukmė iki NF 62 stadijos (lervų ėminio), skydliaukės histologinis vertinimas (lervų ėminio), augimas (masė ir ilgis), kepenų somatinis indeksas (jauniklių ėminio), genetinis / fenotipinis lyčių santykis (jauniklių ėminio), lytinių liaukų, reprodukcinių latakų, inkstų ir kepenų histopatologija (jauniklių ėminio) ir vitelogeninas kraujo plazmoje (jauniklių ėminio, nebūtinai)
21. Bandymo tinkamumo kriterijai	Ištirpęs deguonis turėtų sudaryti >40 % oro soties vertės; vidutinė vandens temperatūra turėtų būti 21 ± 1 °C, o skirtumai tarp vienos grupės kartotinių bandinių ir tarp bandomųjų grupių turėtų būti $<1,0$ °C; bandomojo tirpalo pH turėtų būti tarp 6,5 ir 8,5; gaištamumas kontrolinėje grupėje turėtų būti ≤ 20 % kiekviename kartotiniame bandinyje, o vidutinė trukmė iki NF 62 stadijos kontrolinėje grupėje turėtų būti ≤ 45 dienos; bandomųjų organizmų vidutinė masė NF 62 stadijoje ir užbaigus tyrimą kontroliniuose bandiniuose ir tirpiklio kontroliniuose bandiniuose (jei jie naudojami) turėtų siekti atitinkamai $1,0 \pm 0,2$ ir $11,5 \pm 3$ g; turėtų būti gauta įrodymų, kad bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos tirpale buvo tinkamai palaikomos vidutinių išmatuotų verčių ± 20 % tikslumu.

4 priedėlis

ŠĖRIMO REŽIMAS

Reikėtų pažymėti, kad nors rekomenduojamas šis šėrimo režimas, galima rinktis ir kitokias alternatyvas, jei bandomųjų organizmų augimo ir vystymosi sparta yra tinkama.

Lervų šėrimas

Lervų šėrimo raciono paruošimas

- A. 1:1 (tūrio) upėtakių pradinio pašaro: dumblių / *TetraFin*® (ar lygiaverčio):
1. upėtakių pradinis pašaras: maišytuvu dideliu greičiu per 20 sekundžių suplakama 50 g upėtakių pradinio pašaro (smulkių granulių arba miltelių) su 300 ml tinkamo filtruoto vandens;
 2. dumblių / *TetraFin*® (ar lygiavertis) mišinys: maišytuvu dideliu greičiu per 40 sekundžių suplakama 12 g spirulinų dumblių granulių su 500 ml filtruoto vandens, suplakama 12 g *Tetrafin*® (arba lygiaverčio pašaro) su 500 ml filtruoto vandens ir šie mišiniai sujungiami, kad susidarytų 1 l mišinio, kuriame būtų 12 g/l spirulinų ir 12 g/l *Tetrafin*® (ar lygiaverčio pašaro);
 3. sujungiama po vienodą tūrį sumaišyto upėtakių pradinio pašaro su dumblių ir *TetraFin*® (ar lygiaverčio pašaro) mišiniu.
- B. Sūriavandenės krevetės

15 ml sūriavandenių krevečių kiaušinėlių inkubuojama 1 l sūraus vandens (paruošiamo dedant 20 ml NaCl į 1 l dejonizuoto vandens) iki išsiritimo. Po aeravimo 24 valandas kambario temperatūroje, nuolatinio apšvietimo sąlygomis, surenkamos sūriavandenės krevetės. Sustabdžius aeravimą jos trumpą laiką (30 min.) palaikomos, kad nusėstų ant dugno. Į indo paviršių iškilusios cistos nupilamos ir išmetamos, o krevetės perkošiamos per tinkamus filtrus ir įpilama filtruoto vandens, kad susidarytų 30 ml tūris.

Šėrimo protokolai

1 lentelėje pateiktos gairės dėl pašaro, naudojamo lervų stadijos gyvūnams šerti veikimo bandomąja medžiaga etape, rūšies ir kiekio. Gyvūnai turėtų būti šeriami tris kartus per dieną nuo pirmadienio iki penktadienio ir kartą per dieną savaitgaliais.

1 lentelė. *X. laevis* lervų šėrimo režimas pratekamosios sistemos sąlygomis

Laikas*	Upėtakių pradinis pašaras: dumbliai / <i>TetraFin</i> ® (ar lygiavertis)	Sūriavandenės krevetės
---------	--	------------------------

(po apvaisinimo)	Darbo dienomis (3 kartus per dieną)	Savaitgaliais (kartą per dieną)	Darbo dienomis (du kartus per dieną)	Savaitgaliais (kartą per dieną)
4–14 dienos (0–1 savaitės)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (nuo 8 iki 15 dienos)	0,5 ml (nuo 8 iki 15 dienos)
2 savaitė	0,67 ml	2,4 ml	1 ml (nuo 16 dienos)	1 ml (nuo 16 dienos)
3 savaitė	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
4 savaitė	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
5 savaitė	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
6 savaitė	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
7 savaitė	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
8–10 savaitės	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

* 0 diena yra ta diena, kurią atliekama hCG injekcija.

Perėjimas nuo lervų prie jauniklių šėrimo raciono

Kai lervos baigia metamorfozę, pereinama prie jauniklių šėrimo raciono, kaip paaiškinta toliau. Šiame pereinamajame etape lervų šėrimo racioną reikėtų mažinti, didinant jauniklių raciono dalį. Tai galima pasiekti proporcingai mažinant lervų pašaro dalį ir proporcingai didinant jauniklių pašaro dalį, kai kiekviena penkių buožgalvių grupė pasiekia NF 62 stadiją ir artėja metamorfozės pabaiga NF 66 stadijoje.

Jauniklių šėrimas

Jauniklių šėrimo racionas

Kai baigiasi metamorfozė (66 stadija), pakeičiamas šėrimo režimas, pereinant prie aukščiausios rūšies grimztančio varlių pašaro 3/32 colio dydžio granulėmis (*Xenopus Express*TM, Florida, JAV) arba lygiaverčio pašaro, ir šeriama tik juo.

Grūstų granulių paruošimas lervoms, pereinančioms į jauniklio stadiją

Grimztančio varlių pašaro granulės trumpai pasmulkinamos kavos malūnėliu, maišytuvu arba grūstuvėje, maždaug 1/3 sumažinant granulių dydį. Per ilgai smulkinti, kol pašaras virst miltais, nepatartina.

Šėrimo protokolai

2 lentelėje pateiktos gairės dėl pašaro, naudojamo jauniklių ir suaugusių gyvūnų gyvenimo

stadijose, rūšies ir kiekio. Gyvūnai turėtų būti šeriami kartą per parą. Reikėtų pažymėti, kad vykstant gyvūnų metamorfozei, jie turėtų ir toliau gauti dalį sūriavandenių krevečių pašaro, iki >95 % gyvūnų baigs metamorfozę.

Gyvūnai neturėtų būti šeriami tą dieną, kurią baigiamas bandymas, kad pašaras nepaveiktų masės matavimų.

2 lentelė. *X. laevis* jauniklių šėrimo režimas pratekamosios sistemos sąlygomis. Pažymėtina, kad gyvūnai iki metamorfozės, įskaitant tuos, kurių metamorfozė vėluoja dėl cheminės medžiagos veikimo, negali būti nesmulkintų granulių.

Laikas (savaitės po vidutinės (medianinės) metamorfozės dienos)	Susmulkintų granulių tūris (mg kiekvienam varlės jaunikliui)	Nesmulkintų granulių tūris (mg kiekvienam varlės jaunikliui)
Kai gyvūnai baigia metamorfozę	25	0
0–1 savaitės	25	28
2–3 savaitės	0	110
4–5 savaitės	0	165
6–9 savaitės	0	220

* 0 savaitės pirmoji diena yra vidutinė (medianinė) kontrolinių gyvūnų metamorfozės diena.

5 priedėlis

GENETINĖS LYTIES NUSTATYMAS (SKIRSTYMAS PAGAL GENETINĘ LYTĮ)

Xenopus laevis rūšies gyvūnų skirstymo pagal genetinę lytį metodas pagrįstas Yoshimoto *et al.* (2008). Išsamiai aprašytas genotipo nustatymo procedūras, jei reikia, galima gauti iš šio leidinio. Alternatyvūs metodai (pvz., didelio našumo qPGR) gali būti naudojami, jei laikomi tinkamais.

***X. laevis* pradmenys**

DM-W žymuo

Tiesioginis: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Atvirkštinis: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Teigiamas kontrolinis bandinys

Tiesioginis: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Atvirkštinis: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

DNR gryninimas

DNR iš raumens ar odos audinio išgryninamas naudojant, pvz., „Qiagen“ rinkinį „DNeasy Blood and Tissue Kit“ (cat # 69506) ar panašų produktą pagal jo naudojimo instrukcijas. DNR galima eliuuoti iš nugarkaulio naudojant mažiau buferinio tirpalo, gaunant labiau koncentruotus pavyzdžius, jei manoma, kad tai reikalinga pagal PGR metodą. Atminkite, kad DNR yra gana stabili, todėl reikėtų stengtis vengti kryžminio užteršimo, dėl kurio patinai galėtų būti klaidingai palaikyti patelėmis, ar atvirkščiai.

Polimerazės grandininė reakcija (PGR)

1 lentelėje pateiktas ėminių ėmimo protokolas naudojant preparatą JumpStart™ *Taq* (gamintojas „Sigma“).

1 lentelė. Ėminių ėmimo protokolas naudojant „Sigma“ JumpStart™ *Taq*

Pagrindinis mišinys	1x (μl)	[galutinis]
---------------------	---------	-------------

NFW	11	-
10X buferis	2,0	-
MgCl ₂ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP (po 10mM)	0,4	200 μM
Žymens tiesiog. pradmuo (8 μM)	0,8	0,3 μM
Žymens atvirkšt. pradmuo (8 μM)	0,8	0,3 μM
Kontrolinis tiesiog. pradmuo (8 μM)	0,8	0,3 μM
Kontrolinis atvirkšt. pradmuo (8 μM)	0,8	0,3 μM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 vnt./μl
DNR matrica	1,0	~200 pg/μl

Pastaba. Rengdami pagrindinius mišinius, jų paruoškite daugiau, atsižvelgdami į bet kokią galimą nuostolį imant pipete (pvz., 25x turėtų būti naudojama tik 24 reakcijoms).

Reakcija:

Pagr. mišinys 19,0 μl

Matrica 1,0 μl

Iš viso 20,0 μl

Apdorojimo termocikleriu pobūdis:

1 etapas. 94 °C 1 min.

2 etapas. 94 °C 30 s

3 etapas. 60 °C 30 s

4 etapas. 72 °C 1 min.

5 etapas. Pereiti prie 2 etapo. 35 ciklai

6 etapas. 72 °C 1 min.

7 etapas. 4 °C laikymas

PGR produktai gali būti iškart apdorojami gelyje arba laikomi 4 °C temperatūroje.

Agarozės gelio elektroforezė (3 %) (pavyzdinis protokolas)*50X TAE*

Tris 24,2 g
 Ledinė acto rūgštis 5,71 ml
 Na₂ (EDTA)·2H₂O 3,72 g
 Įpilti vandens iki 100 ml

1X TAE

H₂O 392 ml
 50X TAE 8 ml

3:1 agarozė

3 dalys *NuSieve*[™] GTG[™] agarozės
 1 dalis „Fisher“ mažos elektroendoosmozės (EEO) agarozės

Metodas

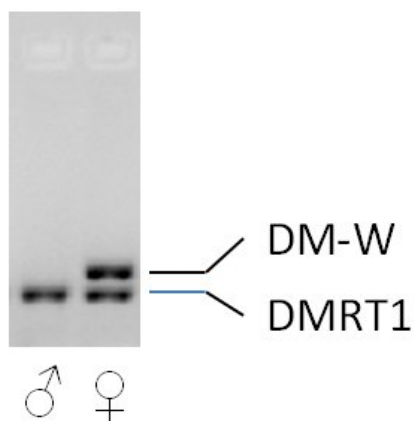
1. Paruošiamas 3 % gelis dedant 1,2 g agarozės mišinio į 43 ml 1X TAE. Gautas mišinys pamaišomas sukant indą, kad išsisklaidytų dideli gumulai.
2. Agarozės mišinys kaitinamas mikrobangų krosnelėje, kol visiškai ištirpsta (vengti užvirimo). Šiek tiek ataušinamas.
3. Įdedama 1,0 µL etidžio bromido (10 mg/ml). Mišinys pamaišomas sukant kolbą. Įsidėmėtina, kad etidžio bromidas yra mutagenas, todėl, kiek techniškai įmanoma, šiame etape reikėtų rinktis kitas medžiagas, siekiant sumažinti riziką darbuotojų sveikatai¹.
4. Gelis įpilamas į formą, į kurią įdėtos šukutės, ir visiškai atvėsinaamas.
5. Gelis dedamas į aparatą ir padengiamas 1X TAE.

¹ Pagal 2004 m. balandžio 29 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyvos 2004/37/EB dėl darbuotojų apsaugos nuo rizikos, susijusios su kancerogenų arba mutagenų poveikiu darbe (šeštoji atskira direktyva, kaip numatyta Direktyvos 89/391/EEB 16 straipsnio 1 dalyje) (OL L 158, 2004 4 30, p. 50), 4 straipsnio 1 dalį.

6. Pridedama 1 μ l 6x įkrovos dažų kiekvienam 10 μ l PGR produkto.
7. Ėminiai pipete perkeliama į plokštelės duobutes.
8. ~20 min. veikiama pastovios 160 voltų įtampos srove.

1 diagramoje pateiktas agarozės gelio atvaizdas, kuriame matyti juostinės žymės, būdingos vyriškos ir moteriškos lyties individams.

1 diagrama. Agarozės gelio atvaizdas, kuriame matyti juostinės žymės, būdingos vyriškos lyties (♂) individui (viena juosta ~203 bp: DMRT1), ir moteriškos lyties (♀) individui (dvi juostos ~259 bp: DM-W ir 203 bp: DMRT1).



LITERATŪRA

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 priedėlis

VITELOGENINO MATAVIMAS

Vitelogenino (VTG) matavimas atliekamas taikant imunofermentinės analizės (IFA, angl. ELISA) metodą, kuris iš pradžių buvo sukurtas juodųjų drūtagalvių rainių VTG matuoti (Parks *et al.*, 1999). Šiuo metu *X. laevis* antikūnų neįmanoma įsigyti iš komercinių tiekėjų. Tačiau kadangi turima daug informacijos apie šį baltymą ir yra galimybė naudotis ekonomiškai efektyvios komercinės antikūnų gamybos paslaugomis, galima pagrįstai tikėtis, kad laboratorijos gebės lengvai sukurti IFA metodą šiam matavimui atlikti (Olmstead *et al.*, 2009). Olmstead *et al.* (2009) taip pat pateikė šio tyrimo, pritaikyto *X. tropicalis* VTG matavimui atlikti, apibūdinimą, kaip parodyta toliau. Pagal šį metodą naudojamas antikūnas, paruoštas *X. tropicalis* VTG, tačiau yra žinoma, kad jis tinka ir *X. laevis* VTG. Pažymėtina, kad galima taikyti ir nekonkurencinės IFA metodus ir kad juos taikant aptikimo ribos gali būti žemesnės negu pagal toliau aprašytą metodą.

Medžiagos ir reagentai

- Preadsorbuotas 1-ojo antikūno (Ab) serumas

1 dalis anti-*X. tropicalis* VTG 1-ojo Ab serumo sumaišoma su 2 dalimis kontrolinių patinų kraujo plazmos ir paliekama kambario temperatūroje apie 75 minutes, tada padedama ant ledo 30 min, centrifuguojama >20 000 g 1 val. 4 °C temperatūroje, pašalinamas supernatantas, suskirstoma alikvotinėmis dalimis ir laikoma –20 °C temperatūroje.

- 2-asis antikūnas

Ožkos anti-triušio IgG-HRP konjugatas (pvz., Bio-Rad 172-1019)

- VTG standartinis preparatas

Išgrynintas *X. laevis* VTG, 3,3 mg/ml.

- TMB (3,3',5,5' tetrametil-benzidinas) (pvz., KPL 50-76-00; arba Sigma T0440)
- Normalusis ožkos serumas (NGS) (pvz., Chemicon® S26 – 100 ml)
- 96 duobučių EIA polistireno mikrotitravimo plokštelės (pvz., ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher: 07-200-35)
- 37 °C hibridizavimo krosnelė (arba greito nusistovėjimo oro inkubatorius) plokštelėms, vandens vonelė mėgintuvėliams
- Kita įprasta laboratorinė įranga, cheminės medžiagos ir reikmenys.

Receptūra

Padengimo buferinis tirpalas (50 mM karbonatinis buferinis tirpalas, pH 9.6):

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

10X PBS (0,1 M fosfato, 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
vanduo	810 ml

Plovimo buferinis tirpalas (PBST):

10X PBS	100 ml
vanduo	900 ml

Nustatoma 7,3 pH vertė įdedant 1 M HCl, tada įdedama 0,5 ml „Tween-20“

Tyrimo buferinis tirpalas:

Normalusis ožkos serumas (NGS)	3,75 ml
Plovimo buferinis tirpalas	146,25 ml

Ėminių ėmimas

Kraujas paimamas heparinizuotu mikrohermatokrito vamzdeliu ir padedamas ant ledo. Po centrifugavimo 3 minutes vamzdelis įpjaunamas, atveriamas ir plazma išleidžiama į 0,6 ml tūrio mikrocentrifugos mėgintuvėlius, į kuriuos dėta 0,13 vnt. liofilizuoto aprotinino (šie mėgintuvėliai paruošiami iš anksto, įdedant tinkamą kiekį aprotinino, užšaldant ir liofilizuojant greituoju vakuuminiu džiovintuvu, žemoje temperatūroje, kol išdžiūsta). Plazma iki analizės laikoma –80 °C temperatūroje.

Vienos plokštelės procedūra

Plokštelės padengimas

20 µl išgryninto VTG sumaišoma su 22 ml karbonatinio buferinio tirpalo (galutinis kiekis 3 µg/ml). Po 200 µl šio mišinio įpilama į kiekvieną naudojamos 96 duobučių mikrotitravimo

plokštelės duobutę. Plokštelė uždengiama lipniąja plėvele ir paliekama inkubuotis per naktį 37 °C temperatūroje 2 valandas (arba 4 °C per naktį).

Plokštelės blokavimas

Blokavimo tirpalas ruošiamas įpilant 2 ml normaliojo ožkos serumo (NGS) į 38 ml karbonatinio buferinio tirpalo. Dengiamasis tirpalas pašalinamas ir plokštelė purtoma, kol išdžiūsta. Į kiekvieną duobutę įpilama 350 µl blokavimo tirpalo. Uždengiama lipniąja plėvele ir inkubuojama 37 °C temperatūroje 2 valandas (arba 4 °C per naktį).

Standartinių preparatų paruošimas

5,8 µl išgryninto VTG standartinio preparato sumaišoma su 1,5 ml tyrimo buferinio tirpalo 12x75 mm borosilikatiniame vienkartiname stiklo mėgintuvėlyje. Taip gaunamas 12 760 ng/ml mišinys. Tada atliekamas serijinis skiedimas įpilant 750 µl pirmiau atskiesto mišinio į 750 µl tyrimo buferinio tirpalo, gaunant galutines koncentracijas 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 ir 50 ng/ml.

Ėminių paruošimas

Iš pradžių plazma praskiedžiama tyrimo buferiniu tirpalu santykiu 1:300 (pvz., sumaišant 1 µl plazmos su 299 µl tyrimo buferinio tirpalo). Jei tikimasi gauti didelį VTG kiekį, gali reikėti atskiesti papildomai arba daugiau. Reikia stengtis, kad B/B₀ išliktų standartų intervale. Kai ėminiuose nėra reikšmingo VTG kiekio, pvz., kontrolinių patinų ir patelių (kurie visi yra nesubrendę), naudojamas skiedimas santykiu 1:30. Mažiau atskiestuose ėminiuose gali pasireikšti nepageidaujamas matricos efektas.

Papildomai rekomenduojama kiekvienoje plokštelėje ištirti teigiamą kontrolinį ėminį. Jis paimamas iš jungtinio plazmos ėminio, kuriame yra dideli susidariusio VTG kiekiai. Šis jungtinis ėminys iš pradžių atskiedžiamas NGS, padalijamas alikvotinėmis dalimis ir laikomas –80 °C temperatūroje. Kiekvienai plokštei skirta alikvotinė dalis atitirpinama, papildomai praskiedžiama tyrimo buferiniu tirpalu ir apdorojama panašiai kaip bandinys.

Inkubavimas naudojant 1-ąjį antikūną

1-asis antikūnas (Ab) paruošiamas 1:2000 santykiu praskiedžiant preadsorbuotą 1-ojo Ab serumą tyrimo buferiniu tirpalu (pvz., jo 8 µl dedama į 16 ml tyrimo buferinio tirpalo). 300 µl 1-ojo Ab tirpalo sumaišoma su 300 µl ėminio / standartinio preparato stikliniame mėgintuvėlyje. B₀ mėgintuvėlyje panašiai paruošiama 300 µl tyrimo buferinio tirpalo su 300 µl antikūno. Be to, reikėtų paruošti NSB (angl. *non-specific binding* – nespecifinio surišimo) mėgintuvėlį naudojant tik 600 µl tyrimo buferinio tirpalo, t. y. be antikūno (Ab). Mėgintuvėliai uždengiami laboratorine plėvele ir nestipriai suplakami. Inkubuojama 1 valandą 37 °C temperatūros vandens vonelėje.

Plokštelės plovimas

Prieš pat baigiant 1-ąjį Ab inkubavimą, plokštelė nuplaunama. Tai daroma iškratant jos turinį ir ją nusauginant sugeriamuoju popieriumi. Tada duobutės pripildomos 350 µl plovimo tirpalo, jis išpilamas ir plokštelė nusauginama sugeriamuoju popieriumi. Galima naudoti daugiakanalę automatinę pipetę arba plokštelių plautuvą. Plovimo etapas pakartojamas dar du kartus – iš viso trys plovimai.

Plokštelės įkrovimas

Po to, kai plokštelė nuplaunama, mėgintuvėliai išimami iš vandens vonelės ir nestipriai suplakami. Po 200 µl iš kiekvieno ėminio, standartinio preparato, B₀ ir NSB mėgintuvėlio įpilama į kartotines plokštelės duobutes. Plokštelė uždengiama lipniaja plėvele ir paliekama inkubuotis 1 valandą 37 °C temperatūroje.

Inkubavimas naudojant 2-ąjį antikūną

Pirmesnio etapo inkubavimo pabaigoje plokštelė turėtų būti vėl tris kartus nuplauta, kaip aprašyta pirmiau. Atskiestas 2-asis antikūnas (Ab) paruošiamas sumaišant 2,5 µl 2-ojo Ab su 50 ml tyrimo buferinio tirpalo. 200 µl atskiesto 2-ojo Ab įpilama į kiekvieną duobutę, sandariai uždengiama, kaip aprašyta pirmiau, ir inkubuojama 1 valandą 37 °C temperatūroje.

Substrato dėjimas

Baigus inkubavimą su 2-uoju Ab, plokštelė tris kartus nuplaunama, kaip aprašyta pirmiau. Tada į kiekvieną duobutę įdedama 100 µl TMB substrato. Palaikoma 10 minučių, kad įvyktų reakcija (patartina saugoti nuo ryškios šviesos). Reakcija sustabdoma įpilant 100 µl 1 M fosforo rūgšties. Tai pakeičia spalvą iš mėlynos į ryškiai geltoną. Sugerties geba matuojama 450 nm ilgio bangomis, naudojant plokštelių skaitytuvą.

Apskaičiuojama B/B₀ vertė

Vidutinė NSB vertė atimama iš visų išmatuotų verčių. Kiekvieno ėminio ir standartinio preparato B/B₀ apskaičiuojama dalijant sugerties vertę (B) iš vidutinės B₀ ėminio sugerties.

Gaunama standartinė kreivė ir nustatomi nežinomi kiekiai

Standartinė kreivė gaunama naudojantis kokia nors pagalbine kompiuterine grafikų kūrimo įranga (pvz., *Slidewrite*TM ar *Sigma Plot*[®]), kuria ekstrapoliuojamas kiekis iš ėminio B/B₀, remiantis standartinių preparatų B/B₀. Paprastai šis dydis pavaizduojamas logaritminėje skalėje, o kreivė yra sigmoidinio pavidalo. Tačiau kai naudojami siauro intervalo standartiniai preparatai, ji gali atrodyti kaip tiesė. Iš ėminių nustatyti kiekiai patikslinami pagal skiedimo koeficientą ir ataskaitoje užrašomi kaip plazmos VTG/ml (miligramais).

Minimalių aptikimo ribų (MDL) nustatymas

Dažnai, ypač tiriant normalius patinus, nėra aišku, kaip ataskaitoje pateikti mažų verčių rezultatus. Šiais atvejais turėtų būti naudojamos 95 % pasikliautinumo ribos siekiant nustatyti, ar atitinkamą vertę reikėtų nurodyti kaip nulį, ar kaip kokį nors kitą skaičių. Jei ėminio rezultatas yra nulinio standarto (B_0) pasikliautinajame intervale, pranešamas rezultatas turėtų būti 0. Minimalus aptikimo lygis yra mažiausia standartinė vertė, kuri nuolat skiriasi nuo nulinio standarto; t. y. abu pasikliautinieji intervalai nesutampa. Bet kokio ėminio rezultato, kuris atitinka ar viršija minimalaus aptikimo lygio pasikliautinumo ribą, apskaičiuotoji vertė pranešama ataskaitoje. Jei ėminio vertė yra tarp nulinio standarto ir minimalaus aptikimo lygio intervalų, ataskaitoje reikėtų nurodyti, kad to ėminio vertė yra lygi pusei minimalaus aptikimo lygio.

LITERATŪRA

Olmstead A. W., Korte J. J., Woodis K. K., Bennett B. A., Ostazeski S., Degitz S. J. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. *General and Comparative Endocrinology* 160: 117-123.

Parks L. G., Cheek A. O., Denslow N. D., Heppell S. A., McLachlan J. A., LeBlanc G. A., Sullivan C. V. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 123: 113-125.

7 priedėlis

STATISTINĖ ANALIZĖ

Per LAGDA bandymą gaunami trijų formų duomenys statistinei analizei: 1) kiekybiniai tolydieji duomenys, 2) laiko iki įvykio duomenys, vertinant vystymosi spartą (trukmė iki NF 62 stadijos), ir 3) rangų skalės duomenys, pateikiami kaip poveikio stiprumo balai ar vystymosi stadijos, nustatytos histopatologiniais vertinimais. 1 diagramoje parodyta rekomenduojama LAGDA statistinės analizės sprendimų schema. Be to, toliau pateikta nuorodų į leidinius, kuriais gali reikėti remtis atliekant LAGDA matavimų statistinę analizę. Kaip parodyta analizės sprendimų schemoje, gaištamumo, augimo (masės ir ilgio) ir kepenų somatinio indekso (LSI) matavimų rezultatai turėtų būti analizuojami „kitų vertinamųjų baigčių“ dalyje.

Tolydieji duomenys

Pirmiausia turėtų būti patikrintas tolydžiųjų vertinamųjų baigčių duomenų monotoniškumas, atliekant duomenų rangų transformaciją, pritaikant ANOVA modelį ir palyginant tiesinius ir kvadratinus kontrastus. Jei duomenys yra monotoniški, reikėtų taikyti žingsnio žemyn Jonckheere-Terpstra trendo kriterijų kartotinių bandinių medianinėms vertėms ir paskesnių analizių atlikti nereikia. Duomenims, kurie yra normaliai pasiskirstę su vienalytėmis dispersijomis, tinkama alternatyva yra žingsnio žemyn Williams'o kriterijus. Jei duomenys yra nemonotoniški (kvadratinis kontrastas yra reikšmingas, o tiesinis – nereikšmingas), jie turėtų būti analizuojami naudojant mišraus poveikio ANOVA modelį. Tada reikėtų įvertinti duomenų normalumą (geriausia taikant Shapiro-Wilk'o arba Anderson-Darling'o kriterijų) ir dispersijos vienalytiškumą (geriausia taikant Levene'o kriterijų). Abu kriterijai taikomi pagal mišraus poveikio ANOVA modelį gautoms liekanoms. Vietoj šių formalių normalumo ir dispersijos vienalytiškumo kriterijų taikymo galima remtis ekspertų nuomone, nors pirmenybė teiktina formaliems kriterijams. Jei duomenys yra normaliai pasiskirstę su vienalyte dispersija, tai atitinka mišraus poveikio ANOVA prielaidas ir reikšmingas dozės poveikis nustatomas pagal Dunnett'o kriterijų. Kai nustatomas nenormalumas ar dispersijos nevienalytiškumas, tai neatitinka Dunnett'o kriterijaus prielaidų ir siekiama atlikti normalizuojančią, dispersiją stabilizuojančią transformaciją. Jei tokios transformacijos nerandama, tuomet reikšmingas dozės poveikis nustatomas pagal Dunn'o kriterijų. Kai tik įmanoma, reikėtų taikyti vienpusį kriterijų, o ne dvipusį kriterijų, tačiau norint nustatyti, kas tinka konkrečiai vertinamajai baigčiai, reikia ekspertų vertinimo.

Gaištamumas

Turėtų būti analizuojami viso bandymo laikotarpio gaištamumo duomenys, kurie turėtų būti išreikšti kaip bet kuriame konkrečiame inde žuvusių gyvūnų dalis. Tų buožgalvių, kurie nebaigia metamorfozės per nustatytą laikotarpį, lervų poėminio kohorte esančių buožgalvių, tų jauniklių varlių, kurios numarinamos mažinant gyvūnų skaičių, ir bet kokių

gyvūnų, kurie žūsta dėl bandymo vykdytojo klaidos, duomenys turėtų būti laikomi atmetamais duomenimis ir neįtraukiami į vardiklį apskaičiuojant procentinius dydžius. Prieš bet kokią statistinę analizę turėtų būti atlikta gaištamumo proporcijų kvadratinės šaknies arksinuso transformacija. Alternatyva yra naudoti žingsnio žemyn Cochran-Armitage'o kriterijų, galbūt su Rao-Scott'o pataisa, kai yra per didelė dispersija.

Masė ir ilgis (augimo duomenys)

Patinai ir patelės metamorfozės metu nėra lytiškai dimorfiški, todėl lervų poėminio augimo duomenys turėtų būti analizuojami neatsižvelgiant į lytį. Tačiau jauniklių augimo duomenys turėtų būti analizuojami atskirai pagal genetinę lytį. Gali reikėti atlikti šių vertinamųjų baigčių logaritminę transformaciją, nes dydžio duomenims neretai yra būdingas lognormalumas.

Kepenų somatinis indeksas (LSI)

Kepenų masės duomenys turėtų būti normalizuojami kaip viso kūno masės proporcijos (t. y. LSI) ir analizuojami atskirai pagal genetinę lytį.

Trukmė iki NF 62 vystymosi stadijos

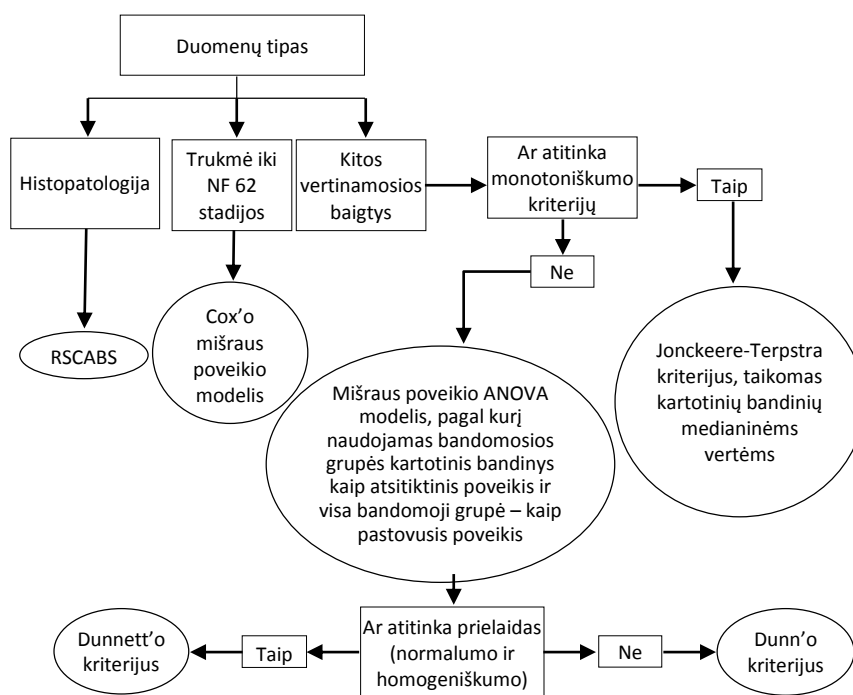
Laiko iki metamorfozės duomenys turėtų būti traktuojami kaip laiko iki įvykio duomenys, ir bet kokių nugaišusių gyvūnų ar individų, kurie nepasiekė NF 62 stadijos per 70 dienų, duomenys traktuojami kaip „iš dešinės“ (dešinėje grafiko pusėje) atmetami duomenys (t. y. tikroji vertė yra didesnė nei 70 dienų, tačiau tyrimas baigiamas prieš tai, kai gyvūnai pasiekia NF 62 stadiją per 70 dienų). Bandymo užbaigimo data turėtų būti nustatyta pagal medianinę trukmę iki NF 62 stadijos metamorfozės užbaigimo skiedimo vandens kontroliniuose bandiniuose. Medianinė trukmė iki metamorfozės užbaigimo galėtų būti nustatoma pagal Kaplan-Meier'io produkto-ribos įvertinius (angl. *product-limit estimators*). Ši vertinamoji baigtis turėtų būti analizuojama naudojant mišraus poveikio Cox'o proporcinių pavojų modelį, pagal kurį atsižvelgiama į tyrimo kartotinių bandinių struktūrą.

Histopatologiniai duomenys (poveikio stiprumo balai ir vystymosi stadijos)

Histopatologiniai duomenys pateikiami poveikio stiprumo balų arba vystymosi stadijų forma. RSCABS kriterijus (angl. *Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices* – Rao-Scott'o patikslintas Cochran-Armitage'o žingsnio žemyn trendo kriterijus) taikomas kiekvienam poveikio lygiui vertinant histopatologinį atsaką (Green *et al.*, 2014). Pagal Rao-Scott'o pataisą taikant šį kriterijų įtraukiamas bandymo planas su kartotinių bandinių indais. Pagal „pjūvių“ (angl. *by Slices*) procedūrą įtraukiama biologinė prielaida, kad poveikis didėja didinant dozes arba koncentracijas, o kartu toliau naudojami bandomųjų individų vertinimai balais ir atskleidžiamas bet kokio nustatyto poveikio dydis. Pagal RSCABS procedūrą ne tik nustatoma, kurios bandomosios grupės statistiškai skiriasi nuo kontrolinių grupių (t. y., jų patologijos didesnės negu kontrolinių gyvūnų), bet ir nustatoma, kuriam poveikio dydžio

balui esant atsiranda šis skirtumas, taip suteikiant labai reikalingą kontekstą analizei. Lytinių liaukų ir reprodukcinį latakų vystymosi stadijos nustatymo atveju reikėtų papildomai apdoroti duomenis, nes pagal RSCABS kriterijų daroma prielaida, kad poveikis didėja kartu su doze. Stebimas poveikis galėtų būti vystymosi vėlavimas arba paspartėjimas. Todėl vystymosi stadijų duomenys turėtų būti analizuojami tokie, kokie pranešti, kad būtų galima nustatyti vystymosi paspartėjimą, o tada prieš antrą analizę duomenys rankiniu būdu pertvarkomi taip, kad būtų galima nustatyti vystymosi vėlavimą.

1 diagrama. LAGDA duomenų statistinės analizės sprendimų schema



LITERATŪRA

Green J. W., Springer T. A., Saulnier A. N., Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33, 1108-1116.

8 priedėlis

SKOLIOZĖS ATVEJŲ DAŽNIO STEBĖSENOS IR MAŽINIMO ASPEKTAI

Idiopatinė skoliozė, paprastai pasireiškianti kaip *Xenopus laevis* buožgalvių „sulenкта uodega“, gali sunkinti bandomųjų populiacijų morfologinius ir elgesio stebėjimus. Reikėtų stengtis, kad skoliozės atvejų būtų kuo mažiau arba visai nebūtų tiek pradinės kultūros auginimo, tiek bandymo sąlygomis. Rekomenduojama, kad per galutinį bandymą vidutinės ar sunkios skoliozės dažnis būtų mažesnis nei 10 %, siekiant padidinti patikimumą, kad atliekant šį bandymą galima nustatyti su bandomosios medžiagos doze susijusį poveikį kitais atžvilgiais sveikų varliagyvių lervų vystymuisi.

Atliekant kasdienius stebėjimus per galutinį bandymą turėtų būti užrašomas ir skoliozės dažnis (individue skaičius), ir jos sunkumas, kai jos atvejų yra. Reikėtų aprašyti anomalijos pobūdį – jos vietą (pvz., iki išeinamosios angos ar po jos) ir išlinkio kryptį (pvz., šoninis ar nugaros-pilvo ašies išlinkimas). Jos sunkumą galima žymėti taip:

nežymi (N) – išlinkio nėra;

maža (1) – nedidelis, šoninis išlinkis po išeinamosios angos; matomas tik gyvūnui esant ramybės būsenos;

vidutinė (2) – šoninis išlinkis po išeinamosios angos; matomas visada, bet judėti netrukdo;

sunki (3) – šoninis išlinkis prieš išeinamąją angą; ARBA bet koks išlinkis, kuris trukdo judėti; ARBA bet koks nugaros-pilvo ašies išlinkis.

JAV aplinkos apsaugos agentūros FIFRA mokslinė patariamoji grupė (FIFRA SAP 2013) peržiūrėjo skoliozės suvestinius duomenis iš penkiolikos varliagyvių metamorfozės tyrimų naudojant *X. laevis* (nuo NF 51 iki 60 ir vėlesnių stadijų) ir pateikė bendrą rekomendaciją, kaip mažinti šios anomalijos paplitimą bandomųjų gyvūnų populiacijose. Šios rekomendacijos yra svarbios LAGDA, nors šis bandymas apima ilgesnį vystymosi laikotarpį.

Ankstesnio neršto sėkmingumo duomenys

Apskritai veislinėms poroms turėtų būti naudojami kokybiški, sveiki suaugę gyvūnai; pašalinant veislines poras, kurių palikuonims pasireiškia skoliozė, laikui bėgant galima iki minimumo sumažinti jos atvejų dažnį. Konkrečiai gali būti naudinga stengtis kuo mažiau naudoti sugautų laukinių veislinių gyvūnų. Veikimo bandomąja medžiaga laikotarpis per LAGDA bandymą pradedamas naudojant NF 8–10 stadijų embrionus, ir bandymo pradžioje praktiškai neįmanoma nustatyti, ar kuriems nors individams pasireikš skoliozė. Taigi,

stebint bandymui naudojamų gyvūnų skoliozės dažnį, kartu reikėtų turėti užrašytus ankstesnės vados rodiklių (įskaitant skoliozės paplitimą tarp bet kokių lervų, kurioms leista vystytis) duomenis. Gali būti naudinga toliau stebėti kiekvienos vados dalį, nenaudojamą konkrečiam tyrimui, ir ataskaitoje pranešti apie tuos stebėjimus (FIFRA SAP 2013).

Vandens kokybė

Svarbu užtikrinti tinkamą tiek pradinei laboratorinių gyvūnų kultūrai, tiek per bandymą naudojamą vandens kokybę. Kartu su vandens kokybės kriterijais, reguliariai vertinamais per toksiškumo vandens organizmams bandymus, gali būti naudinga stebėti, ar netrūksta kokių nors maistinių medžiagų (pvz., vitamino C, kalcio, fosforo), ir tuos trūkumus ištaisyti, taip pat tikrinti, ar nėra per didelių seleno ir vario kiekių – pranešta, kad jie sukelia įvairių laipsnių skoliozę laboratorijoje auginamoms *Rana* sp. ir *Xenopus* sp. varlėms (Marshall *et al.* (1980); Leibovitz *et al.* (1992); Martinez *et al.* (1992); kaip pranešta FIFRA SAP 2013). Naudojant tinkamą šėrimo režimą (žr. 4 priedėlį) ir reguliariai valant rezervuarus pagerėja bendra vandens kokybė ir bandomųjų gyvūnų sveikatos būklė.

Šėrimo racionas

4 priedėlyje pateikta konkrečių rekomendacijų dėl šėrimo raciono, kuris yra sėkmingai naudojamas per LAGDA bandymą. Rekomenduojama patikrinti pašaro šaltinius, ar juose nėra biologinių toksinų, herbicidų ir kitų pesticidų, kurie, kaip žinoma, sukelia *X. laevis* ar kitų vandens gyvūnų skoliozę (Schlenk ir Jenkins, 2013). Pavyzdžiui, tam tikrų cholinesterazės inhibitorių poveikis siejamas su žuvų (Schultz *et al.*, 1985) ir varlių skolioze (Bacchetta *et al.*, 2008).

LITERATŪRA

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. “