



Eiropas Savienības
Padome

Briselē, 2019. gada 25. februārī
(OR. en)

6800/19
ADD 2

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

PAVADVĒSTULE

Sūtītājs:	Eiropas Komisija
Saņemšanas datums:	2019. gada 22. februāris
Saņēmējs:	Padomes Ģenerālsekretariāts
K-jas dok. Nr.:	D060575/02 pielikums
Temats:	Pielikums KOMISIJAS REGULA (ES) .../.. (XXX), ar kuru, pielāgojot tehnikas attīstībai, groza pielikumu Regulai (EK) Nr. 440/2008 par testēšanas metožu noteikšanu saskaņā ar Eiropas Parlamenta un Padomes Regulu (EK) Nr. 1907/2006, kas attiecas uz ķīmikāliju reģistrēšanu, vērtēšanu, licencēšanu un ierobežošanu (REACH)

Pielikumā ir pievienots dokumenta D060575/02 pielikums.

Pielikumā: D060575/02 pielikums

Pielikums (2. daļa no 2)

B.71. ĀDAS *IN VITRO* SENSIBILIZĀCIJAS TESTI, KUROS APSKATĪTS ĀDAS SENSIBILIZĀCIJAS NELABVĒLĪGĀ IZNĀKUMA CEĻA (*AOP*) ATSLĒGNOTIKUMS “DENDRĪTISKO ŠŪNU AKTIVĀCIJA”**VISPĀRĪGS IEVADS****Testēšanas metode, kuras pamatā ir atslēgnotikums “dendrītisko šūnu aktivācija”**

1. Ādas sensibilizators ir viela, kas, nonākot saskarē ar ādu, izraisa alerģisku atbildreakciju, atbilstoši definīcijai, kas dota Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētajā sistēmā (GHS) (1) un Eiropas Savienības (ES) Regulā Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojumu (*CLP* regula)¹. Par to, kādi bioloģiskie atslēgnotikumi ir ādas sensibilizācijas pamatā, ir vispārēja vienprātība. Pašreizējās zināšanas par ķīmiskajiem un bioloģiskajiem mehānismiem, kas saistīti ar ādas sensibilizāciju, ir apkopotas, ESAO [*OECD*] *AOP* programmas ietvaros izveidojot nelabvēlīga iznākuma ceļu (*Adverse Outcome Pathway*, *AOP*) (2) no molekulārā iniciācijas notikuma un starpposma notikumiem līdz nelabvēlīgajai ietekmei, proti, alerģiskam kontaktdermatītam. Šajā gadījumā molekulārais iniciācijas notikums (proti, pirmais atslēgnotikums) ir elektrofīlu vielu kovalenta saistīšanās ar nukleofīlajiem centriem ādas proteīnos. Otrais atslēgnotikums šajā *AOP* notiek keratinocītos un ietver iekaisuma atbildreakcijas, kā arī izmaiņas gēnu ekspresijā, kas asociētas ar konkrētiem šūnu signālceļiem, piem., no antioksidanta/elektrofīla atbildreakcijas elementa (*ARE*) atkarīgiem ceļiem. Trešais atslēgnotikums ir dendrītisko šūnu (DŠ) aktivācija, ko parasti novērtē pēc ekspresētajiem specifiskajiem šūnu virsmas marķieriem, hemokīniem un citokīniem. Ceturtais atslēgnotikums ir T šūnu aktivācija un savairošanās, ko netieši novērtē apakšdzimtas *Murinae* grauzēju limfmezglu lokālās stimulācijas testā (*LLNA*) (3).
2. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (*TG*) Nr. 442E (2017). Tā apraksta *in vitro* testus, kuros apskatīti mehānismi, kas aprakstīti pie ādas sensibilizācijas *AOP* dendrītisko šūnu aktivācijas atslēgnotikuma (2). Šī TM ietver testus,

¹ Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojumu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353/1, 31.12.2008.).

kas palīdz ādas sensibilizatorus nošķirt no ādas nesensibilizatoriem saskaņā ar ANO GHS un CLP regulu.

Šajā TM aprakstīti šādi testi:

- cilvēka šūnu līnijas aktivācijas tests (*h-CLAT*);
 - U937 šūnu līnijas aktivācijas tests (*U-SENSTM*);
 - interleikīna-8 reportierģēna tests (tests *IL-8 Luc*).
3. Šajā testēšanas metodē iekļautie testi no attiecīgās ESAO *TG* testiem var atšķirties ar datu ieguves procedūru un mērījumiem rādījumiem, tomēr tam, lai izpildītu valstu prasības pēc ādas sensibilizācijas *AOP* dendrītisko šūnu aktivācijas atslēgnotikuma testa rezultātiem, vienlaikus izmantojot ESAO datu savstarpējo atzīšanu, šos testus var izmantot bez izšķirības.

Atslēgnotikumā balstītajā testēšanas metodē iekļauto testu konteksts un principi

4. Līdz šim ādas sensibilizācijas novērtēšanai parasti izmantoti laboratorijas dzīvnieki. Ar klasiskām metodēm, kurās izmanto jūrascūciņas, — Magnusona–Kligmana [*Magnusson–Kligman*] maksimalizācijas testu ar jūrascūciņām (*Guinea Pig Maximisation Test, GPMT*) un Bīlera [*Buehler*] testu (TM B.6) (4) — tiek pētīta gan ādas sensibilizācijas inducēšanas fāze, gan tās izsaukšanas fāze. Piekrišanu ir guvuši arī apakšdzimtas *Murinae* grauzēju testi, *LLNA* (TM B.42) (3) un tā divas bezradiācijas modifikācijas, *LLNA: DA* (TM B.50) (5) un *LLNA: BrdU-ELISA* (TM B.51) (6), kuros visos tiek novērtēta vienīgi indukcijas atbildreakcija, jo šie testi dzīvnieku labklājības un objektīva ādas sensibilizācijas inducēšanas fāzes mērījuma ziņā ir pārāki par testiem ar jūrascūciņām.
5. Pēdējā laikā ķīmikāliju ādas sensibilizācijas briesmu potenciāla izvērtēšanas vajadzībām pieņemtas mehānistiskas *in chemico* un *in vitro* testēšanas metodes, kurās apskatīts ādas sensibilizācijas *AOP* pirmais atslēgnotikums (TM B.59; tiešais peptīdreaģētspējas tests — *Direct Peptide Reactivity Assay* (7)) un otrais atslēgnotikums (TM B.60; ARE-Nrf2 luciferāzes testēšanas metode (8)).
6. Šajā testēšanas metodē aprakstītie testi kvantificē vai nu izmaiņas tādu šūnu virsmas marķieru ekspresijā, kas asociēti ar monocītu un DŠ aktivāciju pēc ekspozīcijas sensibilizatoriem (piem., CD54, CD86), vai izmaiņas IL-8 (ar DŠ aktivāciju asociēta citokīna) ekspresijā. Ir ziņas, ka ādas sensibilizatori inducē šūnu membrānu marķieru (piem., CD40, CD54, CD80, CD83 un CD86) ekspresiju, līdztekus inducējot arī proinflamatoros citokīnus (piem., IL-1β un TNF-α) un vairākus hemokīnus, tostarp IL-8 (CXCL8) un CCL3 (9) (10) (11) (12), kas asociēti ar DŠ aktivāciju (2).

7. Tomēr, tā kā DŠ aktivācija ir tikai viens no ādas sensibilizācijas *AOP* (2) (13) atslēgnotikumiem, informācija, kas iegūta testos, kuros tiek mērīti tikai DŠ aktivācijas marķieri vien, var nebūt pietiekama, lai varētu izdarīt secinājumus par ķīmikāliju ādas sensibilizācijas potenciāla esību vai neesību. Tāpēc tiek ierosināts šajā testēšanas metodē aprakstīto testu datus izmantot par palīglīdzekli ādas sensibilizatoru (piem., UN GHS / *CLP* 1. kategorijas sensibilizatoru) nošķiršanā no nesensibilizatoriem integrētā testēšanas un novērtēšanas pieejā (*IATA*) kopā ar citu relevantu papildinformāciju, piem., informāciju, kas iegūta *in vitro* testos, kuros apskatīti citi ādas sensibilizācijas *AOP* atslēgnotikumi, kā arī ar metodēm, kuras neietver testēšanu un kurās pēc analogijas principa (“aplūkot līdzīgu”) tiek izmantota informācija par ķīmiskajiem analogiem (13). Ir publicēti (13) piemēri, kā šajos testos iegūtos datus var izmantot definētās pieejās, t. i., pieejās, kurās standartizēta gan izmantoto informācijas avotu kopa, gan procedūra, kādā no datiem iegūst prognozes, un tos var izmantot kā lietderīgus *IATA* elementus.
8. Šajā testēšanas metodē aprakstītos testus vienus pašus nevar izmantot ne ādas sensibilizatoru klasificēšanai ANO GHS / *CLP* apakškategoriās 1.A un 1.B (iestādēm, kuras izmanto šīs divas neobligātās apakškategorijs), ne potences prognozēšanai drošuma novērtējuma lēmumu vajadzībām. Tomēr atkarībā no tiesiskā regulējuma pozitīvus rezultātus, kas iegūti ar šīm metodēm, var izmantot ķīmikālijas klasificēšanai ANO GHS / *CLP* 1. kategorijā arī vienus pašus.
9. Terminu “testējamā ķīmikālija” šajā testēšanas metodē izmanto, lai apzīmētu to, kas tiek testēts¹, un tas nav saistīts ar testu izmantojamību vienkomponta vielu, daudzkomponentu vielu un/vai maisījumu testēšanā. Informācija par testu izmantojamību daudzkomponentu vielu / maisījumu testēšanai pašlaik ir ierobežota (14) (15). Tomēr šie testi ir tehniski izmantojami daudzkomponentu vielu un maisījumu testēšanai. Taču, pirms šo testēšanas metodi izmantot maisījuma testēšanai nolūkā iegūt datus kādam normatīvam mērķim, jāapsver, vai un kādēļ tā varētu sniegt minētajam mērķim piemērotus rezultātus². Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, tāda apsvēršana nav vajadzīga. Turklāt, testējot daudzkomponentu vielas vai maisījumus, jāapsver iespējamā ietekme, ko uz novērotajām atbildreakcijām varētu atstāt citotoksiskie komponenti.

¹ 2013. gada jūnijā ESAO kopīgajā sanāksmē vienojās jaunajās un atjauninātajās ESAO testēšanas vadlīnijās, kur iespējams, testa objekta apzīmēšanai konsekvētāk lietot apzīmējumu “testējamā ķīmikālija”.

² Šis teikums tika ierosināts un par to tika panākta vienošanās *WNT* 2014. gada aprīļa sanāksmē.

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. Available at: 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. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En).
- (3) Šā pielikuma B.42. nodaļa. Limfmezglu lokālās stimulācijas tests. Šā pielikuma B.6. nodaļa. Ādas sensibilizācija.
- (4) Šā pielikuma B.50. nodaļa. Ādas sensibilizācija: limfmezglu lokālās stimulācijas tests: DA.
- (5) Šā pielikuma B.51. nodaļa. Ādas sensibilizācija: limfmezglu lokālās stimulācijas tests: BrdU-ELISA.
- (6) Šā pielikuma B.59. nodaļa. *In chemico* ādas sensibilizācija: tiešais peptīdreāģētspējas tests (*DPR4*).
- (7) Šā pielikuma B.60. nodaļa. Ādas *in vitro* sensibilizācija: ARE-Nrf2 luciferāzes testēšanas metode.
- (8) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271-96.
- (9) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 180:1841-7.
- (10) Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 27:3031-8.
- (11) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and DNCB. *J Invest Dermatol* 120:390-8.

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

ĀDAS *IN VITRO* SENSIBILIZĀCIJA: CILVĒKA ŠŪNU LĪNIJAS AKTIVĀCIJAS TESTS (*H-CLAT*)

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

1. *h-CLAT* kvantificē izmaiņas tādu šūnu virsmas marķieru ekspresijā, kas asociēti ar monocītu un dendrītisko šūnu (DŠ) aktivāciju (konkrētāk, CD86 un CD54), cilvēka monocītiskās leikēmijas šūnu līnijā THP-1 pēc ekspozīcijas sensibilizatoriem (1) (2). Izmērītos CD86 un CD54 šūnu virsmas marķieru ekspresijas līmeņus pēc tam izmanto par palīglīdzekli ādas sensibilizatoru nošķiršanā no nesensibilizatoriem.
2. *h-CLAT* ir izvērtēts validācijas pētījumā, ko koordinēja Eiropas Savienības References laboratorija dzīvniektestēšanas alternatīvu jomā (*EURL ECVAM*), un pēc tam to neatkarīgi profesionālizvērtējusi *EURL ECVAM* Zinātniskā konsultatīvā komiteja (*ESAC*). Ņemot vērā visus pieejamos pierādījumus un regulatoru un ieinteresēto personu sniegtās ziņas, *EURL ECVAM* ir ieteikusi (3) *h-CLAT* izmantot *IATA* ietvaros par palīglīdzekli, kas palīdz ādas sensibilizatorus nošķirt no nesensibilizatoriem apdraudējumu klasificēšanas un marķēšanas vajadzībām. Piemēri, kā *h-CLAT* dati izmantoti kombinācijā ar citu informāciju, ir pieejami literatūrā (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).
3. Ir pierādīts, ka *h-CLAT* ir pārnesams uz laboratorijām, kam ir pieredze ar paņēmieniem, kuros izmanto šūnu kultūras, un ar plūsmcitolometrisku analīzi. Prognožu reproducējamības līmenis, kas sagaidāms no šā testa, ir aptuveni 80 % gan tajā pašā laboratorijā, gan citās laboratorijās (3) (12). Validācijas pētījuma rezultāti (13) un citi publicētie pētījumi (14) kopumā liecina, ka salīdzinājumā ar *LLNA* rezultātiem šā testa pareizība ādas sensibilizatoru (t. i., ANO GHS / CLP 1. kat.) nošķiršanā no nesensibilizatoriem ir 85 % (N=142) ar jutību 93 % (94/101) un specifiskumu 66 % (27/41) (balstoties uz *EURL ECVAM* veikto atkārtoto analīzi (12), kurā ņemti vērā visi līdzšinējie dati un neņemot vērā negatīvos rezultātus ar ķīmikālijām, kuru Log K_{ow} ir lielāks par 3,5, kā aprakstīts 4. punktā). Testā *h-CLAT* pseidonegatīvas prognozes, visticamāk, skars ķīmikālijas, kurām novērojama zema līdz vidēja ādas sensibilizācijas potence (t. i., ANO GHS / CLP 1.B apakškategorija), nevis ķīmikālijas, kurām novērojama augsta ādas sensibilizācijas potence (t. i., ANO GHS / CLP 1.A apakškategorija) (4) (13) (15). Visa šī informācija kopā norāda uz to, ka metode *h-CLAT* var palīdzēt identificēt apdraudējumus, kas izraisa ādas sensibilizāciju. Tomēr pareizības vērtības, kas šeit sniegtas attiecībā uz *h-CLAT* kā atsevišķu testu, ir tikai orientējošas, jo šis tests jāskata kombinācijā ar citiem informācijas avotiem *IATA* kontekstā un saskaņā ar vispārīgā ievada 7. un 8. punkta noteikumiem. Turklāt, izvērtējot ādas sensibilizācijas novērtēšanas metodes, kurās neizmanto dzīvniekus,

jāņem vērā, ka *LLNA* tests, tāpat kā citi testi ar dzīvniekiem, var nepilnīgi atspoguļot situāciju cilvēka gadījumā.

4. Balstoties uz pašlaik pieejamajiem datiem, ir pierādīts, ka metodi *h-CLAT* var izmantot testējamām ķīmikālijām, kuru sakarā aktuālas ir dažādas organiskās funkcionālās grupas, atbildreakcijas mehānismi, ādas sensibilizācijas potence (kas noteikta *in vivo* pētījumos) un fizikālķīmiskās īpašības (3) (14) (15). Metode *h-CLAT* ir izmantojama testējamajām ķīmikālijām, kuras šķīst vai stabili disperģējas (t. i., koloīds vai suspensija, kurā testējamā ķīmikālija nenosēžas vai no šķīdinātāja/nesēja neatdalās atsevišķās fāzēs) piemērotā šķīdinātājā/nesējā (sk. 14. punktu). Testējamajām ķīmikālijām, kuru Log K_{ow} pārsniedz 3,5, ir tendence dot pseidonegatīvus rezultātus (14). Tāpēc nevajadzētu ņemt vērā negatīvus rezultātus testos ar testējamajām ķīmikālijām, kuru Log K_{ow} pārsniedz 3,5. Tomēr pozitīvus rezultātus, kas iegūti testos ar testējamajām ķīmikālijām, kuru Log K_{ow} pārsniedz 3,5, tik un tā var izmantot par palīglīdzekli testējamās ķīmikālijas atzīšanai par ādas sensibilizatoru. Turklāt izmantotās šūnu līnijas ierobežotās metaboliskās spējas (16) un eksperimenta apstākļu dēļ negatīvus rezultātus testā *h-CLAT* var dot arī prohaptēni (t. i., vielas, kurām nepieciešama fermentatīva aktivācija, piem., ar P450 fermentiem) un prehaptēni (t. i., vielas, kuras aktivizējas oksidējoties), jo īpaši tad, ja oksidācija norit lēni (15). Ar *h-CLAT* var vērtēt fluorescējošas testējamās ķīmikālijas (17), tomēr ļoti fluorescējošas testējamās ķīmikālijas, kuru starojuma viļņa garums ir tāds pats kā fluoresceīna izotiocianātam (FITC) vai propīdija jodīdam (PI), traucē detektēšanu ar plūsmas citometriju, tāpēc ar FITC konjugētām antivielām vai PI tās nevar izvērtēt pareizi. Tādā gadījumā var izmantot ar citiem fluorohromiem marķētas antivielas vai citus citotoksiskuma marķierus, ja vien, testējot 1.2. papildinājumā norādītās standartvielas, var pierādīt, ka tie dod līdzīgus rezultātus kā ar FITC marķētās antivielas (sk. 24. punktu) vai PI (sk. 18. punktu). Ņemot vērā iepriekš minēto, negatīvie rezultāti jāinterpretē noteikto ierobežojumu kontekstā un kopā ar citiem informācijas avotiem *IATA* satvarā. Gadījumos, kad ir liecības, ka metode *h-CLAT* nav izmantojama vēl citu konkrētu kategoriju testējamajām ķīmikālijām, to attiecīgo kategoriju ķīmikālijām neizmanto.
5. Kā norādīts iepriekš, metode *h-CLAT* palīdz ādas sensibilizatorus nošķirt no ādas nesensibilizatoriem. Izmantojot integrētu pieeju, piem., *IATA*, tā var palīdzēt arī novērtēt sensibilizācijas potenci (4) (5) (9). Tomēr, lai noteiktu, kā *h-CLAT* rezultāti varētu palīdzēt novērtēt potenci, jāiegulda papildu darbs, kura pamatā vēlams būt datiem par cilvēku.
6. Definīcijas ir sniegtas 1.1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS

7. Metode *h-CLAT* ir *in vitro* tests, kas kvantificē izmaiņas šūnu virsmas marķieru (piem., CD86 un CD54) ekspresijā cilvēka monocītiskās leikēmijas šūnu līnijā THP-1 24 stundas

pēc ekspozīcijas testējamajai ķīmikālijai. Šīs virsmas molekulas ir tipiski THP-1 monocītu aktivācijas marķieri un var imitēt DŠ aktivāciju, kam ir izšķirīga funkcija T šūnu praimingā (aktivācijā). Izmaiņas virsmas marķieru ekspresijā mēra ar plūsmas citometriju pēc šūnu iekrāsošanas ar antivielām, kas marķētas ar fluorohromiem. Paralēli izdara arī citotoksiskuma mērījumu, lai noteiktu, vai virsmas marķieru ekspresijas aktivācija ir novērojama arī pie subcitotoksiskām koncentrācijām. Lai būtu vieglāk sensibilizatorus nošķirt no nesensibilizatoriem, aprēķina un prognozes modelī (sk. 26. punktu) izmanto virsmas marķieru relatīvo fluorescences intensitāti salīdzinājumā ar šķīdinātāja/nesēja kontroles fluorescences intensitāti.

KOMPETENCES PIERĀDĪŠANA

8. Pirms šajā testēšanas metodes B.71 papildinājumā aprakstītā testa regulāras izmantošanas laboratorijām jāpierāda sava tehniskā kompetence, izmantojot 1.2. papildinājumā uzskaitītās 10 standartvielas. Testa lietotājiem turklāt jāuztur vēsturiska datubāze ar datiem, kas iegūti reaģētspējas pārbaudēs (sk. 11. punktu) un ar pozitīvajām un šķīdinātāja/nesēja kontrolēm (sk. 20.–22. punktu), un ar šo datu palīdzību jāpārlicinās, ka testa reproducējamība konkrētajā laboratorijā laika gaitā saglabājas tāda pati.

PROCEDŪRA

9. Šis tests ir balstīts uz *h-CLAT* dzīvniekēksperimentiem alternatīvu metožu datubāzes pakalpojuma (*DB-ALM*) protokolu Nr. 158 (18), kas ir *EURLE ECVAM* koordinētajā validācijas pētījumā izmantotais protokols. Metodi *h-CLAT* ieviešot un izmantojot laboratorijā, ieteicams lietot šo protokolu. Tālāk sniegts galveno *h-CLAT* metodes komponentu un procedūru apraksts; metodei *h-CLAT* ir divas daļas: *devas noteikšanas tests* un *CD86/CD54 ekspresijas mērījums*.

Šūnu sagatavošana

10. Metodei *h-CLAT* izmanto cilvēka monocītiskās leikēmijas šūnu līniju THP-1. Šūnas (TIB-202™) ir ieteicams sagādāt no kvalificētas šūnu bankas, piem., Amerikas tipveida kultūru kolekcijas.
11. THP-1 šūnas kultivē 37 °C pie 5 % CO₂, mitrinātā atmosfērā, RPMI-1640 barotnē, kas papildināta ar 10 % liellopu embriju seruma jeb govju fetālā seruma (*FBS*), 0,05 mM 2-merkaptoetanolā, 100 vien./ml penicilīna un 100 µg/ml streptomicīna. No penicilīna un streptomicīna izmantošanas kultūras barotnē ir iespējams izvairīties. Tomēr tādā gadījumā lietotājiem jāpārlicinās, ka antibiotiku neesība kultūras barotnē neietekmē rezultātus, piem., veicot testu ar 1.2. papildinājumā uzskaitītajām standartvielām. Jebkurā gadījumā, lai minimalizētu kontaminācijas risku, neatkarīgi no tā, vai šūnu kultūras barotnē ir

antibiotikas vai to nav, jāievēro laba šūnu kultivēšanas prakse. THP-1 šūnas parasti uzsēj reizi 2–3 dienās blīvumā 0,1 līdz $0,2 \times 10^6$ šūnas/ml. To blīvums jāuztur diapazonā no 0,1 līdz $1,0 \times 10^6$ šūnas/ml. Pirms šūnu izmantošanas testēšanai tās jā kvalificē, pārbaudot to reaģētspēju. Šūnu reaģētspēja jāpārbauda, izmantojot pozitīvās kontroles, 2,4-dinitrochlorbenzolu (DNHB) (CAS Nr. 97-00-7, ≥ 99 % tīrība) un niķeļa sulfātu (NiSO_4) (CAS Nr. 10101-97-0, ≥ 99 % tīrība), un negatīvo kontroli, pienskābi (PS) (CAS Nr. 50-21-5, ≥ 85 % tīrība), divas nedēļas pēc atkausēšanas. Gan DNHB, gan NiSO_4 būtu jāizraisa pozitīva atbildreakcija attiecībā uz abiem šūnu virsmas marķieriem — CD86 un CD54 —, un PS būtu attiecībā uz tiem abiem jāizraisa negatīva atbildreakcija. Testam izmanto tikai šūnas, kas reaģētspējas pārbaudi izturējušas. Šūnas var pavairot līdz diviem mēnešiem pēc atkausēšanas. Pasāžu skaitam nevajadzētu pārsniegt 30. Reaģētspējas pārbaude veicama saskaņā ar 20.–24. punktā aprakstītajām procedūrām.

12. Testēšanas vajadzībām THP-1 šūnas uzsēj vai nu blīvumā $0,1 \times 10^6$ šūnas/ml, vai $0,2 \times 10^6$ šūnas/ml un kultivēšanas kolbās priekškultivē attiecīgi 72 vai 48 stundas. Ir svarīgi, lai šūnu blīvums kultivēšanas kolbā tieši pēc priekškultivēšanas perioda visos eksperimentos būtu iespējami līdzīgs (izmantojot vienu vai abus iepriekš minētos priekškultivēšanas nosacījumus), jo šūnu blīvums kultivēšanas kolbā tieši pēc priekškultivēšanas var ietekmēt alergēnu inducēto CD86/CD54 ekspresiju (19). No kultivēšanas kolbas ievāktās šūnas testēšanas dienā resuspendē svaigā kultūras barotnē blīvumā 2×10^6 šūnas/ml. Tad šūnas sadala vai nu 24 iedobju plakandibena platē, izmantojot 500 μl (1×10^6 šūnas uz iedobi), vai 96 iedobju plakandibena platē, izmantojot 80 μl ($1,6 \times 10^5$ šūnas uz iedobi).

Devas noteikšanas tests

13. Lai noteiktu CV_{75} , kas ir testējamās ķīmikālijas koncentrācija, pie kuras šūnu dzīvotspēja salīdzinājumā ar to dzīvotspēju šķīdinātāja/nesēja kontrolē ir 75 %, veic *devas noteikšanas testu*. CV_{75} izmanto tam, lai noteiktu testējamo ķīmikāliju koncentrāciju CD86/CD54 ekspresijas mērījumam (sk. 20.–24. punktu).

Testējamo ķīmikāliju un kontroles vielu sagatavošana

14. Testējamās ķīmikālijas un kontroles vielas sagatavo testēšanas dienā. Izmantojot metodi *h-CLAT*, testējamās ķīmikālijas izšķīdina vai stabili disperģē (sk. arī 4. punktu) fizioloģiskajā šķīdumā vai barotnē, kas ir pirmais šķīdinātāja/nesēja variants, vai dimetilsulfoksīdā (DMSO, ≥ 99 % tīrība), kas ir otrais šķīdinātāja/nesēja variants, ja testējamā ķīmikālija pirmajos divos šķīdinātājos/nesējos nešķīst vai neveido stabilu dispersiju, līdz galīgajai koncentrācijai 100 mg/ml (fizioloģiskajā šķīdumā vai barotnē) vai 500 mg/ml (DMSO). Ja tam ir sniegts pietiekams zinātniskais pamatojums, var izmantot citus šķīdinātājus/nesējus. Jāņem vērā testējamās ķīmikālijas stabilitāte galīgajā šķīdinātājā/nesējā.

15. Testējamo ķīmikāliju izejšķīdumus, kas ir 100 mg/ml (fizioloģiskajā šķīdumā vai barotnē) vai 500 mg/ml (DMSO), atšķaida šādi:

- ja šķīdinātājs/nesējs ir fizioloģiskais šķīdums vai barotne: sagatavo astoņus izejšķīdumus (astoņās koncentrācijās), ar attiecīgo šķīdinātāju/nesēju izdarot sērijveida atšķaidījumus ar atšķaidījuma koeficientu 2. Šos izejšķīdumus tad vēl atšķaida kultūras barotnē, izmantojot atšķaidījuma koeficientu 50 (tā iegūstot darba šķīdumus). Ja plates augstākā galīgā koncentrācija 1000 µg/ml nav toksiska, maksimālā koncentrācija ar jaunu citotoksiskuma testu jānosaka vēlreiz. Ja testējamā ķīmikālija fizioloģiskajā šķīdumā vai barotnē izšķīdusi vai stabili disperģēta, galīgajai koncentrācijai platē nevajadzētu pārsniegt 5000 µg/ml;
- ja šķīdinātājs/nesējs ir DMSO: sagatavo astoņus izejšķīdumus (astoņās koncentrācijās), ar attiecīgo šķīdinātāju/nesēju izdarot sērijveida atšķaidījumus ar atšķaidījuma koeficientu 2. Šos izejšķīdumus tad vēl atšķaida kultūras barotnē, izmantojot atšķaidījuma koeficientu 250 (tā iegūstot darba šķīdumus). Galīgā koncentrācija platē nedrīkst pārsniegt 1000 µg/ml, pat ja šī koncentrācija nav toksiska.

Visbeidzot darba šķīdumus izmanto ekspozīcijai, THP-1 šūnu suspensijai platē pievienojot tādu pašu tilpumdaudzumu darba šķīduma (sk. 17. punktu), tā iegūstot vēl vienu atšķaidījumu ar atšķaidījuma koeficientu 2 (galīgais koncentrāciju diapazons platē parasti ir 7,81–1000 µg/ml).

16. *h-CLAT* par šķīdinātāja/nesēja kontroli izmanto kultūras barotni (testējamajām ķīmikālijām, kas izšķīdinātas vai stabili disperģētas (sk. 4. punktu) barotnē vai fizioloģiskajā šķīdumā) vai DMSO (testējamajām ķīmikālijām, kas izšķīdinātas vai stabili disperģētas DMSO), ko platē testē vienā galīgajā koncentrācijā — 0,2 %. To atšķaida tāpat, kā saskaņā ar 15. punktu atšķaida darba šķīdumus.

Testējamo ķīmikāliju un kontroles vielu aplicēšana

17. 15. un 16. punktā aprakstīto kultūras barotni vai darba šķīdumus attiecībā 1:1 (tilp./tilp.) samaisa ar 24 iedobju vai 96 iedobju plakandibena platē sagatavotajām šūnu suspensijām (sk. 12. punktu). Tad apstrādātās plates $24 \pm 0,5$ stundas inkubē 37 °C temperatūrā pie 5 % CO₂. Jāizvairās no gaistošu testējamo ķīmikāliju iztvaikošanas un testējamo ķīmikāliju krusteniskās starpiedobju kontaminācijas, piem., pirms inkubēšanas ar testējamajām ķīmikālijām plati noslēdzot (20).

Iekrāsošana ar propīdija jodīdu (PI)

18. Pēc $24 \pm 0,5$ ekspozīcijas stundām šūnas pārliet paraugu stobriņos un ievāc centrifugējot. Supernatantus nolej un atlikušās šūnas resuspendē 200 µl (96 iedobju plates gadījumā) vai 600 µl (24 iedobju plates gadījumā) fosfātu fizioloģiskā buferšķīduma, kas satur 0,1 % liellopu seruma albumīna (iekrāsošanas buferšķīdums). 200 µl šūnu suspensijas pārnes uz 96 iedobju apaļdibena plati (ja paraugi ir no 96 iedobju plates) vai mikrostobriņu (ja

paraugi ir no 24 iedobju plates) un divreiz noskalo ar 200 µl (96 iedobju plates gadījumā) vai 600 µl (24 iedobju plates gadījumā) iekrāsošanas buferšķīduma. Visbeidzot šūnas resuspendē iekrāsošanas buferšķīdumā (piem., 400 µl), kam pievieno PI šķīdumu (piem., 20 µl; galīgā PI koncentrācija var būt, piem., 0,625 µg/ml). Citus citotoksiskuma marķierus, piem., 7-aminoaktinomicīnu D (7-AAD), tripānzilo vai tml., var izmantot tad, ja iespējams pierādīt, ka alternatīvie iekrāsotāji dod līdzīgus rezultātus kā PI, piem., veicot testus ar 1.2. papildinājumā uzskaitītajām standartvielām.

Citotoksiskuma mērīšana ar plūsmas citometriju un CV₇₅ vērtības aplēšana

19. PI uzņemšanu analizē ar plūsmas citometriju, izmantojot ieguves kanālu FL-3. Kopā iegūst 10 000 dzīvu (PI-negatīvu) šūnu. Šūnu dzīvotspēju var aprēķināt ar citometra analīzes programmu, izmantojot nākamo vienādojumu. Ja šūnu dzīvotspēja ir maza, iegūst (izmēra) līdz 30 000 šūnu, ieskaitot nedzīvas šūnas. Alternatīva ir datus iegūt vienas minūtes laikā pēc analīzes sākšanas.

$$\text{Šūnu dzīvotspēja} = \frac{\text{Dzīvo šūnu skaits}}{\text{Iegūto (izmērīto) šūnu kopskaits}} \times 100$$

CV₇₅ vērtību (sk. 13. punktu), t. i., koncentrāciju, pie kuras izdzīvo 75 % THP-1 šūnu (25 % citotoksiskums), aprēķina ar log-lineāro interpolāciju saskaņā ar šādu vienādojumu:

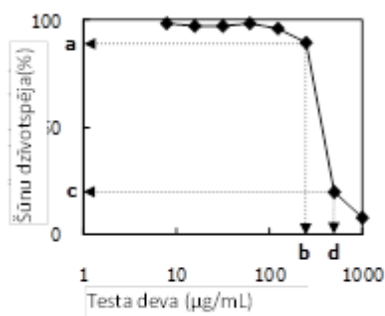
$$\text{Log CV}_{75} = \frac{(75-c) \times \text{Log}(b) - (75-a) \times \text{Log}(d)}{a-c}$$

kur:

a ir minimālā vērtība šūnu dzīvotspējai virs 75 %;

c ir maksimālā vērtība šūnu dzīvotspējai zem 75 %;

b un d ir koncentrācijas, pie kurām šūnu dzīvotspēja ir attiecīgi a un c.



CV₇₅ var noteikt arī citādi, ja vien pierāda (piem., testējot standartvielas), ka tas neietekmē rezultātus.

CD86/CD54 ekspresijas mērījums

Testējamo ķīmikāliju un kontroles vielu sagatavošana

20. Testējamās ķīmikālijas izšķīdina vai stabili disperģē piemērotā šķīdinātājā/nesējā (fizioloģiskajā šķīdumā, barotnē vai DMSO; sk. 14. punktu). Vispirms testējamās ķīmikālijas atšķaida līdz koncentrācijai, kas atbilst simtkārtējai (fizioloģiskā šķīduma vai barotnes gadījumā) vai piecsimtkārtējai (DMSO gadījumā) *devas noteikšanas testā* noteiktajai $CV_{75} \times 1,2$ (sk. 19. punktu). Ja CV_{75} noteikt nav bijis iespējams (t. i., *devas noteikšanas testā* nav novērots pietiekams citotoksiskums), par sākuma koncentrāciju izmanto augstāko koncentrāciju, kurā testējamā ķīmikālija katrā šķīdinātājā/nesējā vēl šķīst vai stabili disperģējas. Jāņem vērā, ka galīgā koncentrācija platē nedrīkst pārsniegt 5000 µg/ml (fizioloģiskā šķīduma vai barotnes gadījumā) vai 1000 µg/ml (DMSO gadījumā). Tad sērijsveida atšķaidījumos ar attiecīgo šķīdinātāju/nesēju (atšķaidījuma koeficients 1,2) iegūst izejšķīdumus (astoņās koncentrācijās diapazonā no $100 \times 1,2 \times CV_{75}$ līdz $100 \times 0,335 \times CV_{75}$ (fizioloģiskā šķīduma vai barotnes gadījumā) vai no $500 \times 1,2 \times CV_{75}$ līdz $500 \times 0,335 \times CV_{75}$ (DMSO gadījumā)), ko testēt ar metodi *h-CLAT* (dozēšanas shēmas piemēru sk. DB-ALM protokolā Nr. 158). Šos izejšķīdumus tad vēl atšķaida kultūras barotnē, izmantojot atšķaidījuma koeficientu 50 (fizioloģiskā šķīduma vai barotnes gadījumā) vai 250 (DMSO gadījumā), un tā iegūst darba šķīdumus. Iegūtos darba šķīdumus izmanto ekspozīcijai, platē vēl veicot pēdējo atšķaidījumu ar koeficientu 2. Ja rezultāti neatbilst 29. un 30. punktā aprakstītajiem pieņemamības kritērijiem, *devas noteikšanas testu* var atkārtot, lai CV_{75} noteiktu precīzāk. Jāņem vērā, ka CD86/CD54 ekspresijas mērījumam var izmantot tikai 24 iedobju plates.
21. Šķīdinātāja/nesēja kontroli sagatavo tā, kā aprakstīts 16. punktā. Metodē *h-CLAT* par pozitīvo kontroli izmanto DNHB (sk. 11. punktu), kura izejšķīdumus sagatavo DMSO un atšķaida tā, kā izejšķīdumu sagatavošana aprakstīta 20. punktā. Par pozitīvo kontroli *CD86/CD54 ekspresijas mērījumam* DNHB platē izmanto vienā galīgajā koncentrācijā (parasti 4,0 µg/ml). Lai platē DNHB būtu koncentrācijā 4,0 µg/ml, sagatavo 2 mg/ml DNHB izejšķīdumu DMSO un tad kultūras barotnē ar koeficientu 250 atšķaida līdz 8 µg/ml darba šķīdumam. Par pozitīvās kontroles koncentrāciju var izmantot arī DNHB CV_{75} , ko nosaka katrā testējošajā iestādē. Ja ir pieejami vēsturiskie dati, no kuriem var iegūt salīdzināmus izpildes reižu pieņemamības kritērijus, var izmantot citas piemērotas pozitīvās kontroles. Pozitīvajām kontrolēm galīgā koncentrācija platē nedrīkst pārsniegt 5000 µg/ml (fizioloģiskā šķīduma vai barotnes gadījumā) vai 1000 µg/ml (DMSO gadījumā). Izpildes reižu pieņemamības kritēriji ir tādi paši kā testējamajai ķīmikālijai (sk. 29. punktu), izņemot pēdējo pieņemamības kritēriju, jo pozitīvo kontroli testē tikai vienā koncentrācijā.

Testējamo ķīmikāliju un kontroles vielu aplicēšana

22. Lai iegūtu prognozi, katrai testējamajai ķīmikālijai un kontroles vielai ir nepieciešams viens eksperiments. Katrs eksperiments sastāv no vismaz divām neatkarīgām *CD86/CD54*

ekspresijas mērījuma izpildes reizēm (sk. 26.–28. punktu). Katru neatkarīgo izpildes reizi izdara citā dienā vai tajā pašā dienā, ja attiecībā uz katru izpildes reizi izpildīti šādi nosacījumi: a) tiek neatkarīgi sagatavoti svaigi testējamās ķimikālijas un antivielu šķīdumu izejšķīdumi un darba šķīdumi un b) tiek izmantotas neatkarīgi ievāktas šūnas (t. i., šūnas ir ievāktas no dažādām kultivēšanas kolbām); tomēr šūnas var būt no vienas un tās pašas pasāžas. Testējamās ķimikālijas un kontroles vielas, kas sagatavotas kā darba šķīdumi (500 µl), samaisa ar 500 µl suspendētu šūnu (1×10^6 šūnas) attiecībā 1:1 un šūnas inkubē $24 \pm 0,5$ stundas, kā aprakstīts 20. un 21. punktā. Katrā izpildes reizē pietiek ar vienu katras testējamās ķimikālijas un kontroles vielas koncentrācijas replikātu, jo prognozi iegūst vismaz divās neatkarīgās izpildes reizēs.

Šūnu iekrāsošana un analīze

23. Pēc $24 \pm 0,5$ ekspozīcijas stundām šūnas no 24 iedobju plates pārvieto uz paraugu stobriņiem, ievāc centrifugējot un tad divreiz noskalo ar 1 ml iekrāsošanas buferšķīduma (ja nepieciešams, skalošanu var vēl atkārtot). Pēc skalošanas šūnas nobloķē ar 600 µl bloķēšanas šķīduma (iekrāsošanas buferšķīdums, kas satur 0,01 % (masa/tilp.) globulīna (Kona frakcija II, III, cilvēka; SIGMA, #G2388-10G vai līdzvērtīga)) un inkubē 15 min 4°C . Pēc bloķēšanas šūnas sadala trīs 180 µl alikvotās 96 iedobju apaļdibena platē vai mikrostobriņā.
24. Pēc centrifugēšanas šūnas 30 min 4°C iekrāso ar 50 µl ar FITC marķētu anti-CD86, anti-CD54 vai peļu IgG1 (izotips) antivielu. *h-CLAT* DB-ALM protokolā Nr. 158 (18) aprakstītās antivielas izmanto, tās attiecībā 3:25 (tilp./tilp.) (CD86 (BD-PharMingen, #555657; Clone: Fun-1)) vai 3:50 (tilp./tilp.) (CD54 (DAKO, #F7143; Clone: 6.5B5) un IgG1 (DAKO, #X0927)) atšķaidot ar iekrāsošanas buferšķīdumu. Pēc testa izstrādātāju atzinuma šie antivielu atšķaidījuma koeficienti nodrošina vislabāko signāla un trokšņa attiecību. Testa izstrādātāju pieredzē dažādu partiju antivielu fluorescences intensitāte parasti ir līdzīga. Tomēr, lai noteiktu vispiemērotākās koncentrācijas, lietotāji var apsvērt iespēju antivielas titrēt konkrētās laboratorijas apstākļos. Ar citiem fluorohromiem marķētas anti-CD86 un/vai anti-CD-54 antivielas var izmantot, ja, piem., testējot 1.2. papildinājumā norādītās standartvielas, var pierādīt, ka tās dod līdzīgus rezultātus kā ar FITC konjugētās antivielas. Jāpiezīmē, ka, mainot *h-CLAT* DB-ALM protokolā Nr. 158 (18) aprakstīto antivielu klonu vai piegādātāju, var mainīties rezultāti. Pēc vismaz divkārtējas noskalošanas 150 µl iekrāsošanas buferšķīduma šūnas resuspendē iekrāsošanas buferšķīdumā (piem., 400 µl) un tam pievieno PI šķīdumu (piem., 20 µl tā, lai galīgā koncentrācija būtu 0,625 µl/ml) vai cita citotoksiskuma marķiera šķīdumu (sk. 18. punktu). CD86 un CD54 ekspresijas līmeņus un šūnu dzīvotspēju analizē ar plūsmas citometriju.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Datu izvērtēšana

25. CD86 un CD54 ekspresiju analizē ar plūsmas citometriju, izmantojot ieguves kanālu FL-1. Balstoties uz ģeometrisku vidējo fluorescences intensitāti (VFI), CD86 un CD54 relatīvo fluorescences intensitāti (RFI) pozitīvās kontroles (ctrl) šūnām un ar ķīmikāliju apstrādātajām šūnām aprēķina ar šādu vienādojumu:

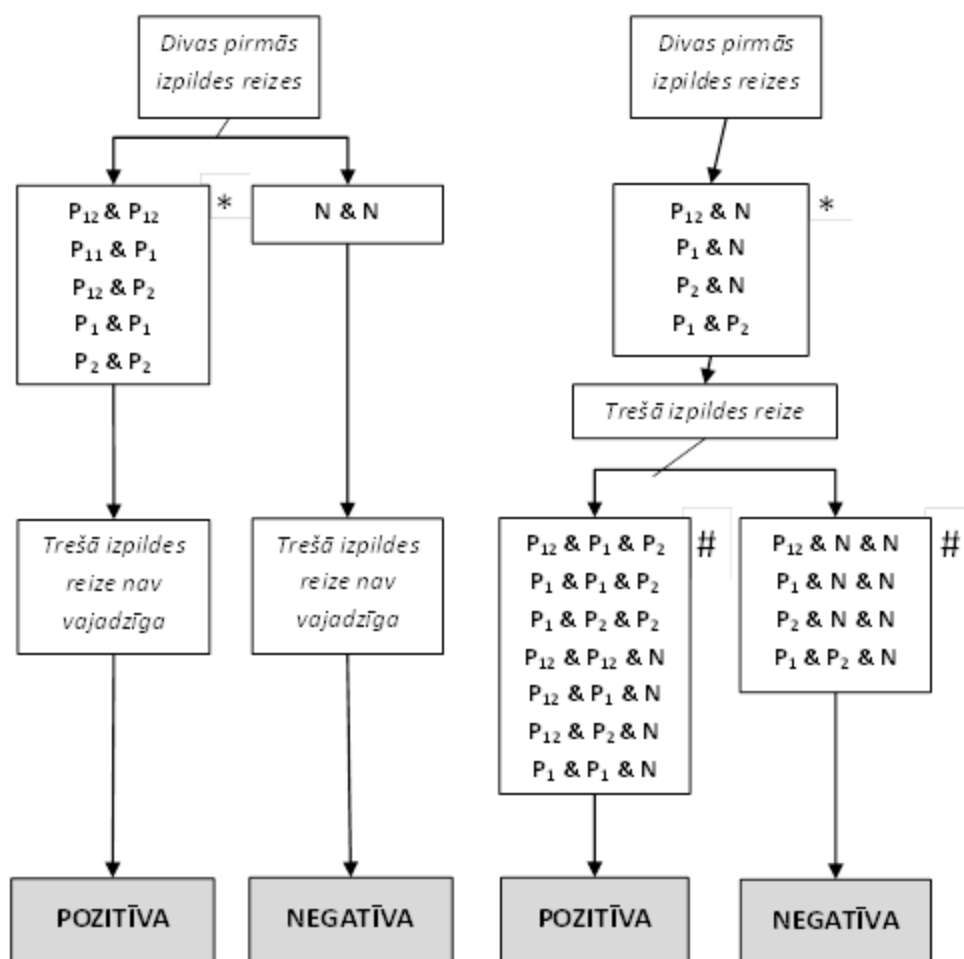
$$RFI = \frac{\text{ar ķīmikālijām apstrādāto šūnu VFI} - \text{ar ķīmikālijām apstrādāto izotopu kontrolšūnu VFI}}{\text{ar šķīdin./nesēju apstr. kontrolš. VFI} - \text{ar šķīdin./nesēju apstr. izotopu kontrolšūnu VFI}} \times 100$$

Ar 19. punktā norādīto vienādojumu aprēķina arī izotipa kontroles (ctrl) šūnu (šūnas, kas iekrāsotas ar peļu IgG1 (izotips) antivielām) dzīvotspēju.

Prognozes modelis

26. Lai iegūtu vienu prognozi (POZITĪVU vai NEGATĪVU), *CD86/CD54* ekspresijas mērījumam katru testējamo ķīmikāliju testē vismaz divās neatkarīgās izpildes reizēs. Uzska, ka *h-CLAT* prognoze ir POZITĪVA, ja vismaz 2 no 2 vai vismaz 2 no 3 neatkarīgām izpildes reizēm ir izpildīti šādi nosacījumi; pretējā gadījumā *h-CLAT* prognozi uzskata par NEGATĪVU (1. attēls):
- CD86 RFI jebkurā testētajā koncentrācijā ir vismaz 150 % (ar šūnu dzīvotspēju ≥ 50 %);
 - CD54 RFI jebkurā testētajā koncentrācijā ir vismaz 200 % (ar šūnu dzīvotspēju ≥ 50 %).
27. Tātad, ja pirmās divas izpildes reizes abas dod pozitīvu rezultātu attiecībā uz CD86 un/vai abas dod pozitīvu rezultātu attiecībā uz CD54, uzskata, ka *h-CLAT* prognoze ir POZITĪVA un trešā izpildes reize nav vajadzīga. Līdzīgā kārtā, ja pirmās divas izpildes reizes attiecībā uz abiem marķieriem ir negatīvas, uzskata, ka *h-CLAT* prognoze ir NEGATĪVA (pienācīgi ņemot vērā 30. punktā noteikto) un trešā izpildes reize nav vajadzīga. Savukārt, ja pirmās divas izpildes reizes attiecībā uz vismaz vienu no marķieriem (CD54 vai CD86) nesakrīt, ir vajadzīga trešā izpildes reize, un tad galīgo prognozi nosaka pēc tā, kuru rezultātu pārsvars novērojams trīs atsevišķajās izpildes reizēs (proti, 2 no 3). Šajā aspektā jāņem vērā, ka, ja ir divas neatkarīgas izpildes reizes un viena ir pozitīva tikai attiecībā uz CD86 (turpmāk "P₁") un otra ir pozitīva tikai attiecībā uz CD54 (turpmāk "P₂"), ir vajadzīga trešā izpildes reize. Ja trešā izpildes reize ir negatīva attiecībā uz abiem marķieriem (turpmāk "N"), uzskata, ka *h-CLAT* prognoze ir NEGATĪVA. Savukārt, ja trešā izpildes reize attiecībā uz vienu no marķieriem (P₁ vai P₂) vai tiem abiem (turpmāk "P₁₂") ir pozitīva, uzskata, ka *h-CLAT* prognoze ir POZITĪVA.

1. attēls. Metodē *h-CLAT* izmantotais prognozes modelis. *h-CLAT* prognoze jāskata *IATA* kontekstā un saskaņā ar vispārīgā ievada 7. un 8. punkta noteikumiem.



P₁: izpildes reize, kas ir pozitīva tikai attiecībā uz CD86; P₂: izpildes reize, kas ir pozitīva tikai attiecībā uz CD54; P₁₂: izpildes reize, kas ir pozitīva gan attiecībā uz CD86, gan CD54; N: izpildes reize, kas nav pozitīva ne attiecībā uz CD86, ne CD54.

* Lodziņos redzamas relevantās pirmo divu izpildes reižu rezultātu kombinācijas neatkarīgi no tā, kādā kārtībā šie rezultāti iegūti.

Lodziņos redzamas relevantās trīs izpildes reižu rezultātu kombinācijas, kuru pamatā ir iepriekšējā lodziņā norādītie pirmo divu izpildes reižu rezultāti; ir vienāla, kādā kārtībā šie rezultāti iegūti.

28. Testējamajām ķīmikālijām, attiecībā uz kurām ar *h-CLAT* iegūtā prognoze ir POZITĪVA, var izvēlēties noteikt divas efektīvās koncentrācijas vērtības, EC₁₅₀ marķierim CD86 un EC₂₀₀ marķierim CD54, t. i., koncentrācijas, kurās testējamo ķīmikāliju inducētā RFI ir 150 vai 200. Izmantotas integrētā pieejā, piem., *IATA* (4) (5) (6) (7) (8), šīs efektīvās

koncentrācijas vērtības var palīdzēt novērtēt sensibilizācijas potenci (9). Tās var aprēķināt ar šādiem vienādojumiem:

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

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

kur

$A_{konc.}$ ir zemākā koncentrācija, izteikta $\mu\text{g/ml}$, kurā $RFI > 150$ (CD86) vai 200 (CD54);

$B_{konc.}$ ir augstākā koncentrācija, izteikta $\mu\text{g/ml}$, kurā $RFI < 150$ (CD86) vai 200 (CD54);

A_{RFI} ir RFI zemākajā koncentrācijā, kurā $RFI > 150$ (CD86) vai 200 (CD54);

B_{RFI} ir RFI augstākajā koncentrācijā, kurā $RFI < 150$ (CD86) vai 200 (CD54).

Lai EC_{150} un EC_{200} vērtības noteiktu precīzāk, var būt vajadzīgas trīs neatkarīgas *CD86/CD54 ekspresijas mērījuma* izpildes reizes. Galīgās EC_{150} un EC_{200} nosaka kā trīs neatkarīgo izpildes reižu efektīvo koncentrāciju medianālo vērtību. Ja pozitivitātes kritērijiem (sk. 26.–27. punktu) atbilst tikai divas no trim neatkarīgajām izpildes reizēm, no divām aprēķinātajām vērtībām pieņem augstāko EC_{150} vai EC_{200} .

Pieņemamības kritēriji

29. Izmantojot metodi *h-CLAT*, jābūt izpildītiem šādiem pieņemamības kritērijiem (22) (27).

- Šūnu dzīvotspējai barotnē un šķīdinātāja/nesēja kontrolē jābūt lielākai nekā 90 %.
- Šķīdinātāja/nesēja kontrolē ne $CD86$, ne $CD54$ RFI vērtības nedrīkst pārsniegt pozitivitātes kritērijus ($CD86$ $RFI \geq 150$ % un $CD54$ $RFI \geq 200$ %). Šķīdinātāja/nesēja kontroles RFI vērtības aprēķina ar 25. punktā norādīto formulu (“ķimikālijas VFI” aizstājot ar “šķīdinātāja/nesēja VFI” un “šķīdinātāja/nesēja VFI” aizstājot ar “(barotnes) kontroles VFI”).
- Gan barotnes, gan šķīdinātāja/nesēja kontroles $CD86$ un $CD54$ (katra) VFI attiecībai pret izotipa kontroles VFI jābūt > 105 %.
- Pozitīvās kontroles (DNHB) $CD86$ un $CD54$ VFI vērtībām jāatbilst pozitivitātes kritērijiem ($CD86$ $RFI \geq 150$ un $CD54$ $RFI \geq 200$), un šūnu dzīvotspējai jāpārsniedz 50 %.
- Testējamās ķimikālijas gadījumā šūnu dzīvotspējai katrā izpildes reizē jāpārsniedz 50 % vismaz četrās testētajās koncentrācijās.

30. Negatīvi rezultāti ir pieņemami tikai attiecībā uz testējamajām ķimikālijām, kuru gadījumā šūnu dzīvotspēja augstākajā testētajā koncentrācijā (piem., $1,2 \times CV_{75}$ saskaņā ar 20. punktā aprakstīto sērijveida atšķaidīšanas shēmu) nesasniedz 90 %. Ja šūnu dzīvotspēja koncentrācijā $1,2 \times CV_{75}$ ir vienāda ar vai lielāka par 90 %, negatīvo rezultātu atmet. Tādā

gadījumā ir ieteicams mēģināt devu izvēli vēl precizēt, CV_{75} noteikšanu atkārtojot. Jāņem vērā, ka gadījumos, kad testējamās ķīmikālijas maksimālā testējamā koncentrācija ir 5000 µg/ml fizioloģiskajā šķīdumā (vai barotnē, vai citos šķīdinātājos/nesējos), 1000 µg/ml DMSO vai augstākā koncentrācija, kurā tā vēl šķīst, negatīvs rezultāts ir pieņemams pat tad, ja šūnu dzīvotspēja pārsniedz 90 %.

Testēšanas pārskats

31. Testēšanas pārskatā norāda šādas ziņas.

Testējamā ķīmikālija

Vienkomponenta vielas

- Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati
- Izskats, Log K_{ow} , šķīdība ūdenī, šķīdība DMSO, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama
- Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.
- Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)
- Testētās koncentrācijas
- Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama
- Katras testējamās ķīmikālijas šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums

Daudzkomponentu vielas, *UVCB* un maisījumi

- Iespējami izsmeļošs raksturojums ar, piem., sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), tīrību, kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām
- Izskats, šķīdība ūdenī, šķīdība DMSO un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama
- Molekulmasa vai šķīdamā molekulmasa, ja tas ir maisījums/polimērs ar zināmu sastāvu, vai cita pētījuma norisei relevanta informācija
- Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)
- Testētās koncentrācijas
- Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama
- Katras testējamās ķīmikālijas šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums

Kontroles

Pozitīvā kontrole

- Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati
- Izskats, Log K_{ow} , šķīdība ūdenī, šķīdība DMSO, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama (attiecīgā gadījumā)
- Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.
- Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)
- Testētās koncentrācijas
- Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama
- Norāde uz vēsturiskajiem pozitīvo kontroļu rezultātiem, kas apliecina atbilstību testa izpildes pieņemamības kritērijiem (attiecīgā gadījumā)

Negatīvā un šķīdinātāja/nesēja kontrole

- Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati
- Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.
- Ja tiek izmantoti citi (testēšanas vadlīnijā neminēti) šķīdinātāji/nesēji: izskats, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama
- Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama
- Katras testējamās ķīmikālijas šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums

Testa apstākļi

- Sponsora, testējošās iestādes, pētījuma vadītāja vārds/nosaukums un adrese
- Izmantotā testa apraksts
- Izmantotā šūnu līnija, tās glabāšanas apstākļi un avots (piem., iestāde, no kuras tā saņemta)
- Izmantotais plūsmas citometrs (piem., modelis), arī instrumentu iestatījumi, izmantotais globulīns, antivielas un citotoksiskuma marķieris

- Procedūra, ar kādu, testējot standartvielas, pierādīta laboratorijas kompetence šā testa izpildē, un procedūra, ar kādu pierādīta šā testa rezultātu reproducējamība laika griezumā, piem., vēsturiskie kontroļu dati un/vai vēsturiskie reaģētspējas pārbaužu dati

Testa pieņemamības kritēriji

- Ar šķīdinātāja/nesēja kontroli iegūtās šūnu dzīvotspējas, VFI un RFI vērtības salīdzinājumā ar pieņemamības diapazoniem
- Ar pozitīvo kontroli iegūtās šūnu dzīvotspējas un RFI vērtības salīdzinājumā ar pieņemamības diapazoniem
- Šūnu dzīvotspēja visās testētajās testētās ķīmikālijas koncentrācijās

Testa procedūra

- Izmantotais izpildes reižu skaits
- Izmantotās testējamās ķīmikālijas koncentrācijas, aplicēšana un ekspozīcijas laiks (ja atšķiras no rekomendētā)
- Ekspozīcijas ilgums (ja atšķiras no rekomendētā)
- Izmantoto izvērtēšanas un lēmuma pieņemšanas kritēriju apraksts
- Testa procedūras modifikāciju apraksts, ja tādas bijušas

Rezultāti

- Tabulā apkopoti dati, tostarp CV_{75} (attiecīgā gadījumā), individuālās ģeometriskās VFI, RFI, šūnu dzīvotspējas vērtības, EC_{150}/EC_{200} (attiecīgā gadījumā), kas katrā izpildes reizē iegūtas attiecībā uz testējamo ķīmikāliju un pozitīvo kontroli, un norāde uz testējamās ķīmikālijas novērtējumu saskaņā ar prognozes modeli
- Jebkādu citu relevantu novērojumu apraksts (attiecīgā gadījumā)

Rezultātu iztīrājums

- Ar metodi *h-CLAT* iegūto rezultātu iztīrājums
- Testa rezultātu apskats *IATA* kontekstā, ja pieejama cita relevanta informācija

Secinājumi

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. Accessible at: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J Appl Toxicol.* 35, 1318-1332.
- (5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. *J Appl Toxicol.* 35, 1333-1347.
- (6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul Toxicol Pharmacol.* 63, 489-504.
- (7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 69, 371-379.
- (8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol.* 71, 337-351.

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

- evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.
- (18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Accessible at: <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. Available at: [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. Available at: 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. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā testa rezultāti sakrīt ar pieņemtajām references vērtībām. Tas ir testa veikspējas raksturlielums un viens no tā relevantuma aspektiem. Ar šo terminu, tāpat kā terminu “konkordantums”, bieži vien saprot testa pareizo iznākumu īpatsvaru (21).

AOP (nelabvēlīga iznākuma ceļš): no mērķķīmikālijas vai līdzīgu ķīmikāliju grupas ķīmiskās struktūras izrietoša notikumu sekvenca no molekulārā iniciācijas notikuma līdz interesējošajam *in vivo* iznākumam (22).

Ķīmikālija: viela vai maisījums.

CV₇₅: aplēstā koncentrācija, pie kuras šūnu dzīvotspēja ir 75 %.

EC₁₅₀: koncentrācijas, pie kurām RFI vērtības CD86 ekspresijā ir 150.

EC₂₀₀: koncentrācijas, pie kurām RFI vērtības CD54 ekspresijā ir 200.

Plūsmas citometrija: citometrijas paņēmiens, kurā fluīdā suspendētas šūnas pa vienai laiž caur fokusētu ierosinošu gaismu, kura izkliedējas šūnām un to sastāvdaļām specifiskos rakstos; šūnas nereti tiek marķētas ar fluorescējošiem marķieriem tā, ka tās gaismu vispirms absorbē un tad emitē mainītā frekvencē.

Bīstamība: tāda aģenta vai situācijas iedabiska īpašība, kam piemīt potenciāls atstāt nelabvēlīgu ietekmi uz šim aģentam eksponētu organismu, sistēmu vai (apakš)populāciju.

IATA (integrētā testēšanas un novērtēšanas pieeja): strukturēta pieeja, ko izmanto ķīmikālijas vai ķīmikāliju grupas bīstamības identificēšanai (potenciāls), bīstamības raksturošanai (potence) un/vai drošuma novērtēšanai (potenciāls/potence un ekspozīcija) un kas stratēģiskā veidā integrē un izsver visus relevantos datus, lai varētu pieņemt normatīvu lēmumu par potenciālo bīstamību un/vai risku, un/vai nepieciešamību veikt turpmāku konkrētu un līdz ar to minimālu testēšanu.

Barotnes kontrole: neapstrādāts replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti. Ar šo paraugu rīkojas tāpat kā ar paraugiem, kas apstrādāti ar testējamo ķīmikāliju, un citiem kontrolparaugiem, lai noteiktu, vai šķīdinātājs/nesējs mijiedarbojas ar testa sistēmu.

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām.

Vienkomponenta viela: tāda viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā viena galvenā sastāvdaļa veido vismaz 80 % (masa/masa).

Daudzkomponentu viela: tāda viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā vairāk nekā

viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā $\geq 10\%$ (masa/masa) un $< 80\%$ (masa/masa). Daudzkomponentu vielas tiek iegūtas ražošanas procesā. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu vielas rodas ķīmiskās reakcijās.

Pozitīvā kontrole: replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar vielu, par ko ir zināms, ka tā inducē pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespējams novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlieku liela.

Prehaptēni: ķīmikālijas, kas par sensibilizatoriem kļūst abiotiskas transformācijas procesā.

Prohaptēni: ķīmikālijas, kuru ādas sensibilizācijas potenciālu atraisa fermentatīva aktivācija.

Relatīvā fluorescences intensitāte (RFI): ģeometriskās vidējās fluorescences intensitātes (VFI) relatīvās vērtības ar ķīmikāliju apstrādātās šūnās salīdzinājumā ar VFI ar šķīdinātāju/nesēju apstrādātās šūnās.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testa pareizības (konkordantuma) aspektu (21).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē, izmantojot vienu un to pašu protokolu, testu vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās ilgākā laika nogrieznī var veikt reproducējamu. To novērtē, aprēķinot metodes intralaboratorisko un interlaboratorisko reproducējamību un intralaboratorisko atkārtotamību (21).

Izpildes reize: reize, kurā vienu vai vairākas ķīmikālijas testē paralēli ar šķīdinātāja/nesēja kontroli un pozitīvo kontroli.

Jutība: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām/aktīvajām ķīmikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir tāda testa pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testa relevantuma izvērtēšanā (21).

Iekrāsošanas buferšķīdums: fosfātu fizioloģiskais buferšķīdums, kas satur 0,1 % liellopu seruma albumīna.

Šķīdinātāja/nesēja kontrole: neapstrādāts paraugs, kurā ir visi testa sistēmas komponenti, izņemot testējamo ķīmikāliju, bet ieskaitot izmantoto šķīdinātāju/nesēju. To izmanto, lai noteiktu bāzlīnijas atbildreakciju paraugiem, kas apstrādāti ar attiecīgajā šķīdinātāja/nesējā izšķīdinātu vai stabili disperģētu testējamo ķīmikāliju. Ja testā izmanto arī paralēlu barotnes kontroli, šis paraugs parāda arī to, vai šķīdinātājs/nesējs mijiedarbojas ar testa sistēmu.

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām ķīmikālijām ar testu

tiek klasificētas pareizi. Tas ir tāda testa pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testa relevantuma izvērtēšanā (21).

Viela: ķīmisks elements un tā dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, ieskaitot to stabilizācijai vajadzīgās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un neizmainot tās sastāvu.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo metodi.

Apvienoto Nāciju Organizācijas Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma (ANO GHS): sistēma, kurā ķimikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un kura paredz atbilstošus saziņas elementus, piem., piktogrammas, signālvārdus, bīstamības apzīmējumus, drošības prasību apzīmējumus un drošības datu lapas, ar mērķi sniegt informāciju par ķimikāliju nelabvēlīgo ietekmi, lai aizsargātu cilvēkus (tostarp darba devējus, darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (23).

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kuras ir kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

Derīgs tests: tests, kas tiek uzskatīts par pietiekami relevantu un ticamu konkrētam nolūkam un ir balstīts uz zinātniski pareiziem principiem. Tests nekad nav derīgs absolūtā izteiksmē; tas vienmēr ir derīgs tikai kādam konkrētam nolūkam (21).

1.2. papildinājums

STANDARTVIELAS

Pirms šajā testēšanas metodes B.71 papildinājumā aprakstītā testa regulāras izmantošanas laboratorijām jāapliecina sava tehniskā kompetence, pareizi iegūstot paredzamo *h-CLAT* prognozi attiecībā uz 1. tabulā ieteiktajām 10 vielām un attiecībā uz vismaz 8 no 10 standartvielām iegūstot CV_{75} , EC_{150} un EC_{200} vērtības, kuras ietilpst attiecīgajā references diapazonā. Standartvielas ir atlasītas tā, lai tās reprezentētu visu ādas sensibilizācijas apdraudējumu izraisīto atbildreakciju diapazonu. Citi atlases kritēriji bija vielu komerciālā pieejamība un kvalitatīvu ar metodi *h-CLAT* iegūtu *in vivo* references datu, kā arī kvalitatīvu ar metodi *h-CLAT* iegūtu *in vitro* datu pieejamība. Par metodi *h-CLAT* ir pieejami arī publicēti references dati (3) (14).

1. tabula. Vielas, kuras ieteicams izmantot, lai pierādītu tehnisko kompetenci izmantot metodi *h-CLAT*

Standartvielas	CAS Nr.	Agregāts āvkalis	<i>In vivo</i> prognoze ¹	CV_{75} references diapazons $\mu\text{g/ml}^2$	<i>h-CLAT</i> rezultāts attiecībā uz CD86 (EC_{150} references diapazons $\mu\text{g/ml}$) ²	<i>h-CLAT</i> rezultāts attiecībā uz CD54 (EC_{200} references diapazons $\mu\text{g/ml}$) ²
2,4-dinitrohlorbenzols	97-00-7	ciets	sensibilizators (ļoti spēcīgs)	2–12	pozitīvs (0,5–10)	pozitīvs (0,5–15)
4-fenilēndiamīns	106-50-3	ciets	sensibilizators (spēcīgs)	5–95	pozitīvs (< 40)	negatīvs ($> 1,5$) ³
niķeļa sulfāts	10101-97-0	ciets	sensibilizators (vidējs)	30–500	pozitīvs (< 100)	pozitīvs (10–100)
2-merkaptbenzotiazols	149-30-4	ciets	sensibilizators (vidējs)	30–400	negatīvs (> 10) ³	pozitīvs (10–140)
R(+)-limonēns	5989-27-5	šķidr	sensibilizators (vājš)	> 20	negatīvs (> 5) ³	pozitīvs (< 250)
urīnvielas imidazolidinils	39236-46-9	ciets	sensibilizators (vājš)	25–100	pozitīvs (20–90)	pozitīvs (20–75)
izopropanols	67-63-0	šķidr	nav sensibilizators	> 5000	negatīvs (> 5000)	negatīvs (> 5000)
glicerīns	56-81-5	šķidr	nav sensibilizators	> 5000	negatīvs (> 5000)	negatīvs (> 5000)
pienskābe	50-21-5	šķidr	nav sensibilizators	1500–5000	negatīvs (> 5000)	negatīvs (> 5000)
4-aminobenzoskābe	150-13-0	ciets	nav sensibilizators	> 1000	negatīvs (> 1000)	negatīvs (> 1000)

Saīsinājumi: CAS Nr. — *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs

¹ *In vivo* bīstamības (un potences) prognoze ir balstīta uz LLNA datiem (3) (14). *In vivo* potence ir noteikta, izmantojot ECETOC ierosinātos kritērijus (24).

² Balstoties uz vēsturiski novērotajām vērtībām (13) (25).

³ Vēsturiski attiecībā uz šo marķieri gūti galvenokārt negatīvi rezultāti, tāpēc principā gaidāms negatīvs rezultāts. Sniegtā diapazona pamatā ir daži vēsturiski novērotie pozitīvie rezultāti. Ja tiek iegūts pozitīvs rezultāts, efektīvās koncentrācijas vērtībai jābūt ziņotajā references diapazonā.

2. papildinājums

ĀDAS *IN VITRO* SENSIBILIZĀCIJA: U937 ŠŪNU LĪNIJAS AKTIVĀCIJAS TESTS (*U-SENS*TM);

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

1. Tests *U-SENS*TM kvantificē izmaiņas tāda šūnu virsmas marķiera ekspresijā, kas asociēts ar monocītu un dendrītisko šūnu (DŠ) aktivāciju (konkrētāk, CD86), cilvēka histiocītiskās limfomas šūnu līnijā U937 pēc ekspozīcijas sensibilizatoriem (1). Pēc tam izmērītos CD86 šūnu virsmas marķieru ekspresijas līmeņus šūnu līnijā U937 izmanto par palīglīdzekli ādas sensibilizatoru nošķiršanā no nesensibilizatoriem.
2. Tests *U-SENS*TM ir izvērtēts validācijas pētījumā (2), ko koordinēja uzņēmums *L'Oreal*, un pēc tam to neatkarīgi profesionālizvērtējusi Eiropas Savienības References laboratorijas dzīvniektestēšanas alternatīvu jomā (*EURL ECVAM*) Zinātniskā konsultatīvā komiteja (*ESAC*) (3). Ņemot vērā visus pieejamos pierādījumus un regulatoru un ieinteresēto personu sniegtās ziņas, *EURL ECVAM* ir ieteikusi (4) *U-SENS*TM izmantot *IATA* ietvaros par palīglīdzekli, kas palīdz ādas sensibilizatorus nošķirt no nesensibilizatoriem apdraudējumu klasificēšanas un marķēšanas vajadzībām. Savā norādījumu dokumentā par ziņošanu par strukturētām pieejām datu integrācijai un individuāliem informācijas avotiem, ko izmanto ādas sensibilizācijas *IATA* ietvaros, ESAO aplūko vairākas gadījumu analīzes, kurās aprakstītas dažādas testēšanas stratēģijas un prognožu modeļi. Vienai no dažādažām definētajām pieejām pamatā ir *U-SENS* tests (5). Piemēri, kā *U-SENS*TM dati izmantoti kombinācijā ar citu informāciju, arī vēsturiskajiem datiem un esošiem derīgiem datiem par cilvēku (6), ir pieejami arī citur literatūrā (4) (5) (7).
3. Ir pierādīts, ka tests *U-SENS*TM ir pārnesams uz laboratorijām, kam ir pieredze ar paņēmieniem, kuros izmanto šūnu kultūras, un ar plūsmcitometrisko analīzi. Prognožu reproducējamības līmenis, kas sagaidāms no šā testa, ir aptuveni 90 % tajā pašā laboratorijā un 84 % citās laboratorijās (8). Validācijas pētījuma rezultāti (8) un citi publicētie pētījumi (1) kopumā liecina, ka salīdzinājumā ar *LLNA* rezultātiem šā testa pareizība ādas sensibilizatoru (t. i., ANO GHS / CLP 1. kat.) nošķiršanā no ādas nesensibilizatoriem ir 86 % (N=166) ar jutību 91 % (118/129) un specifiskumu 65 % (24/37). Salīdzinājumā ar rezultātiem, kas iegūti testos ar cilvēkiem, testa pareizība ādas sensibilizatoru (t. i., ANO GHS / CLP 1. kat.) nošķiršanā no ādas nesensibilizatoriem ir 77 % (N=101) ar jutību 100 % (58/58) un specifiskumu 47 % (20/43). Salīdzinājumā ar *LLNA* testā *U-SENS*TM pseidonegatīvas prognozes, visticamāk, skars ķīmikālijas, kurām novērojama zema līdz vidēja ādas sensibilizācijas potence (t. i., ANO GHS / CLP 1.B apakškatēgorija), nevis ķīmikālijas, kurām novērojama augsta ādas sensibilizācijas

potence (t. i., ANO GHS / CLP 1.A apakškatēgorija) (1) (8) (9). Visa šī informācija kopā norāda uz to, ka tests *U-SENS*TM var palīdzēt identificēt apdraudējumus, kas izraisa ādas sensibilizāciju. Tomēr pareizības vērtības, kas šeit sniegtas attiecībā uz *U-SENS*TM kā atsevišķu testu, ir tikai orientējošas, jo šis tests jāskata kombinācijā ar citiem informācijas avotiem *IATA* kontekstā un saskaņā ar vispārīgā ievada 7. un 8. punkta noteikumiem. Turklāt, izvērtējot ādas sensibilizācijas novērtēšanas metodes, kurās neizmanto dzīvniekus, jāņem vērā, ka *LLNA* tests, tāpat kā citi testi ar dzīvniekiem, var nepilnīgi atspoguļot situāciju cilvēka gadījumā.

4. Balstoties uz pašlaik pieejamajiem datiem, ir pierādīts, ka testu *U-SENS*TM var izmantot testējamām ķīmikālijām (arī kosmētikas līdzekļu sastāvdaļām, piem., konservantiem, virsmaktīvajiem aģentiem, aktīvajiem aģentiem, krāsām), kuru sakarā aktuālas ir dažādas organiskās funkcionālās grupas, fizikālķīmiskās īpašības, ādas sensibilizācijas potence (kas noteikta *in vivo* pētījumos) un plašs tādu atbildreakcijas mehānismu spektrs, par kuriem zināms, ka tie asociēti ar ādas sensibilizāciju (t. i., Maikla akceptora mehānisms, Šifa bāzu veidošanās, acilgrupas pārnese aģenta (acilpārnese aģenta) mehānisms, bimolekulārā nukleofilā aizvietošana [SN2] vai aromātiskā nukleofilā aizvietošana [SNAr]) (1) (8) (9) (10). Tests *U-SENS*TM ir izmantojams testējamajām ķīmikālijām, kuras šķīst vai stabili disperģējas (t. i., koloīds vai suspensija, kurā testējamā ķīmikālija nenosēžas vai neatdalās no šķīdinātāja/nesēja dažādās fāzēs) piemērotā šķīdinātājā/nesējā (sk. 13. punktu). Ar *U-SENS*TM izdevies iegūt pareizas prognozes attiecībā uz ķīmikālijām, kas ziņotajā datu kopā norādītas kā prehaptēni (t. i., ar oksidāciju aktivētas vielas) vai prohaptēni (t. i., vielas, kam vajadzīga fermentatīva aktivācija, piem., ar P450 fermentiem) (1) (10). Sakarā ar nespecifisku CD86 ekspresijas palielinājumu pseidopozitīvus rezultātus var uzrādīt vielas, kas izraisa membrānu bojājumus, jo 3 no 7 pseidopozitīvajiem rezultātiem (salīdzinājumā ar *in vivo* references klasifikāciju) deva virsmaktīvi aģenti (1). Tātad pozitīvi rezultāti, kas iegūti, testējot virsmaktīvus aģentus, jāvērtē piesardzīgi, savukārt attiecīgus negatīvus rezultātus tomēr var izmantot par palīglīdzekli testējamās ķīmikālijas atzīšanā par nesensibilizatoru. Ar *U-SENS*TM var vērtēt fluorescējošas testējamās ķīmikālijas (1), tomēr ļoti fluorescējošas testējamās ķīmikālijas, kuru starojuma viļņa garums ir tāds pats kā fluoresceīna izotiocianātam (FITC) vai propīdija jodīdam (PI), traucē detektēšanu ar plūsmas citometriju, tāpēc ar FITC konjugētām antivielām (potenciāli pseidonegatīvi rezultāti) vai PI (nav izmērāma dzīvotspēja) tās nevar izvērtēt pareizi. Tādā gadījumā var izmantot ar citiem fluorohromiem marķētas antivielas vai citus citotoksiskuma marķierus, ja vien, testējot 2.2. papildinājumā norādītās standartvielas, var pierādīt, ka tie dod līdzīgus rezultātus kā ar FITC marķētās antivielas vai PI (sk. 18. punktu). Ņemot vērā iepriekš minēto, pozitīvi rezultāti, kas iegūti ar virsmaktīviem aģentiem, un negatīvi rezultāti, kas iegūti ar ļoti fluorescējošām testējamajām ķīmikālijām, jāinterpretē noteikto ierobežojumu kontekstā un kopā ar citiem informācijas avotiem *IATA* satvarā. Gadījumos, kad ir liecības,

ka tests *U-SENS*TM nav izmantojams vēl citu konkrētu kategoriju testējamajām ķimikālijām, to attiecīgo kategoriju ķimikālijām neizmanto.

5. Kā norādīts iepriekš, tests *U-SENS*TM palīdz ādas sensibilizatorus nošķirt no ādas nesensibilizatoriem. Integrētā pieejā, piem., *IATA*, tas var palīdzēt novērtēt arī sensibilizācijas potenci. Tomēr, lai noteiktu, kā *U-SENS*TM rezultāti varētu palīdzēt novērtēt potenci, jāiegulda papildu darbs, kura pamatā vēlams būt datiem par cilvēku.
6. Definīcijas ir sniegtas 2.1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS

7. Tests *U-SENS*TM ir *in vitro* tests, kas kvantificē izmaiņas šūnu virsmas marķiera CD86 ekspresijā cilvēka histiocītiskās limfomas šūnu līnijā U937 45±3 stundas pēc ekspozīcijas testējamajai ķimikālijai. Virsmas marķieris CD86 ir tipisks U937 aktivācijas marķieris. Ir zināms, ka CD86 ir līdzstimulējoša molekula, kura var atdarināt monocītisko aktivāciju, kam ir svarīga nozīme T šūnu praimingā. Izmaiņas CD86 šūnu virsmas marķiera ekspresijā mēra ar plūsmas citometriju pēc šūnu iekrāsošanas, parasti ar antivielām, kas marķētas ar fluoresceīna izotiocianātu (FITC). Paralēli izdara arī citotoksiskuma mērījumu (piem., ar PI), lai noteiktu, vai CD86 šūnu virsmas marķiera ekspresijas aktivācija ir novērojama arī pie subcitotoksiskām koncentrācijām. Lai palīdzētu nošķirt sensibilizatorus no nesensibilizatoriem, aprēķina un prognozes modelī (sk. 19. punktu) izmanto CD86 šūnu virsmas marķiera stimulācijas indeksu (SI) salīdzinājumā ar šķīdinātāja/nesēja kontroles stimulācijas indeksu.

KOMPETENCES PIERĀDĪŠANA

8. Pirms šajā testēšanas metodes B.71 papildinājumā aprakstītā testa regulāras izmantošanas laboratorijām, ievērojot labu *in vitro* metožu praksi (11), jāpierāda sava tehniskā kompetence, izmantojot 2.2. papildinājumā uzskaitītās 10 standartvielas. Testa lietotājiem turklāt jāuztur vēsturiska datubāze ar datiem, kas iegūti reaģētspējas pārbaudēs (sk. 11. punktu) un ar pozitīvajām un šķīdinātāja/nesēja kontrolēm (sk. 15.–16. punktu), un ar šo datu palīdzību jāpārliedzinās, ka laika gaitā testa reproducējamība konkrētajā laboratorijā saglabājas tāda pati.

PROCEDŪRA

9. Šis tests ir balstīts uz *U-SENS*TM dzīvniek eksperimentiem alternatīvu metožu datubāzes pakalpojuma (*DB-ALM*) protokolu Nr. 183 (12). Testu *U-SENS*TM ieviešot un izmantojot laboratorijā, jāizmanto darba standartprocedūras (*SOP*). Automatizētu *U-SENS*TM izpildes sistēmu var izmantot tad, ja, piem., testējot 2.2. papildinājumā norādītās standartvielas, var

pierādīt, ka tā dod līdzīgus rezultātus. Tālāk sniegts galveno testa *U-SENS*TM komponentu un procedūru apraksts.

Šūnu sagatavošana

10. Testam *U-SENS*TM izmanto cilvēka histiocītiskās limfomas šūnu līniju U937 (13). Šūnas (klons CRL1593.2) ir ieteicams sagādāt no kvalificētas šūnu bankas, piem., Amerikas tipveida kultūru kolekcijas.
11. U937 šūnas kultivē 37 °C pie 5 % CO₂, mitrinātā atmosfērā, RPMI-1640 barotnē, kas papildināta ar 10 % liellopu embriju seruma jeb govju fetālā seruma (*FCS*), 2 mM L-glutamīna, 100 vienībām/ml penicilīna un 100 µg/ml streptomīna (pilnīga barotne). U937 šūnas parasti pārsēj reizi 2–3 dienās blīvumā 1,5 vai 3×10^5 šūnas/ml. Šūnu blīvumam nevajadzētu pārsniegt 2×10^6 šūnas/ml, un šūnu dzīvotspējai, kas izmērīta ar tripānzilo uzņēmumu šūnu izslēgšanu, vajadzētu būt ≥ 90 % (neizmantojot pirmajai pasāžai pēc atkausēšanas). Pirms izmantošanas testēšanai katra šūnu, *FCS* vai antivielu partija jākvalificē, pārbaudot tās reaģētspēju. Šūnu reaģētspēja jāpārbauda, izmantojot pozitīvo kontroli, pikrilsulfonskābi (2,4,6-trinitrobenzolsulfonskābe: TNBS) (*CAS* Nr.: 2508-19-2, ≥ 99 % tīrība), un negatīvo kontroli, pienskābi (PS) (*CAS* Nr. 50-21-5, ≥ 85 % tīrība), vismaz nedēļu pēc atkausēšanas. Pārbaudot šūnu reaģētspēju, katrai no abām kontrolēm jātestē sešas galīgās koncentrācijas (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 µg/ml un PS: 1, 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml). Pilnīgā barotnē izšķīdinātai TNBS jāizsauc pozitīva ar koncentrāciju saistīta CD86 atbildreakcija (kurā, piem., nākamā lielākā koncentrācija aiz koncentrācijas, kas izsauc pozitīvu atbildreakciju, CD86 SI ≥ 150 , dod lielāku CD86 SI), bet pilnīgā barotnē izšķīdinātai PS jāizsauc negatīva CD86 atbildreakcija (sk. 21. punktu). Testam izmanto tikai tās šūnu partijas, kas divas reizes izturējušas reaģētspējas pārbaudi. Šūnas var pavairot līdz septiņām nedēļām pēc atkausēšanas. Pasāžu skaitam nevajadzētu pārsniegt 21. Reaģētspējas pārbaude veicama saskaņā ar 18.–22. punktā aprakstītajām procedūrām.
12. Testēšanas vajadzībām U937 šūnas uzsēj vai nu blīvumā 3×10^5 šūnas/ml, vai 6×10^5 šūnas/ml un kultivēšanas kolbās priekšskultivē attiecīgi 2 vai 1 dienu. Ja tam ir sniegts pietiekams zinātniskais pamatojums un var pierādīt (piem., testējot 2.2. papildinājuma standartvielas), ka tas dod līdzīgus rezultātus, nupat aprakstīto priekšskultivēšanas apstākļu vietā var izmantot citus. No kultivēšanas kolbas ievāktās šūnas testēšanas dienā resuspendē svaigā kultūras barotnē blīvumā 5×10^5 šūnas/ml. Tad šūnas sadala 96 iedobju plakandibena platē, izmantojot 100 µl (galīgais šūnu blīvums: $0,5 \times 10^5$ šūnas uz iedobi).

Testējamo ķīmikāliju un kontroles vielu sagatavošana

13. Šķīdību novērtē pirms testēšanas. Šajā nolūkā testējamās ķīmikālijas koncentrācijā 50 mg/ml izšķīdina vai stabili disperģē pilnīgā barotnē, kas ir pirmais šķīdinātāja variants, vai, ja testējamā ķīmikālijā pilnīgās barotnes šķīdinātājā/nesējā nešķīst, dimetilsulfoksīdā

(DMSO, $\geq 99\%$ tīrība), kas ir otrais šķīdinātāja/nesēja variants. Ja ķīmikālija šķīdinātājā/nesējā šķīst, tad, lai veiktu testēšanu, testējamo ķīmikāliju izšķīdina pilnīgā barotnē līdz galīgajai koncentrācijai 0,4 mg/ml. Ja ķīmikālija šķīst tikai DMSO, to izšķīdina līdz koncentrācijai 50 mg/ml. Ja tam ir sniegts pietiekams zinātniskais pamatojums, var izmantot citus šķīdinātājus/nesējus. Jāņem vērā testējamās ķīmikālijas stabilitāte galīgajā šķīdinātājā/nesējā.

14. Testējamās ķīmikālijas un kontroles vielas sagatavo testēšanas dienā. Tā kā netiek veikts devas noteikšanas tests, pirmajā izpildes reizē jātestē ķīmikālijas šķīdums attiecīgajā šķīdinātājā/nesējā (vai nu pilnīgā barotnē, vai 0,4 % DMSO šķīduma barotnē) 6 galīgajās koncentrācijās (1, 10, 20, 50, 100 un 200 $\mu\text{g/ml}$). Nākamajās izpildes reizēs ar attiecīgo šķīdinātāju/nesēju sagatavo vismaz 4 testējamās ķīmikālijas darba šķīdumus (t. i., vismaz 4 koncentrācijas) — sākot ar 0,4 mg/ml pilnīgā barotnē vai 50 mg/ml DMSO. Beigās darba šķīdumus izmanto apstrādei, platē esošajam darba šķīdumam pievienojot tādu pašu tilpumdaudzumu U937 šūnu suspensijas (sk. 11. punktu) un tādējādi panākot vēl vienu atšķaidījumu ar atšķaidījuma koeficientu 2 (12). Koncentrācijas (vismaz 4 koncentrācijas) nākamajām izpildes reizēm izvēlas atkarībā no katras iepriekšējās izpildes reizes rezultātiem (8). Izmantojamās galīgās koncentrācijas ir 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 un 200 $\mu\text{g/ml}$. Maksimālā galīgā koncentrācija ir 200 $\mu\text{g/ml}$. Ja pie 1 $\mu\text{g/ml}$ konstatē pozitīvu CD86 vērtību, tad izvērtē 0,1 $\mu\text{g/ml}$, lai noskaidrotu, kādā koncentrācijā testējamā ķīmikālija neinducē CD86 atbildreakciju virs pozitīvās atbildreakcijas sliekšņa. Katrā izpildes reizē, kurā tiek novērota pozitīva CD86 atbildreakcija uz attiecīgo koncentrāciju, aprēķina EC_{150} (koncentrāciju, pie kuras ķīmikālija sasniedz pozitīvās CD86 atbildreakcijas sliekšni 150 %, sk. 19. punktu). Ja testējamā ķīmikālija inducē pozitīvu CD86 atbildreakciju neatkarīgi no koncentrācijas, aprēķināt EC_{150} var nebūt relevanti, kā aprakstīts *U-SENSTM DB-ALM* protokolā Nr. 183 (12). Katrā izpildes reizē, ja iespējams, aprēķina CV_{70} (koncentrāciju, pie kuras ķīmikālija sasniedz citotoksiskuma sliekšni 70 %, sk. 19. punktu) (12). Lai noskaidrotu, kā koncentrācija ietekmē CD86 atbildreakcijas palielinājumu, visas koncentrācijas no izmantojamo koncentrāciju vidus jāizvēlas regulāros atstatumos diapazonā no EC_{150} (vai lielākā necitotoksiskā koncentrācija, pie kuras CD86 atbildreakcija ir negatīva) un CV_{70} (vai lielākā atļautā koncentrācija, t. i., 200 $\mu\text{g/ml}$). Vienā izpildes reizē jātestē vismaz 4 koncentrācijas, no kurām vismaz 2 jābūt tādām pašām kā iepriekšējā reizē vai reizēs, lai būtu iespējams rezultātus salīdzināt.
15. Par šķīdinātāja/nesēja kontroli testā *U-SENSTM* izmanto pilnīgu barotni (izšķīdinātām vai stabili disperģētām testējamajām ķīmikālijām) (sk. 4. punktu) vai 0,4 % DMSO šķīdumu pilnīgā barotnē (DMSO izšķīdinātām vai stabili disperģētām testējamajām ķīmikālijām).

16. Par pozitīvo kontroli testā *U-SENS*TM izmanto TNBS (sk. 11. punktu), kas sagatavota pilnīgā barotnē. TNBS izmantojama par pozitīvo kontroli CD86 ekspresijas mērījumam tādā vienā galīgajā koncentrācijā platē (50 µg/ml), pie kuras šūnu dzīvotspēja ir > 70 %. Lai platē TNBS būtu koncentrācijā 50 µg/ml, sagatavo 1 M (t. i., 293 mg/ml) TNBS izejšķīdumu pilnīgā barotnē un tad pilnīgā barotnē ar koeficientu 2930 atšķaida līdz 100 µg/ml darba šķīdumam. Par negatīvo kontroli izmanto pienskābi (PS, CAS Nr. 50-21-5), kas koncentrācijā 200 µg/ml izšķīdināta pilnīgā barotnē (no 0,4 mg/ml izejšķīduma). Katrā izpildes reizē katrā platē sagatavo trīs replikātus ar neapstrādātu pilnīgas barotnes kontroli, šķīdinātāja/nesēja kontroli, negatīvo un pozitīvo kontroli (12). Ja ir pieejami vēsturiskie dati, no kuriem var iegūt salīdzināmus izpildes reižu pieņemamības kritērijus, var izmantot citas piemērotas pozitīvās kontroles. Izpildes reižu pieņemamības kritēriji ir tādi paši kā testējamajai ķimikālijai (sk. 12. punktu).

Testējamo ķimikāliju un kontroles vielu aplicēšana

17. 14.–16. punktā aprakstīto šķīdinātāja/nesēja kontroli vai darba šķīdumus attiecībā 1:1 (tilp./tilp.) samaisa ar 96 iedobju plakandibena platē sagatavotajām šūnu suspensijām (sk. 12. punktu). Tad apstrādātās plates 45±3 stundas 37 °C temperatūrā pie 5 % CO₂ inkubē. Lai izvairītos no gaistošu testējamo ķimikāliju iztvaikošanas un ar testējamajām ķimikālijām apstrādāto šūnu starpiedobju kontaminācijas, plates noslēdz ar puscaurlaidīgu membrānu (12).

Šūnu iekrāsošana

18. Pēc 45±3 ekspozīcijas stundām šūnas pārliet mikrotitrēšanas platē ar V veida iedobēm un ievāc centrifugējot. Uzskata, ka novērojama ar šķīdību saistīta interference, ja 45 ± 3 stundas pēc apstrādes (pirms šūnu iekrāsošanas) zem mikroskopa novērojami kristāli vai pilieni. Supernatantus nolej un atlikušās šūnas vienreiz noskalo ar 100 µl ledusauksta fosfātu buferšķīduma (FBS), kas satur 5 % liellopu embriju seruma (iekrāsošanas buferšķīdums). Pēc centrifugēšanas šūnas resuspendē, izmantojot 100 µl iekrāsošanas buferšķīduma, un 4 °C 30 min iekrāso ar 5 µl (piem., 0,25 µl) ar FITC marķētu anti-CD86 antivielu vai peļu IgG1 (izotips) antivielu, sargājot no gaismas. Izmanto *U-SENS*TM DB-ALM protokolā Nr. 183 (12) aprakstītās antivielas (CD86: BD-PharMingen #555657, klons: Fun-1, vai Caltag/Invitrogen # MHCD8601, klons: BU63; IgG1: BD-PharMingen #555748 vai Caltag/Invitrogen # GM4992). Testa izstrādātāju pieredzē dažādu partiju antivielu fluorescences intensitāte parasti ir līdzīga. Ja tie izturējuši reaģētspējas pārbaudi, testā var izmantot citus klonus vai antivielu piegādātājus (sk. 11. punktu). Tomēr, lai noteiktu vispiemērotāko koncentrāciju, lietotāji var apsvērt iespēju antivielas titrēt konkrētās laboratorijas apstākļos. Citas detektēšanas sistēmas, piem., ar fluorohromiem marķētas anti-CD86 antivielas, var izmantot, ja, piem., testējot 2.2. papildinājumā norādītās standartvielas, var pierādīt, ka tās dod līdzīgus rezultātus kā ar FITC konjugētās

antivielas. Šūnas divreiz noskalo ar 100 µl iekrāsošanas buferšķīduma un vienreiz ar 100 µl ledusauksta FBS un tad resuspendē ledusaukstā FBS (piem., 125 µl paraugiem, ko analizē manuāli pa stobriņam, vai 50 µl autosamplera plates gadījumā), kam pievieno PI šķīdumu (galīgā koncentrācija: 3 µl/ml). Citus citotoksiskuma marķierus, piem., 7-aminoaktinomicīnu D (7-AAD) vai tripānzilo, var izmantot tad, ja iespējams pierādīt, ka alternatīvie iekrāsotāji dod līdzīgus rezultātus kā PI, piem., veicot testus ar 2.2. papildinājumā uzskaitītajām standartvielām.

Analīze ar plūsmas citometriju jeb plūsmcitolometriskā analīze

19. CD86 ekspresijas līmeni un šūnu dzīvotspēju analizē ar plūsmas citometriju. Šūnas pēc lieluma (*FSC*) un granularitātes (*SSC*) attēlo logaritmiskā punktdiagrammā, lai skaidri noteiktu pirmā vārtējuma [*gate*] R1 populāciju un izslēgtu šūnu atliekas. Mērķis ir katrai iedobei vārtējumā R1 iegūt 10 000 šūnu. Šūna no tā paša vārtējuma R1 attēlo FL3 vai FL4/*SSC* punktdiagrammā. Dzīvotspējīgas šūnas nošķirt ar vēl vieniem vārtiem — R2 —, ar ko atlasa to šūnu populāciju, kuru reakcija uz propīdija jodīdu ir negatīva (kanāls FL3 vai FL4). Šūnu dzīvotspēju var aprēķināt ar citometra analīzes programmu, izmantojot nākamo vienādojumu. Ja šūnu dzīvotspēja ir maza, iegūst līdz 20 000 šūnu, ieskaitot nedzīvas šūnas. Alternatīva ir datus iegūt vienas minūtes laikā pēc analīzes sākšanas.

$$\text{Šūnu dzīvotspēja} = \frac{\text{Dzīvo šūnu skaits}}{\text{Iegūto (izmērīto) šūnu kopskaits}} \times 100$$

Pēc tam izmēra, kāda procentuālā daļa šo pēc R2 vārtoto dzīvotspējīgo šūnu (vārtējuma R1 ietvaros) ir FL1-pozitīvas šūnas. CD86 ekspresiju uz šūnu virsmas analizē FL1/*SSC* punktdiagrammā, kas vārtota pēc dzīvotspējīgām šūnām (vārtējums R2).

Iedobēm ar pilnīgu barotni / IgG1 analīzes marķieri nosaka tuvu pamatpopulācijai, lai pilnīgās barotnes kontrolēs IgG1 būtu mērķzonā 0,6 līdz 0,9 %.

Krāsas interference ir nobīde ar FITC marķēto IgG1 punktdiagrammā (IgG1 FL1 ģeometriski vidējais SI ≥ 150 %).

Kontroļu šūnu (neapstrādāto šūnu vai 0,4 % DMSO šķīduma šūnu) un ar ķimikāliju apstrādāto šūnu CD86 stimulācijas indeksu (SI) aprēķina ar šādu vienādojumu:

$$SI = \frac{\% \text{ apstrādāto šūnu } CD86^{+} - \% \text{ apstrādāto šūnu } IgG1^{+}}{\% \text{ kontroles šūnu } CD86^{+} - \% \text{ kontroles šūnu } IgG1^{+}} \times 100$$

% neapstrādāto kontroles šūnu IgG1⁺: FL1-pozitīvo IgG1 šūnu procentuālā daļa, kas atlasīta ar analīzes marķieri (pieņemamais diapazons: $\geq 0,6$ % un $< 1,5$ %, sk. 22. punktu), no dzīvotspējīgajām neapstrādātajām šūnām;

% kontroles/apstrādāto šūnu IgG1⁺/CD86⁺: FL1-pozitīvo IgG1/CD86 šūnu procentuālā daļa,

kas izmērīta, nepārvietojot analīzes marķieri, no dzīvotspējīgajām kontroles/apstrādātajām šūnām.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Datu izvērtēšana

20. Testā *U-SENS*TM aprēķina šādus parametrus: CV_{70} vērtība, t. i., koncentrācija, pie kuras U937 šūnu dzīvotspēja ir 70 % (tātad citotoksiskums ir 30 %), un EC_{150} vērtība, t. i., koncentrācija, pie kuras testējamās ķimikālijas inducē CD86 stimulācijas indeksu (SI) 150 % apmērā.

CV_{70} aprēķina ar log-lineāro interpolāciju saskaņā ar šādu vienādojumu:

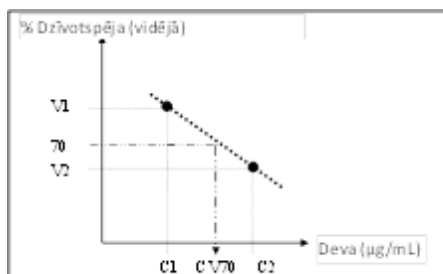
$$CV_{70} = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

kur:

V1 ir minimālā vērtība šūnu dzīvotspējai virs 70 %;

V2 ir maksimālā vērtība šūnu dzīvotspējai zem 70 %;

C1 un C2 ir koncentrācijas, pie kurām šūnu dzīvotspēja ir attiecīgi V1 un V2.



CV_{70} var noteikt arī citādi, ja vien pierāda (piem., testējot standartvielas), ka tas neietekmē rezultātus.

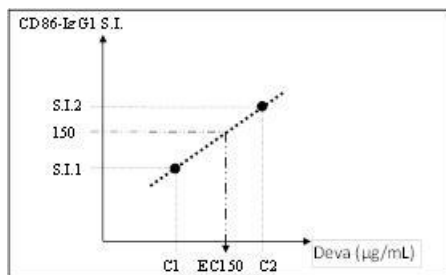
EC_{150} aprēķina ar log-lineāro interpolāciju saskaņā ar šādu vienādojumu:

$$EC_{150} = C1 + [(150 - SI1) / (SI2 - SI1) * (C2 - C1)]$$

kur:

C1 ir augstākā koncentrācija µg/ml, pie kuras CD86 SI < 150 % (SI1);

C2 ir zemākā koncentrācija µg/ml, pie kuras CD86 SI ≥ 150 % (SI2).



EC₁₅₀ un CV₇₀ vērtības aprēķina šādi:

- katrā izpildes reizē EC₁₅₀ un CV₇₀ izmanto, lai noskaidrotu, kā koncentrācija ietekmē CD86 atbildreakcijas palielinājumu (sk. 14. punktu);
- balstoties uz vidējo dzīvotspēju, nosaka kopējo CV₇₀ (12);
- ja ir prognozēts, ka testā *U-SENS*TM testējamās ķimikālijas rezultāts būs POZITĪVS, tas, balstoties uz CD86 vērtību vidējo SI, nosaka ķimikālijas kopējo EC₁₅₀ (sk. 21. punktu) (12).

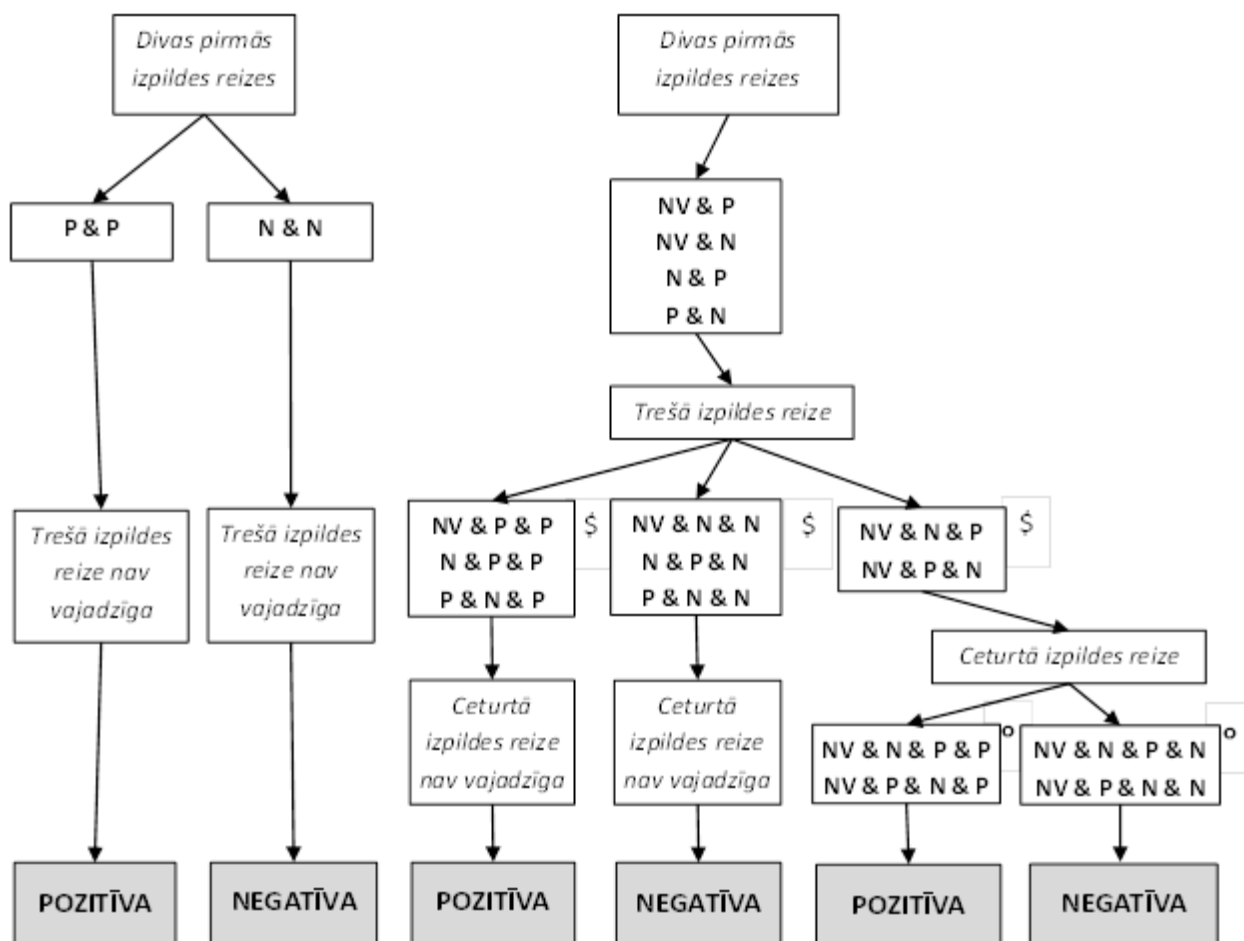
Prognozes modelis

21. Lai iegūtu vienu prognozi (POZITĪVU vai NEGATĪVU), CD86 ekspresijas mērījumam katru testējamo ķimikāliju testē vismaz četrās koncentrācijās un vismaz divās neatkarīgās izpildes reizēs (dažādās dienās).

- Uzskata, ka *U-SENS*TM izpildes reizes individuālais iznākums ir negatīvs ("N"), ja CD86 SI pie visām necitotoksiskajām koncentrācijām (šūnu dzīvotspēja $\geq 70\%$) ir mazāks par 150 % un nav novērojama nekāda interference (citotoksiskums, šķīdība (sk. 18. punktu) vai krāsa (sk. 19. punktu), lai kādas būtu necitotoksiskās koncentrācijas, pie kurām novērota interference). Visos citos gadījumos: ja CD86 SI ir lielāks par vai vienāds ar 150 % un/vai novērota interference, uzskata, ka *U-SENS*TM izpildes reizes individuālais iznākums ir pozitīvs ("P").
- Uzskata, ka *U-SENS*TM prognoze ir NEGATĪVA, ja negatīvas (N) ir vismaz divas neatkarīgas izpildes reizes (1. attēls). Ja pirmās divas izpildes reizes abas ir negatīvas (N), uzskata, ka *U-SENS*TM prognoze ir NEGATĪVA un ka trešā izpildes reize nav vajadzīga.
- Uzskata, ka *U-SENS*TM prognoze ir POZITĪVA, ja pozitīvas (P) ir vismaz divas neatkarīgas izpildes reizes (1. attēls). Ja pirmās divas izpildes reizes abas ir pozitīvas (P), uzskata, ka *U-SENS*TM prognoze ir POZITĪVA un ka trešā izpildes reize nav vajadzīga.
- Tā kā netiek veikts devas noteikšanas tests, izņēmums ir gadījums, kad pirmajā izpildes reizē CD86 SI tikai pie augstākās necitotoksiskās koncentrācijas ir lielāks par vai vienāds ar 150 %. Tad izpildes reizi uzskata par NEVIENNOZĪMĪGU (NV) un jaunās izpildes

reizē jātestē papildu koncentrācijas (diapazonā starp augstāko necitotoksisko koncentrāciju un zemāku citotoksisko koncentrāciju; sk. 20. punktu). Ja izpildes reize ir NV, vajadzīgas vismaz 2 papildu izpildes reizes, un, ja 2. un 3. izpildes reize nedod vienādu rezultātu (neatkarīgi N un/vai P), vajadzīga vēl ceturta izpildes reize (1. attēls). Tā kā koncentrācijas ir pielāgotas konkrētajai testējamajai ķimikālijai, papildu izpildes reizes uzskata par pozitīvām pat tad, ja CD86 sasniedz vai pārsniedz 150 % tikai vienas necitotoksiskas koncentrācijas gadījumā. Galīgā prognoze būs atkarīga no trīs vai četrām atsevišķo izpildes reizu rezultātu pārsvara (t. i., 2 no 3 vai 2 no 4) (1. attēls).

1. attēls. Testā *U-SENS*TM izmantojamais prognozes modelis. *U-SENS*TM prognoze jāskata *IATA* kontekstā un saskaņā ar 4. punkta un vispārīgā ievada 7., 8. un 9. punkta noteikumiem.



N: izpildes reize, kurā nav novērots ne pozitīvs CD86 rezultāts, ne interference.

P: izpildes reize, kurā novērots pozitīvs CD86 rezultāts un/vai interference.

NV: neviennozīmīgs. Pirmā izpildes reize ir neviennozīmīga vienīgi tad, ja CD86 rezultāts ir pozitīvs tikai augstākās necitotoksiskās koncentrācijas gadījumā.

#: neviennozīmīgs (NV) individuālais iznākums, kas konstatēts tikai pirmajā reizē, automātiski nozīmē, ka, lai panāktu pārsvarā pozitīvu (P) vai pārsvarā negatīvu (N) iznākumu vismaz 2 no 3 neatkarīgām izpildes reizēm, vajadzīga trešā izpildes reize.

\$: lodziņos redzamas relevantās trīs izpildes reižu rezultātu kombinācijas, kuru pamatā ir iepriekšējā lodziņā norādītie pirmo divu izpildes reižu rezultāti.

°: lodziņos redzamas relevantās četru izpildes reižu rezultātu kombinācijas, kuru pamatā ir iepriekšējā lodziņā norādītie pirmo trīs izpildes reižu rezultāti.

Pieņemamības kritēriji

22. Izmantojot testu *U-SENS*TM, jābūt izpildītiem šādiem pieņemamības kritērijiem (12).

- 45 ± 3 h ilgā ekspozīcijas perioda beigās neapstrādāto U937 šūnu triplikāta vidējai dzīvotspējai jābūt $> 90\%$ un nedrīkst būt novērots CD86 ekspresijas dreifs. Neapstrādāto U937 šūnu CD86 bāzlīnijas ekspresijai jābūt diapazonā no $\geq 2\%$ līdz $\leq 25\%$.
- Ja par šķīdinātāju izmanto DMSO, novērtē DMSO nesēja kontroles derīgumu, aprēķinot DMSO SI salīdzinājumā ar neapstrādāto šūnu SI, un triplikāta šūnu vidējai dzīvotspējai jābūt $> 90\%$. DMSO nesēja kontrole ir derīga, ja tās triplikāta CD86 SI vidējā vērtība ir mazāka nekā 250% neapstrādāto U937 šūnu triplikāta CD86 SI vidējās vērtības.
- Izpildes reizes uzskata par derīgām, ja vismaz divas no trim neapstrādāto U937 šūnu IgG1 vērtībām ir diapazonā no $\geq 0,6\%$ līdz $< 1,5\%$.
- Paralēli testēto negatīvo kontroli (pienskābe) uzskata par derīgu, ja vismaz divi no trim replikātiem dod negatīvu rezultātu (CD86 SI $< 150\%$) un nav citotoksiski (šūnu dzīvotspēja $\geq 70\%$).
- Pozitīvo kontroli (TNBS) uzskata par derīgu, ja vismaz divi no trim replikātiem dod pozitīvu rezultātu (CD86 SI $\geq 150\%$) un nav citotoksiski (šūnu dzīvotspēja $\geq 70\%$).

Testēšanas pārskats

23. Testēšanas pārskatā norāda šādas ziņas.

Testējamā ķīmikālija

Vienkomponenta vielas

- Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati
- Izskats, šķīdība pilnīgā barotnē, šķīdība DMSO, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama

- Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.
- Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)
- Testētās koncentrācijas
- Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama
- Katras testējamās ķimikālijas šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums

Daudzkomponentu vielas, *UVCB* un maisījumi

- Iespējami izsmeļošs raksturojums ar, piem., sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), tīrību, kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām
- Izskats, šķīdība pilnīgā barotnē, šķīdība DMSO un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama
- Molekulmasa vai šķietamā molekulmasa, ja tas ir maisījums/polimērs ar zināmu sastāvu, vai cita pētījuma norisei relevanta informācija
- Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)
- Testētās koncentrācijas
- Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama
- Katras testējamās ķimikālijas šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums

Kontroles

Pozitīvā kontrole

- Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati
- Izskats, šķīdība DMSO, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama (attiecīgā gadījumā)
- Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.
- Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)
- Testētās koncentrācijas
- Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama
- Norāde uz vēsturiskajiem pozitīvo kontroļu rezultātiem, kas apliecina atbilstību testa izpildes pieņemamības kritērijiem (attiecīgā gadījumā)

Negatīvā un šķīdinātāja/nesēja kontrole

- Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati
- Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.
- Ja tiek izmantoti citi (testēšanas vadlīnijā neminēti) šķīdinātāji/nesēji: izskats, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama
- Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama
- Katras testējamās ķimikālijas šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums

Testa apstākļi

- Sponsora, testējošās iestādes, pētījuma vadītāja vārds/nosaukums un adrese
- Izmantotā testa apraksts
- Izmantotā šūnu līnija, tās glabāšanas apstākļi un avots (piem., iestāde, no kuras tā saņemta)
- Izmantotais plūsmas citometrs (piem., modelis), arī instrumentu iestatījumi, izmantotās antivielas un citotoksiskuma marķieris
- Procedūra, ar kādu, testējot standartvielas, pierādīta laboratorijas kompetence šā testa izpildē, un procedūra, ar kādu pierādīta šā testa rezultātu reproducējamība laika griezumā, piem., vēsturiskie kontroļu dati un/vai vēsturiskie reaģētspējas pārbaužu dati

Testa pieņemamības kritēriji

- Ar šķīdinātāja/nesēja kontroli iegūtās šūnu dzīvotspējas un CD86 SI vērtības salīdzinājumā ar pieņemamības diapazoniem
- Ar pozitīvo kontroli iegūtās šūnu dzīvotspējas un SI vērtības salīdzinājumā ar pieņemamības diapazoniem
- Šūnu dzīvotspēja visās testētajās testētās ķimikālijas koncentrācijās

Testa procedūra

- Izmantotais izpildes reižu skaits
- Izmantotās testējamās ķimikālijas koncentrācijas, aplicēšana un ekspozīcijas laiks (ja atšķiras no rekomendētā)
- Ekspozīcijas ilgums
- Izmantoto izvērtēšanas un lēmuma pieņemšanas kritēriju apraksts

- Testa procedūras modifikāciju apraksts, ja tādas bijušas

Rezultāti

- Tabulā apkopoti dati, tostarp CV_{70} (attiecīgā gadījumā), šūnu dzīvotspējas vērtības, EC_{150} vērtības (attiecīgā gadījumā), kas katrā izpildes reizē iegūtas attiecībā uz testējamo ķimikāliju un pozitīvo kontroli, un norāde uz testējamās ķimikālijas novērtējumu saskaņā ar prognozes modeli
- Jebkādu citu relevantu novērojumu apraksts (attiecīgā gadījumā)

Rezultātu iztirzājums

- Ar testu *U-SENS*TM iegūto rezultātu iztirzājums
- Testa rezultātu apskats *IATA* kontekstā, ja pieejama cita relevanta informācija

Secinājumi

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. Accessible at: 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. Available at: [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. Available at: <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. Available at: [<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>].
- (7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.
- (8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015).

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

- (9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehn, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.
- (10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683-1696.
- (11) OECD. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf.
- (12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENSTM), 33pp. Accessible at: [<http://ecvam-dbal.m.jrc.ec.europa.eu/>].
- (13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.
- (14) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (15) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: United Nations Publications. Available at: 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. Available at: <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. Available at: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

2.1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā testa rezultāti sakrīt ar pieņemtajām references vērtībām. Tas ir testa veikspējas raksturlielums un viens no tā relevantuma aspektiem. Ar šo terminu, tāpat kā terminu “konkordantums”, bieži vien saprot testa pareizo iznākumu īpatsvaru (14).

AOP (nelabvēlīga iznākuma ceļš): no mērķķīmikālijas vai līdzīgu ķīmikāliju grupas ķīmiskās struktūras izrietoša notikumu sekvenca no molekulārā iniciācijas notikuma līdz interesējošajam *in vivo* iznākumam (15).

Koncentrācijatkarīga CD86 atbildreakcija: ja koncentrācijai, pie kuras rezultāts ir pozitīvs ($CD86\ SI \geq 150$) seko koncentrācija, pie kuras CD86 SI ir vēl lielāks, ir konstatējama koncentrācijatkarība (jeb koncentrācijatkarīga atbildreakcija).

Ķīmikālija: viela vai maisījums.

CV₇₀: aplēstā koncentrācija, pie kuras šūnu dzīvotspēja ir 70 %.

Dreifs: gadījums, kad i) 3. neapstrādātā kontroles replikāta koriģētā % CD86⁺ vērtība ir mazāka par 50 % no 1. un 2. neapstrādātā kontroles replikāta koriģēto % CD86⁺ vērtību vidējās vērtības un ii) 3. negatīvās kontroles replikāta koriģētā % CD86⁺ vērtība ir mazāka par 50 % no 1. un 2. negatīvās kontroles replikāta koriģēto % CD86⁺ vērtību vidējās vērtības.

EC₁₅₀: aplēstās koncentrācijas, pie kurām CD86 ekspresijas SI ir 150 %.

Plūsmas citometrija: citometrijas paņēmiens, kurā fluīdā suspendētas šūnas pa vienai laiž caur fokusētu ierosinošu gaismu, kura izkliedējas šūnām un to sastāvdaļām specifiskos rakstos; šūnas nereti tiek marķētas ar fluorescējošiem marķieriem tā, ka tās gaismu vispirms absorbē un tad emitē mainītā frekvencē.

Bīstamība: tāda aģenta vai situācijas iedabiska īpašība, kam piemīt potenciāls atstāt nelabvēlīgu ietekmi uz šim aģentam eksponētu organismu, sistēmu vai (apakš)populāciju.

IATA (integrētā testēšanas un novērtēšanas pieeja): strukturēta pieeja, ko izmanto ķīmikālijas vai ķīmikāliju grupas bīstamības identificēšanai (potenciāls), bīstamības raksturošanai (potence) un/vai drošuma novērtēšanai (potenciāls/potence un ekspozīcija) un kas stratēģiskā veidā integrē un izsver visus relevantos datus, lai varētu pieņemt normatīvu lēmumu par potenciālo bīstamību un/vai risku, un/vai nepieciešamību veikt turpmāku konkrētu un līdz ar to minimālu testēšanu.

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām.

Vienkomponenta viela: tāda viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā viena galvenā sastāvdaļa veido vismaz 80 % (masa/masa).

Daudzkomponentu viela: tāda viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā ≥ 10 % (masa/masa) un < 80 % (masa/masa). Daudzkomponentu vielas tiek iegūtas ražošanas procesā. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu vielas rodas ķīmiskās reakcijās.

Pozitīvā kontrole: replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar vielu, par ko ir zināms, ka tā inducē pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespējams novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlieku liela.

Prehaptēni: ķimikālijas, kas par sensibilizatoriem kļūst abiotiskas transformācijas procesā, piem., oksidācijas procesā.

Prohaptēni: ķimikālijas, kuru ādas sensibilizācijas potenciālu atraisa fermentatīva aktivācija.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testa pareizības (konkordantuma) aspektu (14).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē, izmantojot vienu un to pašu protokolu, testu vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās ilgākā laika nogrieznī var veikt reproducējami. To novērtē, aprēķinot metodes intralaboratorisko un interlaboratorisko reproducējamību un intralaboratorisko atkārtojamību (14).

Izpildes reize: reize, kurā vienu vai vairākas ķimikālijas testē paralēli ar šķīdinātāja/nesēja kontroli un pozitīvo kontroli.

Jutība: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām/aktīvajām ķimikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir tāda testa pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testa relevantuma izvērtēšanā (14).

SI: stimulācijas indekss. ģeometriskās vidējās fluorescences intensitātes relatīvās vērtības ar ķimikāliju apstrādātās šūnās salīdzinājumā ar attiecīgajām vērtībām ar šķīdinātāju apstrādātās šūnās.

Šķīdinātāja/nesēja kontrole: neapstrādāts paraugs, kurā ir visi testa sistēmas komponenti, izņemot testējamo ķimikāliju, bet ieskaitot izmantoto šķīdinātāju/nesēju. To izmanto, lai noteiktu bāzlinijas atbildreakciju paraugiem, kas apstrādāti ar attiecīgajā šķīdinātājā/nesējā izšķīdinātu vai stabili disperģētu testējamo ķimikāliju. Ja testā izmanto arī paralēlu barotnes kontroli, šis paraugs parāda arī to, vai šķīdinātājs/nesējs mijiedarbojas ar testa sistēmu.

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām ķīmikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir tāda testa pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testa relevantuma izvērtēšanā (14).

Iekrāsošanas buferšķīdums: fosfātu fizioloģiskais buferšķīdums, kas satur 5 % liellopu embriju seruma.

Viela: ķīmiskais elements un tā dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, ieskaitot to stabilizācijai vajadzīgās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un neizmainot tās sastāvu.

Testējamā ķīmikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testu.

Apvienoto Nāciju Organizācijas Ķīmikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma (ANO GHS): sistēma, kurā ķīmikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un kura paredz atbilstošus saziņas elementus, piem., piktogrammas, signālvārdus, bīstamības apzīmējumus, drošības prasību apzīmējumus un drošības datu lapas, ar mērķi sniegt informāciju par ķīmikāliju nelabvēlīgo ietekmi, lai aizsargātu cilvēkus (tostarp darba devējus, darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (16).

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kuras ir kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

Derīgs tests: tests, kas tiek uzskatīts par pietiekami relevantu un ticamu konkrētam nolūkam un ir balstīts uz zinātniski pareiziem principiem. Tests nekad nav derīgs absolūtā izteiksmē; tas vienmēr ir derīgs tikai kādam konkrētam nolūkam (14).

2.2. papildinājums

STANDARTVIELAS

Pirms šajā testēšanas metodes B.71 papildinājumā aprakstītā testa regulāras izmantošanas laboratorijām jāapliecina sava tehniskā kompetence, pareizi iegūstot paredzamo *U-SENS*TM prognozi attiecībā uz 1. tabulā ieteiktajām 10 vielām un attiecībā uz vismaz 8 no 10 standartvielām iegūstot CV₇₀ un EC₁₅₀ vērtības, kuras ietilpst attiecīgajā references diapazonā. Standartvielas ir atlasītas tā, lai tās reprezentētu visu ādas sensibilizācijas apdraudējumu izraisīto atbildreakciju diapazonu. Citi atlases kritēriji bija vielu komerciālā pieejamība un kvalitatīvu ar testu *U-SENS*TM iegūtu *in vivo* references datu, kā arī kvalitatīvu ar testu *U-SENS*TM iegūtu *in vitro* datu pieejamība. Par testu *U-SENS*TM ir pieejami arī publicēti references dati (1) (8).

1. tabula. Vielas, kuras ieteicams izmantot, lai pierādītu tehnisko kompetenci izmantot testu *U-SENS*TM

Standartvielas	CAS Nr.	Agregā tstāvok lis	<i>In vivo</i> prognoze ¹	<i>U-SENS</i> TM Šķīdinātā js/ nesējs	<i>U-SENS</i> TM CV ₇₀ references diapazons µg/ml ²	<i>U-SENS</i> TM EC ₁₅₀ references diapazons µg/ml ²
4-fenilēndiamīns	106-50-3	ciets	sensibilizators (spēcīgs)	pilnīga barotne ³	< 30	pozitīvs (≤ 10)
pikrilsulfonskābe	2508-19-2	šķidr	sensibilizators (spēcīgs)	pilnīga barotne	> 50	pozitīvs (≤ 50)
dietilmaleāts	141-05-9	šķidr	sensibilizators (vidējs)	DMSO	10-100	pozitīvs (≤ 20)
rezorcīns	108-46-3	ciets	sensibilizators (vidējs)	pilnīga barotne	> 100	pozitīvs (≤ 50)
kanēļspirts	104-54-1	ciets	sensibilizators (vājš)	DMSO	> 100	pozitīvs (10–100)
4-alilanzols	140-67-0	šķidr	sensibilizators (vājš)	DMSO	> 100	pozitīvs (< 200)
saharīns	81-07-2	ciets	nav sensibilizators	DMSO	> 200	negatīvs (> 200)
glicerīns	56-81-5	šķidr	nav sensibilizators	pilnīga barotne	> 200	negatīvs (> 200)
pienskābe	50-21-5	šķidr	nav sensibilizators	pilnīga barotne	> 200	negatīvs (> 200)
salicilskābe	69-72-7	ciets	nav sensibilizators	DMSO	> 200	negatīvs (> 200)

Saīsinājumi: CAS Nr. — *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs

¹ *In vivo* bīstamības (un potences) prognoze ir balstīta uz LLNA datiem (1) (8). *In vivo* potence ir noteikta, izmantojot ECETOC ierosinātos kritērijus (17).

² Balstoties uz vēsturiski novērotajām vērtībām (1) (8).

³ Pilnīga barotne — barotne RPMI-1640, kas papildināta ar 10 % liellopu embriju seruma, 2 mM L-glutamīna, 100 vienībām/ml penicilīna un 100 µg/ml streptomicīna (8).

3. papildinājums

ĀDAS *IN VITRO* SENSIBILIZĀCIJA: TESTS *IL-8 LUC*

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

1. Atšķirībā no testiem, ar ko analizē šūnu virsmas marķieru ekspresiju, tests *IL-8 Luc* kvantificē izmaiņas *IL-8* — ar dendrītisko šūnu (DŠ) aktivāciju asociēta citokīna — ekspresijā. Izmantojot no THP-1 iegūto *IL-8* reportieršūnu līniju (THP-G8, kas izveidota no cilvēka akūtās monocītiskās leukēmijas šūnu līnijas THP-1), mēra *IL-8* ekspresiju pēc ekspozīcijas sensibilizatoriem (1). Tad luciferāzes ekspresiju izmanto par palīglīdzekli ādas sensibilizatoru nošķiršanā no nesensibilizatoriem.
2. Tests *IL-8 Luc* ir izvērtēts validācijas pētījumā (2), ko veica Japānas Alternatīvo metožu validācijas centrs (*JaCVAM*), **Ekonomikas, tirdzniecības un rūpniecības ministrija** (*METI*) un **Japānas Dzīvniektestēšanas alternatīvu sabiedrība** (*JSAAF*), un pēc tam, atbalstu sniedzot **Starptautiskajai sadarbībai alternatīvu testēšanas metožu jomā** (*ICATM*), neatkarīgi profesionālizvērtēts (3) *JaCVAM* un Veselības, darba un labklājības ministrijas (*MHLW*) paspārnē. Ņemot vērā visus pieejamos pierādījumus un regulatoru un ieinteresēto personu sniegtās ziņas, testu *IL-8 Luc* ir lietderīgi izmantot *IATA* ietvaros par palīglīdzekli, kas palīdz ādas sensibilizatorus nošķirt no nesensibilizatoriem apdraudējumu klasificēšanas un marķēšanas vajadzībām. Piemēri, kā testa *IL-8 Luc* dati izmantoti kombinācijā ar citu informāciju, ir pieejami literatūrā (4) (5) (6).
3. Ir pierādīts, ka tests *IL-8 Luc* ir pārnesams uz laboratorijām, kam ir pieredze ar šūnu kultūrām un luciferāzes mērījumiem. Reproducējamības līmenis ir attiecīgi 87,7 % tajā pašā laboratorijā un 87,5 % citās laboratorijās (2). Validācijas pētījuma dati (2) un citi publicētie darbi (1) (6) kopumā liecina, ka salīdzinājumā ar *LLNA* testā *IL-8 Luc* attiecībā uz 118 no 143 ķīmikālijām slēdziens bija pozitīvs vai negatīvs un attiecībā uz 25 ķīmikālijām — neviennozīmīgs, un testa *IL-8 Luc* pareizība ādas sensibilizatoru (ANO GHS / *CLP* 1. kat.) nošķiršanā no ādas nesensibilizatoriem (ANO GHS / *CLP* ne kategorizēti) ir 86 % (101/118) ar jutību 96 % (92/96) un specifiskumu 41 % (9/22). Izslēdzot vielas, kas ir ārpus tālāk (5. punktā) aprakstītā izmantojamības lauka, testā *IL-8 Luc* attiecībā uz 113 no 136 ķīmikālijām slēdziens bija pozitīvs vai negatīvs un attiecībā uz 23 ķīmikālijām — neviennozīmīgs, un testa *IL-8 Luc* pareizība bija 89 % (101/113) ar jutību 96 % (92/96) un specifiskumu 53 % (9/17). Izmantojot *Urbisch et al.* (7) norādītos datus par cilvēku, testā *IL-8 Luc* attiecībā uz 76 no 90 ķīmikālijām slēdziens bija pozitīvs vai negatīvs un attiecībā uz 14 ķīmikālijām — neviennozīmīgs, un pareizība bija 80 % (61/76) ar jutību 93 % (54/58) un specifiskumu 39 % (7/18). Izslēdzot vielas, kas ir ārpus izmantojamības lauka, testā *IL-8 Luc* attiecībā uz 71 no 84 ķīmikālijām slēdziens bija

pozitīvs vai negatīvs un attiecībā uz 13 ķīmikālijām — neviennozīmīgs, un testa pareizība bija 86 % (61/71) ar jutību 93 % (54/58) un specifiskumu 54 % (7/13). Testā *IL-8 Luc* pseidonegatīvas prognozes, visticamāk, skars ķīmikālijas, kurām novērojama zema/vidēja ādas sensibilizācijas potence (ANO GHS / CLP 1.B apakšskategorija), nevis ķīmikālijas, kurām novērojama augsta ādas sensibilizācijas potence (ANO GHS / CLP 1.A apakšskategorija) (6). Visa šī informācija kopā norāda uz to, ka tests *IL-8 Luc* var palīdzēt identificēt apdraudējumus, kas izraisa ādas sensibilizāciju. Tomēr pareizības vērtības, kas šeit sniegtas attiecībā uz *IL-8 Luc* kā atsevišķu testu, ir tikai orientējošas, jo šis tests jāskata kombinācijā ar citiem informācijas avotiem *IATA* kontekstā un saskaņā ar vispārīgā ievada 7. un 8. punkta noteikumiem. Turklāt, izvērtējot ādas sensibilizācijas testus, kuros neizmanto dzīvniekus, jāņem vērā, ka *LLNA* tests, tāpat kā citi testi ar dzīvniekiem, var nepilnīgi atspoguļot situāciju cilvēka gadījumā.

4. Balstoties uz pašlaik pieejamajiem datiem, ir pierādīts, ka testu *IL-8 Luc* var izmantot testējamām ķīmikālijām, kuru sakarā aktuālas ir dažādas organiskās funkcionālās grupas, atbildreakcijas mehānismi, ādas sensibilizācijas potence (kas noteikta *in vivo* pētījumos) un fizikālķīmiskās īpašības (2) (6).
5. Lai gan testā *IL-8 Luc* par šķīdinātāju izmanto *X-VIVOTM 15*, tas pareizi novērtēja ķīmikālijas, kuru $\text{Log } K_{ow} > 3,5$, un ķīmikālijas, kuru šķīdība ūdenī, aprēķināta ar *EPI SuiteTM*, ir apmēram 100 µg/ml sensibilizatorus, kas ūdenī šķīst vāji, tas detektē labāk nekā tests *IL-8 Luc*, kurā par šķīdinātāju izmanto dimetilsulfoksīdu (DMSO) (2). Tomēr attiecībā uz testējamām ķīmikālijām, kas koncentrācijā 20 mg/ml neizšķīst, rezultāti sakarā ar to vājo šķīdību *X-VIVOTM 15* var būt pseidonegatīvi. Tāpēc šādu ķīmikāliju gadījumā negatīvus rezultātus nedrīkst ņemt vērā. Validācijas pētījumā tika konstatēts, ka daudz pseidonegatīvu rezultātu iegūst, testējot anhidrīdus. Turklāt šūnu līnijas ierobežotās metaboliskās spējas (8) un eksperimenta apstākļu dēļ negatīvus rezultātus testā var dot arī prohaptēni (vielas, kurām nepieciešama metaboliskā aktivācija) un prehaptēni (vielas, kuras aktivizējas oksidējoties). Tomēr, lai gan domājamiem prehaptēniem/prohaptēniem (ķīmikālijām, par kurām ir aizdomas, ka tās varētu būt prehaptēni/prohaptēni) negatīvi rezultāti jāinterpretē piesardzīgi, testa *IL-8 Luc* datu kopā pareizi ir 11 no 11 slēdzieniem prehaptēnu gadījumā, 6 no 6 slēdzieniem prohaptēnu gadījumā un 6 no 8 slēdzieniem prehaptēnu/prohaptēnu gadījumā (2). Balstoties uz neseno visaptverošo apskatu par trīs bezdzīvnieku testiem (*DPRA*, *KeratinoSensTM* un *h-CLAT*), ko izmanto prehaptēnu un prohaptēnu noteikšanai (9), un arī apstākli, ka testā *IL-8 Luc* izmantotās THP-G8 šūnas pieder pie *h-CLAT* izmantotās šūnu līnijas THP-1, testa *IL-8 Luc* iekļaušana citu testu kombinācijā turklāt var uzlabot bezdzīvnieku testu jutību prehaptēnu un prohaptēnu noteikšanā. Līdz šim testētie virsmaktīvie aģenti neatkarīgi no tipa (piem., katjoniski, anjoniski, nejoniski) devuši (pseido)pozitīvus rezultātus. Visbeidzot, ķīmikālijas, kas ietekmē luciferāzi, var radīt maldīgu priekšstatu par tās aktivitāti vai ietekmēt mērījumus,

izraisot vai nu šķietamu inhibēšanos, vai pastiprinātu luminiscenci (10). Piem., ir ziņots, ka fītoestrogēna koncentrācijas, kas lielākas par 1 μ M, citos uz luciferāzi balstītos reportiergēnu testos radījušas luminiscences signālu traucējumus luciferāzes reportiergēna pārmērīgas aktivācijas dēļ. Tāpēc luciferāzes ekspresija, kas iegūta pie augstām fītoestrogēnu koncentrācijām vai tādu savienojumu koncentrācijām, kuri domājami izraisa fītoestrogēnisku luciferāzes reportiergēna aktivāciju, ir rūpīgi jāizmeklē (11). Ņemot vērā visus šos apsvērumus, virsmaktīvie aģenti, anhidrīdi un ķīmikālijas, kas ietekmē luciferāzi, ir ārpus šā testa izmantojamības lauka. Gadījumos, kad ir liecības, ka tests *IL-8 Luc* nav izmantojams vēl citu konkrētu kategoriju testējamajām ķīmikālijām, to attiecīgo kategoriju ķīmikālijām neizmanto.

6. Kā norādīts iepriekš, tests *IL-8 Luc* palīdz ādas sensibilizatorus nošķirt no ādas nesensibilizatoriem. Lai noskaidrotu, vai *IL-8 Luc* rezultāti kombinācijā ar citiem informācijas avotiem var palīdzēt novērtēt potenci, ir vajadzīga papildu informācija, vēlams, balstīta uz datiem par cilvēku.
7. Definīcijas ir sniegtas 3.1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS

8. Tests *IL-8 Luc* izmanto cilvēka monocītiskās leikēmijas šūnu līniju THP-1, kas iegūta no Amerikas tipveida kultūru kolekcijas (Manassas, VA, ASV). Tohoku Universitātes Medicīnas augstskolas Dermatoloģijas departaments, izmantojot šo šūnu līniju, izveidoja no THP-1 iegūtu *IL-8* reportieršūnu līniju THP-G8, kurā ir luciferāzes gēni *Stable Luciferase Orange (SLO)* un *Stable Luciferase Red (SLR)*, ko kontrolē attiecīgi *IL-8* un glicerāldehīda 3-fosfāta dehidrogenāzes (*GAPDH*) promoteri (1). Tas ļauj kvantitatīvi izmērīt luciferāzes gēna indukciju, detektējot luminiscenci no labi zināmiem gaismu izstarojošiem luciferāzes substrātiem, kas kalpo par *IL-8* un *GAPDH* aktivitātes rādītāju šūnās pēc to ekspozīcijas sensibilizējošām ķīmikālijām.
9. Divkrāsu testa sistēmu veido viena oranžo izstarojoša luciferāze (*SLO*; $\lambda_{maks.} = 580$ nm) (12) *IL-8* promotera gēnu ekspresijai un sarkano izstarojoša luciferāze (*SLR*; $\lambda_{maks.} = 630$ nm) (13) iekšējās kontroles promotera *GAPDH* gēnu ekspresijai. Reaģējot ar jāņtārpiņu d-luciferīnu, šīs divas luciferāzes izstaro dažādas krāsas, un to luminiscenci vienlaicīgi mēra viensoļa reakcijā, testa maisījuma izstaroto gaismu sadalot ar optisko filtru (14) (3.2. papildinājums).
10. THP-G8 šūnas 16 stundas apstrādā ar testējamo ķīmikāliju; pēc tam mēra *SLO* luciferāzes aktivitāti (*SLO-LA*), kas atspoguļo promotera *IL-8* aktivitāti, un *SLR* luciferāzes aktivitāti (*SLR-LA*), kas atspoguļo promotera *GAPDH* aktivitāti. Lai saīsinājumus būtu vieglāk uztvert, *SLO-LA* un *SLR-LA* sauc attiecīgi par *IL8LA* un *GAPLA*. Apzīmējumi, kas saistīti

ar luciferāzes aktivitāti testā *IL-8 Luc*, definēti 1. tabulā. Izmantojot mērījumu vērtības, aprēķina normalizēto *IL8LA* (*nIL8LA*), kas *IL8LA* un *GAPLA* attiecība, *nIL8LA* (*Ind-IL8LA*) indukciju, kas ir ar testējamo ķīmikāliju apstrādātu THP-G8 šūnu *nIL8LA* četrkārt mērītu vērtību un neapstrādātu THP-G8 šūnu *nIL8LA* vērtību aritmētisko vidējo attiecība, un *GAPLA* (*Inh-GAPLA*) inhibēšanos, kas ir ar testējamo ķīmikāliju apstrādātu THP-G8 šūnu *GAPLA* četrkārt mērītu vērtību un neapstrādātu THP-G8 šūnu *GAPLA* vērtību aritmētisko vidējo attiecība un ko izmanto par citotoksiskuma indikatoru.

1. tabula. Ar luciferāzes aktivitāti testā *IL-8 Luc* saistīto apzīmējumu definīcijas

Abreviatūra	Definīcija
<i>GAPLA</i>	<i>SLR</i> luciferāzes aktivitāte, kas atspoguļo promotera <i>GAPDH</i> aktivitāti
<i>IL8LA</i>	<i>SLO</i> luciferāzes aktivitāte, kas atspoguļo promotera <i>IL-8</i> aktivitāti
<i>nIL8LA</i>	<i>IL8LA/GAPLA</i>
<i>Ind-IL8LA</i>	Ar ķīmikālijām apstrādāto THP-G8 šūnu <i>nIL8LA</i> / neapstrādāto šūnu <i>nIL8LA</i>
<i>Inh-GAPLA</i>	Ar ķīmikālijām apstrādāto THP-G8 šūnu <i>GAPLA</i> / neapstrādāto šūnu <i>GAPLA</i>
CV ₀₅	Zemākā ķīmikālijas koncentrācija, pie kuras <i>Inh-GAPLA</i> ir < 0,05

11. Lai būtu vieglāk validēt modificētus *in vitro* *IL-8* luciferāzes testus, kas līdzinās testam *IL-8 Luc*, un lai ESAO testēšanas vadlīniju Nr. 442E būtu iespējams savlaicīgi attiecīgi grozīt ar mērķi šos testus tajā iekļaut, ir pieejami veikspējas standarti (VS) (15) Attiecībā uz testiem, kas validēti saskaņā ar VS, ESAO datu savstarpējā atzīšana (*Mutual Acceptance of Data, MAD*) būs garantēta tikai tad, ja ESAO šos testus būs izskatījusi un iekļāvusi attiecīgajā testēšanas vadlīnijā Nr. 442E (16).

KOMPETENCES PIERĀDĪŠANA

12. Pirms šajā testēšanas metodes B.71 papildinājumā aprakstītā testa regulāras izmantošanas laboratorijām, ievērojot labu *in vitro* metožu praksi (17), jāpierāda sava tehniskā kompetence, izmantojot 3.3. papildinājumā uzskaitītās 10 standartvielas. Testa lietotājiem turklāt jāuztur vēsturiska datubāze ar datiem, kas iegūti reaģētspējas pārbaudēs (sk. 15. punktu) un ar pozitīvajām un šķīdinātāja/nesēja kontrolēm (sk. 21.–24. punktu), un ar šo datu palīdzību jāpārliedz, ka laika gaitā testa reproducējamība konkrētajā laboratorijā saglabājas tāda pati.

PROCEDŪRA

13. Testam *IL-8 Luc* ir pieejama standartprocedūra, kas jāizmanto, veicot šo testu (18). Laboratorijas, kas vēlas šo testu veikt, rekombinanto šūnu līniju THP-G8 var iegūt no GPC

Lab. Co. Ltd. (Totori, Japāna), iepriekš parakstot ESAO parauga nosacījumiem atbilstošu materiālu nodošanas līgumu. Galveno testa komponentu un procedūru apraksts sniegts nākamajos punktos.

Šūnu sagatavošana

14. Testam *IL-8 Luc* izmanto šūnu līniju THP-G8 no *GPC Lab. Co. Ltd.* (Totori, Japāna) (sk. 8. un 13. punktu). Saņemtās šūnas pavairo (2–4 pasāžas) un uzglabā sasaldētas kā viendabīgu krājumu. Šā krājuma šūnas var pavairot līdz maksimāli 12 pasāžām vai maksimāli 6 nedēļas. Pavairošanai izmanto kultūras barotni RPMI-1640, kurā ir 10 % liellopu embriju seruma (*foetal bovine serum, FBS*), antibiotisks/antimikotisks šķīdums (100 U/ml penicilīna G, 100 µg/ml streptomīcīna un 0,25 µg/ml amfotericīna B 0,85 % fizioloģiskajā šķīdumā) (piem., GIBCO Cat#15240-062), 0,15 µg/ml puromicīna (piem., CAS Nr. 58-58-2) un 300 µg/ml G418 (piem., CAS Nr. 108321-42-2).
15. Pirms šūnu izmantošanas testēšanai tās jākvalificē, pārbaudot to reaģētspēju. Šī pārbaude jāveic 1–2 nedēļas vai 2–4 pasāžas pēc atkausēšanas, izmantojot pozitīvo kontroli, 4-nitrobenzilbromīdu (4-NBB) (CAS Nr. 100-11-8, ≥ 99 % tīrība), un negatīvo kontroli, pienskābi (PS) (CAS Nr. 50-21-5, ≥ 85 % tīrība). 4-NBB jāizsauc pozitīva *Ind-IL8LA* ($\geq 1,4$) atbildreakcija, savukārt PS — negatīva ($< 1,4$). Testam izmanto tikai šūnas, kas izturējušas reaģētspējas pārbaudi. Pārbaude veicama saskaņā ar 22.–24. punktā aprakstītajām procedūrām.
16. Testēšanas vajadzībām THP-G8 šūnas uzsēj blīvumā 2 līdz 5×10^5 šūnas/ml un kultivēšanas kolbās priekškulturē attiecīgi 48 vai 96 stundas. Testēšanas dienā no kultivēšanas kolbas ievāktās šūnas noskalo ar RPMI-1640, kas satur 10 % *FBS* bez antibiotikām, un resuspendē RPMI-1640, kas satur 10 % *FBS* bez antibiotikām, blīvumā 1×10^6 šūnas/ml. Tad šūnas sadala melnā 96 iedobju plakandibena platē (piem., Costar Cat#3603), izmantojot 50 µl (5×10^4 šūnas uz iedobi).

Testējamās ķīmikālijas un kontroles vielu sagatavošana

17. Testējamo ķīmikāliju un kontroles vielas sagatavo testēšanas dienā. Testā *IL-8 Luc* testējamās ķīmikālijas izšķīdina X-VIVO™ 15, komerciāli pieejamā bezseruma barotnē (Lonza, 04-418Q), līdz galīgajai koncentrācijai 20 mg/ml. X-VIVO™ 15 pievieno 20 mg testējamās ķīmikālijas (neatkarīgi no ķīmikālijas šķīdības) mikrocentrifūgas stobriņā, papildina līdz 1 ml tilpumam un tad 30 min intensīvi vorteksē un krata ar rotoru, kura maksimālais ātrums ir 8 apgr./min, apkārtējās vides temperatūrā (aptuveni 20 °C). Ja cietas ķīmikālijas joprojām nešķīst, stobriņu turklāt sonicē (apstrādā ar skaņu), līdz ķīmikālija pilnīgi izšķīdusi vai stabili disperģēta. Ja testējamā ķīmikālija X-VIVO™ 15 šķīst, šķīdumu ar X-VIVO™ 15 atšķaida, izmantojot atšķaidījuma koeficientu 5, un izmanto par testējamās ķīmikālijas izejšķīdumu X-VIVO™ 15 (4 mg/ml). Ja testējamā ķīmikālija X-

VIVO™ 15 nešķīst, maisījumu atkal vismaz 30 min rotē un tad 5 min centrifugē ar 15 000 apgr./min ($\approx 20\,000g$); iegūto supernatantu izmanto par testējamās ķīmikālijas izejšķīdumu X-VIVO™ 15. Citu šķīdinātāju (piem., DMSO, ūdens vai kultūras barotnes) izmantošana zinātniski jāpamato. Ķīmikāliju šķīdināšanas procedūra ir detalizēti aprakstīta 3.5. papildinājumā. 18.–23. punktā aprakstītos X-VIVO™ 15 šķīdumus attiecībā 1:1 (tilp./tilp.) samaisa ar melnajā 96 iedobju plakandibena platē sagatavotajām šūnu suspensijām (sk. 16. punktu).

18. Pirmās testa izpildes reizes mērķis ir noteikt citotoksisko koncentrāciju un novērtēt ķīmikāliju ādas sensibilizācijas potenciālu. Izmantojot X-VIVO™ 15, 96 iedobju testa blokā (piem., Costar Cat#EW-01729-03) izdara testējamās ķīmikālijas un X-VIVO™ 15 izejšķīdumu sērijveida atšķaidījumus ar atšķaidījuma koeficientu divi (sk. 3.5. papildinājumu). Pēc tam melnā 96 iedobju plakandibena platē 50 μ l šūnu suspensijas pievieno 50 μ l atšķaidītā šķīduma uz iedobi. Tātad testējamajām ķīmikālijām, kas šķīst X-VIVO™ 15, testējamo ķīmikāliju galīgās koncentrācijas ir diapazonā no 0,002 līdz 2 mg/ml (3.5. papildinājums). Testējamajām ķīmikālijām, kas X-VIVO™ 15 koncentrācijā 20 mg/ml nešķīst, nosaka tikai atšķaidījuma koeficientus diapazonā no 2 līdz 2^{10} , lai gan testējamo ķīmikāliju faktiskās galīgās koncentrācijas nav skaidras un ir atkarīgas no tā, cik piesātināts ir izejšķīdums — testējamās ķīmikālijas šķīdums X-VIVO™ 15.
19. Nākamajās testa izpildes reizē (t. i., otrais, trešais un ceturtais replikāts) X-VIVO™ 15 izejšķīdumu sagatavo koncentrācijā, kas četrkārtīgi pārsniedz šūnu dzīvotspējas koncentrāciju 05 (CV_{05} — zemākā koncentrācija, pie kuras *Inh-GAPLA* ir $< 0,05$) pirmajā eksperimentā. Ja pirmajā izpildes reizē *Inh-GAPLA* pie augstākās koncentrācijas zem 0,05 nesamazinās, X-VIVO™ 15 izejšķīdumu sagatavo augstākajā pirmās izpildes reizes koncentrācijā. CV_{05} koncentrāciju aprēķina, pirmās izpildes reizes izejšķīduma koncentrāciju dalot ar CV_{05} atšķaidījuma koeficientu (X) (atšķaidījuma koeficients CV_{05} (X) — atšķaidījuma koeficients, kas vajadzīgs izejšķīduma atšķaidīšanai līdz CV_{05}) (3.5. papildinājums). Ja testējamā viela X-VIVO koncentrācijā 20 mg/ml nešķīst, CV_{05} nosaka pēc izejšķīduma koncentrācijas $x\ 1/X$. 2. līdz 4. izpildes reizei sagatavo otru izejšķīdumu — $4 \times CV_{50}$ (3.5. papildinājums).
20. Otro X-VIVO™ 15 izejšķīdumu sērijveidā atšķaida ar atšķaidījuma koeficientu 1,5, izmantojot 96 iedobju testa bloku. Pēc tam melnā 96 iedobju plakandibena platē 50 μ l šūnu suspensijas pievieno 50 μ l atšķaidītā šķīduma uz iedobi. Katra testējamā ķīmikālija katrā koncentrācijā jātestē 4 iedobēs. Pēc tam paraugus samaisa ar plates kratītāju un uz 16 h inkubē 37 °C un pie 5 % CO_2 ; tad, kā aprakstīts tālāk, izmēra luciferāzes aktivitāti.
21. Šķīdinātāja kontrole ir šāds maisījums: 50 μ l X-VIVO™ 15 un 50 μ l šūnu suspensijas RPMI-1640, kas satur 10 % *FBS*, uz iedobi.

22. Par pozitīvo kontroli ieteicams izmantot 4-NBB. 1,5 ml mikrofūgas stobriņā sagatavo 20 mg 4-NBB, kam pievieno X-VIVO™ 15 līdz 1 ml. Stobriņu intensīvi vorteksē un krata ar rotoru, kura maksimālais ātrums ir 8 apgr./min, vismaz 30 min. Pēc 5 min ilgas centrifugēšanas (20 000 g) supernatantu atšķaida ar X-VIVO™ 15, izmantojot atšķaidījuma koeficientu 4, un 500 µl atšķaidītā supernatanta pārvieto uz iedobi 96 iedobju testa blokā. Atšķaidīto supernatantu vēl atšķaida ar X-VIVO™ 15, izmantojot atšķaidījuma koeficientus 2 un 4, un 50 µl šķīduma pievieno 50 µl THP-G8 šūnu suspensijai melnas 96 iedobju plakandibena plates iedobēs (3.6. papildinājums). Pozitīvā kontrole katrā koncentrācijā jātestē 4 iedobēs. Plati sakrata ar plates kratītāju un uz 16 h inkubē CO₂ inkubatorā (37 °C, 5 % CO₂); pēc tam izmēra luciferāzes aktivitāti, kā aprakstīts 29. punktā.
23. Par negatīvo kontroli ieteicams izmantot pienskābi (PS). 1,5 ml mikrofūgas stobriņā sagatavo 20 mg PS, kam pievieno X-VIVO™ 15 līdz 1 ml (20 mg/ml). 20 mg/ml PS šķīdumu atšķaida ar X-VIVO™ 15, izmantojot atšķaidījuma koeficientu 5 (4 mg/ml); 500 µl šā 4 mg/ml PS šķīduma pārvieto uz 96 iedobju testa bloka iedobi. Šo šķīdumu atšķaida ar X-VIVO™ 15, izmantojot atšķaidījuma koeficientu 2, un tad vēlreiz atšķaida ar atšķaidījuma koeficientu 2, iegūstot šķīdumus ar koncentrāciju 2 mg/ml un 1 mg/ml. 50 µl šo 3 šķīdumu un šķīdinātāja kontroles (X-VIVO™ 15) pievieno 50 µl THP-G8 šūnu suspensijas melnas 96 iedobju plakandibena plates iedobēs. Negatīvo kontroli katrā koncentrācijā testē 4 iedobēs. Plati sakrata ar plates kratītāju un uz 16 h inkubē CO₂ inkubatorā (37 °C, 5 % CO₂); pēc tam izmēra luciferāzes aktivitāti, kā aprakstīts 29. punktā.
24. Ja ir pieejami vēsturiskie dati, no kuriem var iegūt salīdzināmus izpildes reižu pieņemamības kritērijus, var izmantot citas piemērotas pozitīvās vai negatīvās kontroles.
25. Jāizvairās no gaistošu testējamo ķīmikāliju iztvaikošanas un testējamo ķīmikāliju starpiedobju kontaminācijas, piem., pirms inkubēšanas ar testējamajām ķīmikālijām plati noslēdzot.
26. Lai iegūtu pozitīvu vai negatīvu prognozi, ar testējamajām ķīmikālijām un šķīdinātāja kontroli vajadzīgas 2 līdz 4 izpildes reizes (sk. 2. tabulu). Katru izpildes reizi veic citā dienā ar svaigu X-VIVO™ 15 izejšķīdumu un neatkarīgi ievāktām šūnām. Šūnas var būt no vienas un tās pašas pasāžas.

Luciferāzes aktivitātes mērījumi

27. Luminiscenci mēra, izmantojot 96 iedobju mikroplates luminometru ar optiskajiem filtriem, piem., *Phelios* (ATTO, Tokija, Japāna), *Tristan 941* (Berthold, Bādvilbāde, Vācija) vai *ARVO* (PerkinElmer, Valtema, MA, ASV). Lai nodrošinātu reproducējamību,

luminometrs katram testam jākalibrē (19). Šai kalibrēšanai pieejamas rekombinantās luciferāzes, kas izstaro oranžu un sarkanu gaismu.

28. Uz katru plates iedobi, kurā ir ar ķīmikāliju apstrādāta vai neapstrādāta šūnu suspensija, pārnes 100 µl iepriekš sasildīta testa reaģenta *Tripluc® Luciferase (Tripluc)*. Plati 10 minūtes krata apkārtējās vides temperatūrā — aptuveni 20 °C. Luciferāzes aktivitātes mērīšanai plati ieliek luminometrā. Bioluminiscenci mēra gan bez optiskā filtra (F0), gan ar to (F1), katreiz 3 s. Citu iestatījumu izmantošanas gadījumā (piem., atkarībā no izmantotā luminometra modeļa) jāsniedz pamatojums.
29. Parametrus katrai koncentrācijai aprēķina, par pamatu ņemot izmērītās vērtības (piem., *IL8LA*, *GAPLA*, *nIL8LA*, *Ind-IL8LA*, *Inh-GAPLA*, *IL8LA* vidējā vērtība ± standartnovirze, *GAPLA* vidējā vērtība ± standartnovirze, *nIL8LA* vidējā vērtība ± standartnovirze, *Ind-IL8LA* vidējā vērtība ± standartnovirze, *Inh-GAPLA* vidējā vērtība ± standartnovirze un *Ind-IL8LA* 95 % ticamības intervāls). Šajā punktā izmantoto parametru definīcijas sk. attiecīgi I un IV papildinājumā.
30. Daudzkrāsu reportieru testos pirms mērīšanas parasti panāk krāsu izšķiršanu ar detektoriem (luminometru un plašu lasītāju), kas aprīkoti ar optiskajiem filtriem, piem., sliekšņfiltriem [*sharp-cut filters*] (garviļņu vai īsviļņu caurlaides filtriem) vai frekvenču joslas filtriem. Pirms testēšanas saskaņā ar 3.2. papildinājumu jākalibrē filtru pārvades koeficienti katrai bioluminiscences signālkrāsai.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Datu izvērtēšana

31. Lai iegūtu pozitīvu/negatīvu prognozi, katrai izpildes reizei jāatbilst šādiem kritērijiem:
 - uzskata, ka testa *IL-8 Luc* prognoze ir pozitīva, ja testējamās ķīmikālijas *Ind-IL8LA* $\geq 1,4$ un *Ind-IL8LA* 95 % ticamības intervāla apakšējā robeža $\geq 1,0$;
 - uzskata, ka testa *IL-8 Luc* prognoze ir negatīva, ja testējamās ķīmikālijas *Ind-IL8LA* $< 1,4$ un/vai *Ind-IL8LA* 95 % ticamības intervāla apakšējā robeža $< 1,0$.

Prognozes modelis

32. Testējamās ķīmikālijas, attiecībā uz kurām 1., 2., 3. un 4. reizē gūti divi pozitīvi rezultāti, uzskata par pozitīvām, savukārt tās, attiecībā uz kurām 1., 2., 3. un 4. reizē gūti trīs negatīvi rezultāti, uzskata par potenciāli negatīvām (2. tabula). No potenciāli negatīvām ķīmikālijām ķīmikālijas, kas X-VIVO™ 15 izšķīdušas koncentrācijā 20 mg/ml, uzskata par negatīvām, savukārt par ķīmikālijām, kas X-VIVO™ 15 koncentrācijā 20 mg/ml nav izšķīdušas, spriedumu neizdara (1. attēls).

2. tabula. Pozitīvu un potenciāli negatīvu ķīmikāliju identificēšanas kritēriji

1. izpildes reize	2. izpildes reize	3. izpildes reize	4. izpildes reize	Galīgā prognoze
Pozitīva	Pozitīva	—	—	Pozitīva
	Negatīva	Pozitīva	—	Pozitīva
		Negatīva	Pozitīva	Pozitīva
			Negatīva	Potenciāli negatīva
Negatīva	Pozitīva	Pozitīva	—	Pozitīva
		Negatīva	Pozitīva	Pozitīva
			Negatīva	Potenciāli negatīva
	Negatīva	Pozitīva	Pozitīva	Pozitīva
			Negatīva	Potenciāli negatīva
		Negatīva	—	Potenciāli negatīva

1. attēls. Galīgā slēdziena prognozes modelis**Pieņemamības kritēriji**

33. Izmantojot testu *IL-8 Luc*, jābūt izpildītiem šādiem pieņemamības kritērijiem:

- *Ind-IL8LA* vērtībai katrā izpildes reizē jāpārsniedz 5,0 vismaz vienā pozitīvās kontroles, 4-NBB, koncentrācijā;
- *Ind-IL8LA* vērtībai katrā izpildes reizē jābūt mazākai par 1,4 vismaz vienā negatīvās kontroles, pienskābes, koncentrācijā;

- datus no platēm, kuru kontroles iedobēs ar šūnām un *Tripluc*, bet bez ķīmikālijām *GAPLA* vērtība mazāk nekā pieckārtīgi pārsniedz šo vērtību iedobēs, kurās ir tikai testa barotne (50 µl RPMI-1640, kas satur 10 % *FBS*, un 50 µl X-VIVO™ 15 uz iedobi), atmet;
- datus no platēm, kurās *Inh-GAPLA* vērtība pie visām testējamo vai kontroles ķīmikāliju koncentrācijām ir mazāka nekā 0,05, atmet; tādā gadījumā pirmo testu atkārto tā, lai atkārtotā testa augstākā galīgā koncentrācija būtu iepriekšējā testa zemākā galīgā koncentrācija.

Testēšanas pārskats

34. Testēšanas pārskatā norāda šādas ziņas.

Testējamās ķīmikālijas

Vienkomponenta viela:

- Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati
- Izskats, šķīdība ūdenī, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama
- Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.
- Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)
- Šķīdība X-VIVO™ 15. Ja ķīmikālija X-VIVO™ 15 nešķīst, norāda, vai pēc centrifugēšanas novērojama izgulsnēšanās vai flotācija
- Testētās koncentrācijas
- Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama
- Ja neizmanto X-VIVO™ 15: katras testējamās ķīmikālijas šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums

Daudzkomponentu vielas, *UVCB* un maisījumi

- Iespējami izsmeļošs raksturojums ar, piem., sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), tīrību, kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām
- Izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama
- Molekulmasa vai šķietamā molekulmasa, ja tas ir maisījums/polimērs ar zināmu sastāvu, vai cita pētījuma norisei relevanta informācija

- Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)
- Šķīdība X-VIVO™ 15. Ja ķimikālija X-VIVO™ 15 nešķīst, norāda, vai pēc centrifugēšanas novērojama izgulsnēšanās vai flotācija
- Testētās koncentrācijas
- Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama
- Ja neizmanto X-VIVO™ 15: katras testējamās ķimikālijas šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums

Kontroles

Pozitīvā kontrole

- Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati
- Izskats, šķīdība ūdenī, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama (attiecīgā gadījumā)
- Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.
- Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)
- Testētās koncentrācijas
- Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama
- Norāde uz vēsturiskajiem pozitīvo kontroļu rezultātiem, kas apliecina atbilstību piemērotiem pieņemamības kritērijiem (attiecīgā gadījumā)

Negatīvā kontrole

- Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i) un/vai citi identifikācijas dati
- Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.
- Ja tiek izmantotas citas (testēšanas vadlīnijā neminētas) negatīvās kontroles: izskats, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama
- Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama
- Katras testējamās ķimikālijas šķīdinātāja izvēles pamatojums

Testa apstākļi

- Sponsora, testējošās iestādes, pētījuma vadītāja vārds/nosaukums un adrese
- Izmantotā testa apraksts
- Izmantotā šūnu līnija, tās glabāšanas apstākļi un avots (piem., iestāde, no kuras tā saņemta)
- *FBS* partijas numurs un izcelsme, melnās 96 iedobju plakandibena plates partijas numurs un reaģenta *Tripluc* partijas numurs
- Testēšanā izmantoto šūnu pasāžu skaits un blīvums
- Šūnu skaitīšanas metode, kas izmantota uzsēšanai pirms testēšanas, un pasākumi, kas veikti, lai nodrošinātu šūnu viendabīgu sadalījumu skaita ziņā
- Izmantotais luminometrs (piem., modelis), arī instrumentu iestatījumi, izmantotais luciferāzes substrāts un pienācīgu luminiscences mērījumu pierādīšana ar 3.2. papildinājumā aprakstīto kontroltestu
- Procedūra, ar kuru pierādīta laboratorijas kompetence izmantot šo testēšanas metodi (piem., testējot standartvielas) vai apliecināta testēšanas metodes ilgstoša reproducējamība

Testa procedūra

- Replikātu un izpildes reižu skaits
- Testējamās ķimikālijas koncentrācijas, aplicēšanas procedūras un ekspozīcijas laiks (ja atšķiras no rekomendētajiem)
- Izmantoto izvērtēšanas un lēmuma pieņemšanas kritēriju apraksts
- Izmantoto pētījuma pieņemamības kritēriju apraksts
- Testa procedūras modifikāciju apraksts, ja tādas bijušas

Rezultāti

- *IL8LA* un *GAPLA* mērījumi
- *nIL8LA*, *Ind-IL8LA* un *Inh-GAPLA* aprēķini
- *Ind-IL8LA* 95 % ticamības intervāls
- Grafiks, kurā attēlotas devas–atbildreakcijas līknes attiecībā uz luciferāzes aktivitātes inducēšanos un dzīvotspēju
- Jebkādu citu relevantu novērojumu apraksts (attiecīgā gadījumā)

Rezultātu iztīrājums

- Ar testu *IL-8 Luc* iegūto rezultātu iztīrājums

- Testa rezultātu apskats *IATA* kontekstā, ja pieejama cita relevanta informācija

Secinājums

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. Available at: <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. Available at: <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. Available at: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol* 69:371-9.
- (6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 29:1816-30.
- (7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol* 71:337-51.
- (8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. (2010). A comparative

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

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

Cooperation and Development, Paris. Available at:
http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf.

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

3.1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā testa rezultāti sakrīt ar pieņemtajām references vērtībām. Tas ir testa veikspējas raksturlielums un viens no tā relevantuma aspektiem. Ar šo terminu, tāpat kā terminu “konkordantums”, bieži vien saprot testa pareizo iznākumu īpatsvaru (16).

AOP (nelabvēlīga iznākuma ceļš): no mērķķīmikālijas vai līdzīgu ķīmikāliju grupas ķīmiskās struktūras izrietoša notikumu sekvence no molekulārā iniciācijas notikuma līdz interesējošajam *in vivo* iznākumam (20).

Ķīmikālija: viela vai maisījums.

CV₀₅: šūnu dzīvotspēja 05, t. i., minimālā koncentrācija, pie kuras ķīmikāliju *Inh-GAPLA* vērtība ir mazāka par 0,05.

***FInSLO-LA*:** validācijas ziņojumā un iepriekšējās publikācijās par testu *IL-8 Luc* lietota abreviatūra, ar ko apzīmē *Ind-IL8LA*. Definīciju sk. ierakstā par *Ind-IL8LA*.

***GAPLA*:** luciferāzes aktivitāte, kas raksturīga *Stable Luciferase Red (SLR)* (λ maks. = 630 nm), ko regulē *GAPDH* promoters un kas uzrāda šūnu dzīvotspēju un dzīvotspējīgo šūnu skaitu.

Bīstamība: tāda aģenta vai situācijas iedabiska īpašība, kam piemīt potenciāls atstāt nelabvēlīgu ietekmi uz šim aģentam eksponētu organismu, sistēmu vai (apakš)populāciju.

***IATA* (integrētā testēšanas un novērtēšanas pieeja):** strukturēta pieeja, ko izmanto ķīmikālijas vai ķīmikāliju grupas bīstamības identificēšanai (potenciāls), bīstamības raksturošanai (potence) un/vai drošuma novērtēšanai (potenciāls/potence un ekspozīcija) un kas stratēģiskā veidā integrē un izsver visus relevantos datus, lai varētu pieņemt normatīvu lēmumu par potenciālo bīstamību un/vai risku, un/vai nepieciešamību veikt turpmāku konkrētu un līdz ar to minimālu testēšanu.

***II-SLR-LA*:** validācijas ziņojumā un iepriekšējās publikācijās par testu *IL-8 Luc* lietota abreviatūra, ar ko apzīmē *Inh-GAPLA*. Definīciju sk. ierakstā par *Inh-GAPLA*.

IL-8 (interleikīns-8): no endotēlijšūnām, fibroblastiem, keratinocītiem, makrofāgiem un monocītiem iegūts citokīns, kas izraisa neitrofilu un T šūnu limfocītu hemotaksi.

***IL8LA*:** luciferāzes aktivitāte, kas raksturīga *Stable Luciferase Orange (SLO)* (λ maks. = 580 nm), ko regulē IL-8 promoters.

***Ind-IL8LA*:** *IL8LA* inducēšanās pakāpe. To iegūst, ar ķīmikālijām apstrādāto THP-G8 šūnu *nIL8LA* dalot ar nestimulēto THP-G8 šūnu *nIL8LA*, un šī vērtība izsaka, kādā mērā ķīmikālijas inducē promotera IL-8 aktivitāti.

Inh-GAPLA: *GAPLA* inhibēšanās. To iegūst, ar ķīmikālijām apstrādāto THP-G8 šūnu *GAPLA* dalot ar neapstrādāto THP-G8 šūnu *GAPLA*, un šī vērtība izsaka ķīmikāliju citotoksiskumu.

Minimālais inducēšanas sliekšnis (MIS): zemākā koncentrācija, pie kuras ķīmikālija atbilst pozitīvuma kritērijiem.

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām.

Vienkomponenta viela: tāda viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā viena galvenā sastāvdaļa veido vismaz 80 % (masa/masa).

Daudzkomponentu viela: tāda viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā $\geq 10\%$ (masa/masa) un $< 80\%$ (masa/masa). Daudzkomponentu vielas tiek iegūtas ražošanas procesā. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu vielas rodas ķīmiskās reakcijās.

nIL8LA: *SLO* luciferāzes aktivitāte, kas atspoguļo promotera *IL-8* aktivitāti (*IL8LA*), normalizēta ar *SLR* luciferāzes aktivitāti, kas atspoguļo promotera *GAPDH* aktivitāti (*GAPLA*). Tā izsaka promotera *IL-8* aktivitāti pēc šūnu dzīvotspējas vai šūnu skaita.

nSLO-LA: validācijas ziņojumā un iepriekšējās publikācijās par testu *IL-8 Luc* lietota abreviātūra, ar ko apzīmē *nIL8LA*. Definīciju sk. ierakstā par *nIL8LA*.

Pozitīvā kontrole: replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar vielu, par ko ir zināms, ka tā inducē pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespējams novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlieku liela.

Prehaptēni: ķīmikālijas, kas par sensibilizatoriem kļūst abiotiskas transformācijas procesā.

Prohaptēni: ķīmikālijas, kuru ādas sensibilizācijas potenciālu atraisa fermentatīva aktivācija.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testa pareizības (konkordantuma) aspektu (16).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē, izmantojot vienu un to pašu protokolu, testu vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās ilgākā laika nogrieznī var veikt reproducējami. To novērtē, aprēķinot metodes intralaboratorisko un interlaboratorisko reproducējamību un intralaboratorisko atkārtojamību (16).

Izpildes reize: reize, kurā vienu vai vairākas ķīmikālijas testē paralēli ar šķīdinātāja/nesēja kontroli un pozitīvo kontroli.

Jutība: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām/aktīvajām ķīmikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir tāda testa pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testa relevantuma izvērtēšanā (16).

SLO-LA: validācijas ziņojumā un iepriekšējās publikācijās par testu *IL-8 Luc* lietota abreviatūra, ar ko apzīmē *IL8LA*. Definīciju sk. ierakstā par *IL8LA*.

SLR-LA: validācijas ziņojumā un iepriekšējās publikācijās par testu *IL-8 Luc* lietota abreviatūra, ar ko apzīmē *GAPLA*. Definīciju sk. ierakstā par *GAPLA*.

Šķīdinātāja/nesēja kontrole: neapstrādāts paraugs, kurā ir visi testa sistēmas komponenti, izņemot testējamo ķīmikāliju, bet ieskaitot izmantoto šķīdinātāju/nesēju. To izmanto, lai noteiktu bāzlinijas atbildreakciju paraugiem, kas apstrādāti ar attiecīgajā šķīdinātājā/nesējā izšķīdinātu vai stabili disperģētu testējamo ķīmikāliju. Ja testā izmanto arī paralēlu barotnes kontroli, šis paraugs parāda arī to, vai šķīdinātājs/nesējs mijiedarbojas ar testa sistēmu.

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām ķīmikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir tāda testa pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testa relevantuma izvērtēšanā (16).

Viela: ķīmiskais elements un tā dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, ieskaitot to stabilizācijai vajadzīgās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un neizmainot tās sastāvu.

Virsmaktīvs aģents: viela, piem., deterģents, kas var samazināt šķidrums virsmas spraigumu un tādējādi ļauj tam putot vai penetrēt cietvielās; to dēvē arī par mitrinātāju. (TG437)

Testējamā ķīmikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo metodi.

THP-G8: testā *IL-8 Luc* izmantota IL-8 reportieršūnu līnija. Cilvēka makrofāgiskā šūnu līnija THP-1, kura transficēta ar luciferāzes *SLO* un *SLR* gēniem attiecīgi promoteru IL-8 un *GAPDH* kontrolē.

Apvienoto Nāciju Organizācijas Ķīmikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma (ANO GHS): sistēma, kurā ķīmikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un kura paredz atbilstošus saziņas elementus, piem., piktogrammas, signālvārdus, bīstamības apzīmējumus, drošības prasību apzīmējumus un drošības datu lapas, ar mērķi sniegt informāciju par ķīmikāliju nelabvēlīgo ietekmi, lai aizsargātu cilvēkus (tostarp darba devējus, darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (21).

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kuras ir kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

Derīga testēšanas metode: tests, kas tiek uzskatīts par pietiekami relevantu un ticamu konkrētam nolūkam un ir balstīts uz zinātniski pareiziem principiem. Tests nekad nav derīgs absolūtā izteiksmē; tas vienmēr ir derīgs tikai kādam konkrētam nolūkam.

3.2. papildinājums

LUCIFERĀZES AKTIVITĀTES MĒRĪŠANAS PRINCIPS UN OPTISKO FILTRU PĀRVADES KOEFICIENTU NOTEIKŠANA *SLO* UN *SLR*

Daudzreportieru testa sistēmu *Tripluc* var izmantot ar mikroplates tipa luminometru, kam ir daudzu krāsu detektēšanas sistēma un ko var aprīkot ar optisko filtru (piem., *Phelios AB-2350 (ATTO)*, *ARVO (PerkinElmer)*, *Tristar LB941 (Berthold)*). Par optisko filtru mērīšanā izmanto 600–620 nm garviļņu vai īsviļņu caurlaides filtru vai 600–700 nm frekvenču joslas filtru.

Divu krāsu luciferāzu mērīšana ar optisko filtru

Šis ir piemērs, kurā izmantots *Phelios AB-2350 (ATTO)*. Šis luminometrs ir aprīkots ar 600 nm garviļņu caurlaides filtru (*R60 HOYA Co.*), 600 nm GCF, 1. filtrs) *SLO* ($\lambda_{maks.} = 580$ nm) un *SLR* ($\lambda_{maks.} = 630$ nm) luminiscences nošķiršanai.

Lai noteiktu 600 nm GCF pārvades koeficientus, vispirms, izmantojot attīrītus luciferāzes *SLO* un *SLR* fermentus, i) izmēra *SLO* un *SLR* bioluminiscences intensitāti bez filtra (F0), ii) izmēra *SLO* un *SLR* bioluminiscences intensitāti caur 600 nm GCF (1. filtrs) un iii) aprēķina tālāk norādītos 600 nm GCF pārvades koeficientus attiecībā uz *SLO* un *SLR*.

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

Ja testa parauga *SLO* un *SLR* intensitāte ir attiecīgi O un R, tad i) gaismas intensitāte bez filtra (pilnīgi optiska) (F0) un ii) caur 600 nm GCF (1. filtru) pārvadītas gaismas intensitāte (F1) ir tāda, kā redzams šajās formulās.

$$F0=O+R$$

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

Šīs formulas var izteikt arī šādi:

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

Tad, izmantojot aprēķinātos pārvades koeficientus (κO_{R60} and κR_{R60}) un izmērīto F0 un F1, O un R vērtību var aprēķināt šādi:

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

Pārvades koeficientu noteikšanas materiāli un metodes

1) Reaģenti

Atsevišķi attīrīti luciferāzes fermenti:

lioofilizēts attīrīts *SLO* ferments

lioofilizēts attīrīts *SLR* ferments

(kas validācijas darba vajadzībām iegūti no *GPC Lab. Co. Ltd.*, Totori, Japāna, kopā ar šūnu līniju THP-G8)

Testa reaģents:

Testa reaģents *Tripluc*® *Luciferase* (piem., no *TOYOBO Cat#MRA-301*)

Barotne: luciferāzes testam (30 ml, turēta 2–8 °C)

Reaģents	Koncentrācija	Galīgā koncentrācija barotnē	Vajadzīgais daudzums
RPMI-1640	—	—	27 ml
<i>FBS</i>	—	10 %	3 ml

2) Fermenta šķīduma sagatavošana

Liofilizētu attīrītu luciferāzes fermentu izšķīdina stobriņā, tam pievienojot 200 µl 10 ~ 100 mM Tris/HCl vai Hepes/HCl (pH 7,5 ~ 8,0), kas papildināts ar 10 % (masa/tilp.) glicerīna, fermenta šķīdumu sadala 10 µl alikvotās vienreizlietojamās 1,5 ml stobriņos un -80 °C tur saldētavā. Sasaldēto fermenta šķīdumu pēc tam var izmantot 6 mēnešus. Kad šķīdumu izmanto, katram fermenta šķīduma (atšķaidīta fermenta šķīduma) stobriņam pievieno 1 ml luciferāzes testa barotnes (RPMI-1640 ar 10 % *FBS*) un to tur uz ledu, lai nenotiktu dezaktivācija.

3) Bioluminiscences mērīšana

Testa reaģentu *Tripluc*® *Luciferase* (*Tripluc*) atkausē un tur istabas temperatūrā vai nu ūdens vannā, vai apkārtējās vides temperatūrā. Luminometru ieslēdz 30 min pirms mērījumu sākšanas, lai fotoelektronpavairotājlampa nostabilizētos. 100 µl atšķaidīta fermenta šķīduma pārnes uz melnu 96 iedobju plati (plakandibena) (*SLO* referencparaugu uz #B1, #B2, #B3, *SLR* referencparaugu uz #D1, #D2, #D3). Tad 100 µl iepriekš sasildīta *Tripluc* ar automātisko pipeti pārnes uz katru plates iedobi, kurā ir atšķaidītais fermenta šķīdums. Ar plates kratītāju plati 10 min krata istabas

temperatūrā (apm. 25 °C). Iedobēs šķīdumā likvidē burbuļus, ja tādi parādās. Lai izmērītu luciferāzes aktivitāti, plati ieliek luminometrā. Bioluminiscenci mēra gan bez optiskā filtra (F0), gan ar to (F1), katreiz 3 s.

Optiskā filtra pārvades koeficientu aprēķina šādi:

pārvades koeficients (SLO (κ_{OR60})) = (#B1 ar F1 + #B2 ar F1 + #B3 ar F1) / (#B1 ar F0 + #B2 ar F0 + #B3 ar F0)

pārvades koeficients (SLR (κ_{R60})) = (#D1 ar F1 + #D2 ar F1 + #D3 ar F1) / (#D1 ar F0 + #D2 ar F0 + #D3 ar F0)

Aprēķinātos pārvades koeficientus izmanto visiem mērījumiem, ko veic ar to pašu luminometru.

Aprīkojuma kvalitātes kontrole

Jāizmanto *IL-8 Luc* protokolā aprakstītā procedūras (18).

3.3. papildinājums

STANDARTVIELAS

Pirms šajā testēšanas metodes B.71 papildinājumā aprakstītā testa regulāras izmantošanas laboratorijām jāapliecina sava tehniskā kompetence, iegūstot paredzamo testa *IL-8 Luc* prognozi attiecībā uz 1. tabulā ieteiktajām 10 vielām un attiecībā uz vismaz 8 no 10 standartvielām iegūstot vērtības, kuras ietilpst attiecīgajā references diapazonā. Citi atlases kritēriji bija vielu komerciālā pieejamība un kvalitatīvu ar testu *IL-8 Luc* iegūtu *in vivo* references datu, kā arī kvalitatīvu ar testu *IL-8 Luc* iegūtu *in vitro* datu pieejamība. Par testu *IL-8 Luc* ir pieejami arī publicēti references dati (6) (1).

1. tabula. Vielas, kuras ieteicams izmantot, lai pierādītu tehnisko kompetenci izmantot testu *IL-8 Luc*

Standartvielas	CAS Nr.	Agregātvienības	Šķīdība X- VIVO™ 15 koncentrācijā 20 mg/ml	<i>In vivo</i> prognoze ¹	<i>IL-8 Luc</i> prognoze ²	References diapazons (µg/ml) ³	
						CV ₀₅ ⁴	<i>IL-8 Luc</i> MIS ⁵
2,4-dinitrohlorbenzols	97-00-7	ciets	nešķīst	sensibilizators (ļoti spēcīgs)	pozitīva	2,3–3,9	0,5–2,3
formaldehīds	50-00-0	šķidr	šķīst	sensibilizators (spēcīgs)	pozitīva	9–30	4–9
2-merkaptobenzotiazols	149-30-4	ciets	nešķīst	sensibilizators (vidējs)	pozitīva	250–290	60–250
etilēndiamīns	107-15-3	šķidr	šķīst	sensibilizators (vidējs)	pozitīva	500–700	0,1–0,4
etilēnglikola dimetakrilāts	97-90-5	šķidr	nešķīst	sensibilizators (vājš)	pozitīva	> 2000	0,04–0,1
4-alilanzols (estragols)	140-67-0	šķidr	nešķīst	sensibilizators (vājš)	pozitīva	> 2000	0,01–0,07
streptomicīna sulfāts	3810-74-0	ciets	šķīst	nav sensibilizators	negatīva	> 2000	> 2000
glicerīns	56-81-5	šķidr	šķīst	nav sensibilizators	negatīva	> 2000	> 2000
izopropanols	67-63-0	šķidr	šķīst	nav sensibilizators	negatīva	> 2000	> 2000

Saīsinājumi: CAS Nr. — *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs

¹ *In vivo* potence ir noteikta, izmantojot *ECETOC* ierosinātos kritērijus (19).

² Balstoties uz vēsturiski novērotajām vērtībām (1) (6).

³ CV₀₅ un *IL-8 Luc* MIS aprēķinātas ar *EPI Suite™* doto šķīdību ūdenī.

⁴ CV₀₅: minimālā koncentrācija, pie kuras ķimikāliju *Inh-GAPLA* vērtība ir mazāka par 0,05.

⁵ MIS: zemākā koncentrācija, pie kuras ķimikālija atbilst pozitīvuma kritērijiem.

3.4. papildinājums

INDEKSI UN SLĒDZIENU KRITĒRIJI

nIL8LA (nSLO-LA)

i-tās koncentrācijas ($i = 0-11$) j-to atkārtojumu ($j = 1-4$) mēra attiecīgi *IL8LA (SLO-LA)* un *GAPLA (SLR-LA)*. Normalizētā *IL8LA*, ko dēvē par *nIL8LA (nSLO-LA)*, ir definēta šādi:

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

Tā ir šā testa pamatmērvienība.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Atkārtojuma vidējo *nIL8LA (nSLO-LA)* palielinājuma pakāpe pie i-tās koncentrācijas salīdzinājumā ar 0-to koncentrāciju, *Ind-IL8LA*, ir šā testa pamatmērs. Šo attiecību izsaka ar šādu formulu:

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

Vadošā laboratorija ierosinājusi uzskatīt, ka pozitīvam testējamās ķimikālijas rezultātam atbilst vērtība 1,4. Šīs vērtības pamatā ir vadošās laboratorijas vēsturisko datu izpēte. Datu pārvaldības grupa šo vērtību izmantojusi visos validācijas pētījuma posmos. Primārais iznākums, *Ind-IL8LA*, ir divu aritmētisko vidējo attiecība, kā redzams vienādojumā.

95 % ticamības intervāls (95 % TI)

Balstoties uz šo attiecību, var aplēst 95 % ticamības intervālu (95 % TI), kas parāda, cik precīzs ir šis primārā iznākuma mērs. 95 % TI apakšējā robeža ≥ 1 liecina, ka *nIL8LA* pie i-tās koncentrācijas ir ievērojami lielāka nekā šķīdinātāja kontroles gadījumā. 95 % TI var iegūt vairākos veidos. Šajā pētījumā šādam nolūkam izmantota Fīlera [Fieller] teorēma. Pēc šīs teorēmas 95 % ticamības intervālu iegūst saskaņā ar šādu formulu:

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

kur:

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

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

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

$t_{0.975(v)}$ ir centrālā t sadalījuma 97,5. procentile ar brīvības pakāpes v , kur

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

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Inh-GAPLA ir i-tās koncentrācijas atkārtojuma vidējtās *GAPLA* (*SLR-LA*) attiecība pret attiecīgo šķīdinātāja kontroles vērtību, un to izsaka

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

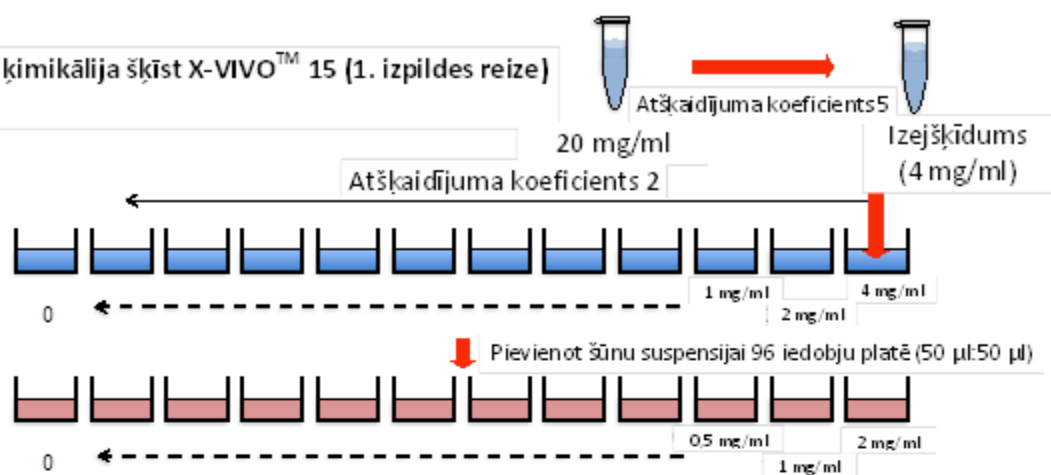
Tā kā *GAPLA* ir *nIL8LA* saucējs, ļoti maza vērtība izraisa lielas *nIL8LA* variācijas. Tāpēc var uzskatīt, ka, ja *Inh-GAPLA* vērtība ir ļoti maza (mazāka par 0,05), *Ind-IL8LA* vērtības ir neprecīzas.

3.5. papildinājums

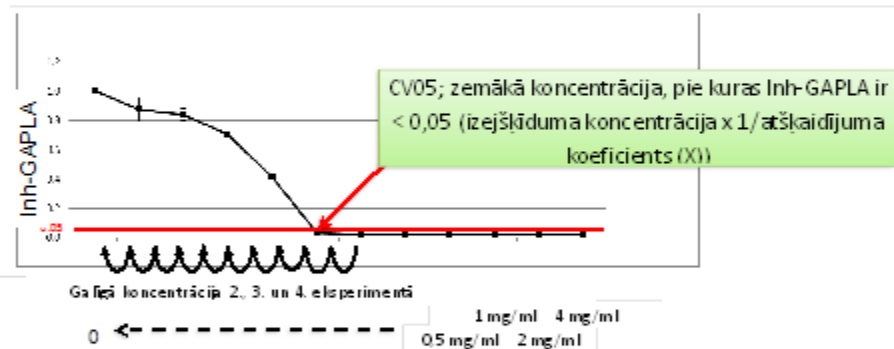
METODES, KĀ IZŠĶĪDINĀT ĶĪMIKĀLIJAS TESTA *IL-8 LUC* VAJADZĪBĀM: SHĒMA

- a) Ķīmikālijas, kas *X-VIVOTM* 15 šķīst koncentrācijā 20 mg/ml

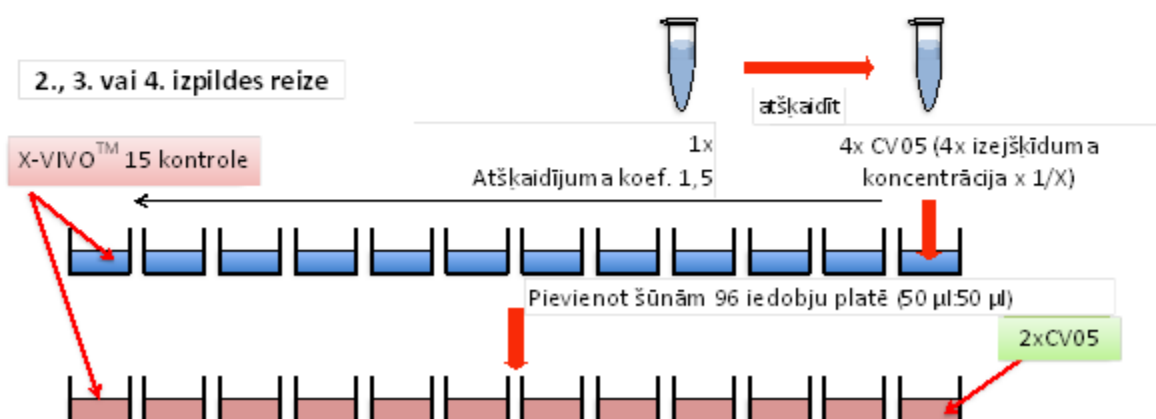
Ja ķīmikālija šķīst X-VIVO™ 15 (1. izpildes reize)



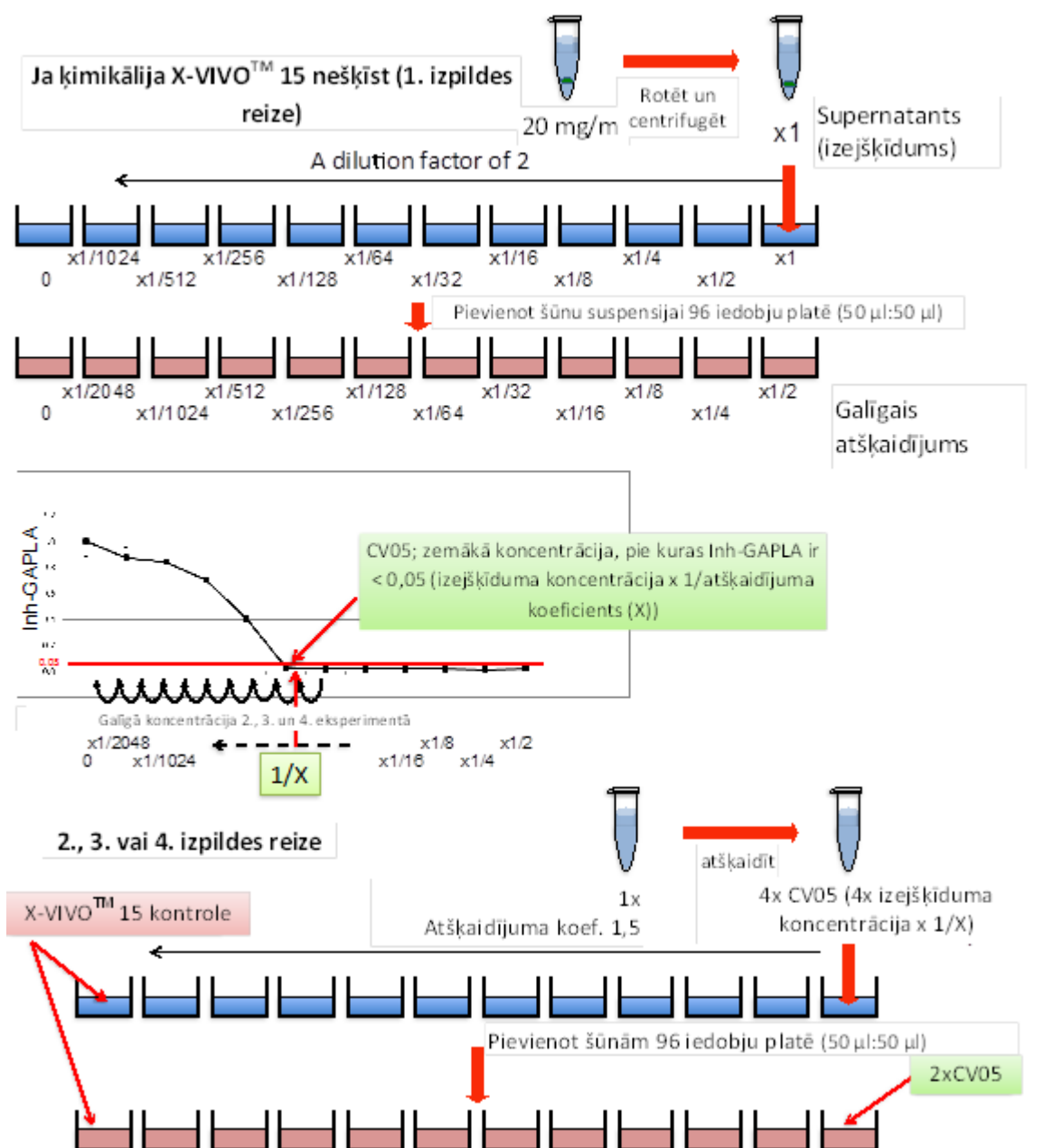
Noteikt augstāko koncentrāciju šādos eksperimentos



2., 3. vai 4. izpildes reize

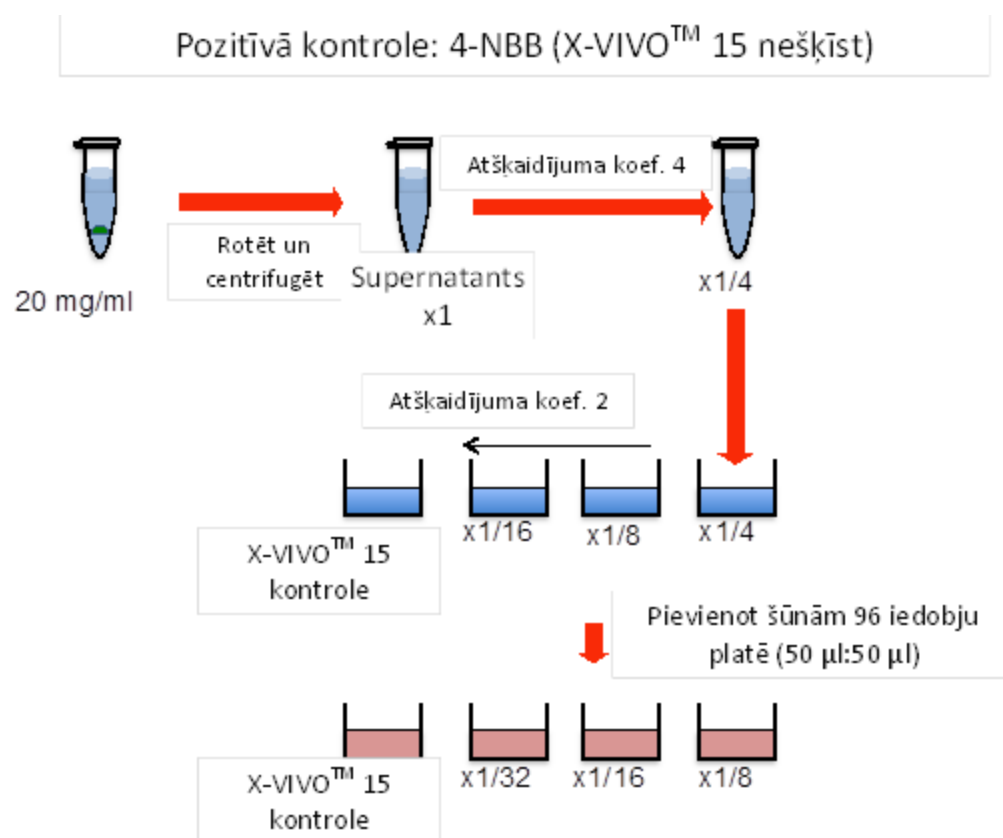


b) Ķīmikālijas, kas *X-VIVO*TM 15 koncentrācijā 20 mg/ml nešķīst



3.6. papildinājums

METODE, KĀ IZŠĶĪDINĀT 4-NBB IZMANTOŠANAI PAR POZITĪVO KONTROLI TESTA *IL-8 LUC* VAJADZĪBĀM: SHĒMA



”

9) C daļai pievieno šādas nodaļas:

“C.52. PAPLAŠINĀTAIS VIENAS MEDAKU PAAUDZES REPRODUKCIJAS TESTS (MEOGRT)

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (TG) Nr. 240 (2015). Paplašinātais vienas medaku paaudzes reprodukcijas tests (MEOGRT) ir visaptveroša testa metode, kurā, izmantojot vairākās paaudzēs eksponētas zivis, iegūst datus, kas relevanti ķīmikāliju (arī domājamu endokrīni disruptīvu ķīmikāliju, EDK) ekoloģiskās bīstamības un radīto risku novērtēšanai. Testā MEOGRT ekspozīciju turpina līdz izšķilšanās brīdim (līdz divām nedēļām pēc apaugļošanas, npa) otrajā (F2) paaudzē. Lai pamatotu lietderību paaudzi F2 turpināt pēc izšķilšanās, būtu vajadzīga papildu izpēte; pašlaik nav pietiekamas informācijas, kas ļautu noteikt relevantus nosacījumus vai kritērijus, kuri dotu pamatu paaudzes F2 turpināšanai. Tomēr, ņemot vērā jaunu informāciju un datus, šī testēšanas metode var tikt atjaunināta. Noteiktos apstākļos (piem., ja ķīmikālijai ir liels biokoncentrēšanās potenciāls vai indikācijas par pārpaudzisku ietekmi citos taksonos), potenciāli varētu noderēt norādījumi par paaudzes F2 turpināšanu. Ar šo testēšanas metodi var izvērtēt ķīmikāliju (arī potenciālu endokrīni disruptīvu ķīmikāliju) potenciālo hronisko ietekmi uz zivīm. Metodē galvenais uzsvars likts uz potenciālo ietekmi populācijas līmenī (proti, nelabvēlīga ietekme uz izdzīvotību, attīstību, pieaugumu un reprodukciju), kas dod iespēju aprēķināt nenovērojamas ietekmes koncentrāciju (NOEC) vai efektīvo koncentrāciju (ECx); tomēr jāatzīmē, ka ECx pieejas reti ir piemērotas lieliem šāda veida pētījumiem, jo testējamo koncentrāciju skaitu palielināt tik lielā mērā, lai varētu noteikt vajadzīgo ECx, var būt nepraktiski, turklāt lielā izmantoto dzīvnieku skaita dēļ tas var radīt ievērojamas bažas no dzīvnieku labklājības viedokļa. Ja ķīmikālija nav jānovērtē vairākās paaudzēs vai nav potenciāla endokrīni disruptīva ķīmikālija, piemērotākas var būt citas testēšanas metodes (1). Piemērotākā suga šai testēšanas metodei ir Japānas medaka, jo tai ir īss dzīves cikls un var noteikt ģenētisko dzimumu (2), kas šajā metodē ir izšķirīgi svarīgi. Šajā metodē aprakstītās konkrētās metodes un novērojamie beigupunkti attiecas tikai uz Japānas medaku. Citas mazu sugu zivis (piem., zebrzivis) var izmantot ar līdzīgu testēšanas protokolu.
2. Šī testēšanas metode mēra vairākus bioloģiskos beigupunktus. Galvenais uzsvars likts uz potenciālo nelabvēlīgo ietekmi uz populācijas līmeņa parametriem, tostarp izdzīvotību, vispārējo attīstību, pieaugumu un reprodukciju. Otrkārt, lai iegūtu informāciju par mehānismiem un gūtu sasaisti ar citu veidu lauka un laboratorijas pētījumu rezultātiem gadījumos, kad ir vēlāki pierādījumi par ķīmikālijas potenciālu būt endokrīni disruptīvai (piem., androgēniska vai estrogēniska darbība citos testos), noderīgu papildu informāciju

iegūst, mērot vitelogenīna (vtg) informatīvo RNS (iRNS) (vai vitelogenīna proteīnu, VTG), fenotipiskās sekundārās dzimum pazīmes (SDzP), kas saistītas ar ģenētisko dzimumu, un izvērtējot histopatoloģiju. Jāpiezīmē: ja nav aizdomu, ka testējamā ķīmikālīja vai tās metabolīti varētu būt EDK, mērīt šos sekundāros beigupunktus var nebūt vajadzīgs un piemērotāk varētu būt veikt pētījumu, kurš prasa mazāk resursu un kurā izmanto mazāk dzīvnieku (1). Šajā testēšanas metodē izmantotās definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

3. Tā kā testētas salīdzinoši nedaudzas ķīmikālījas un šā visai sarežģītā testa validēšanā iesaistījušās salīdzinoši nedaudzas laboratorijas, ir gaidāms, ka tad, kad būs pieejami pietiekami daudzi pētījumi, lai varētu novērtēt šā jaunā pētījuma plāna ietekmi, testēšanas metode tiks pārskatīta un vajadzības gadījumā grozīta, ņemot vērā gūto pieredzi. Datus var izmantot ESAO endokrīno disruptoru testēšanas un novērtēšanas konceptuālā satvara 5. līmenī (3). Testēšanas metodes sākumā pieaugušas zivis (paaudze F0) reproduktīvajā fāzē tiek eksponētas testējamajai ķīmikālījai. Ekspozīcija turpinās paaudzes F1 attīstības un reprodukcijas, kā arī paaudzes F2 izšķilšanās laikā; tādējādi ar testu var izvērtēt gan strukturālos, gan aktivacionālos endokrīnos ceļus. Interpretējot endokrīnos beigupunktus, var izvēlēties pierādījumu svāra pieeju.
4. Testā jāizmanto tik daudzi īpatņi, lai testa jauda būtu pietiekama reproduktīvi relevanto beigupunktu izvērtēšanai (sk. 3. papildinājumu), tomēr dzīvnieku labklājības nolūkā vienlaikus jā rūpējas, lai tiktu izmantots minimālais vajadzīgais dzīvnieku skaits. Ņemot vērā, cik daudzi testa dzīvnieki vajadzīgi, ir rūpīgi jāapdomā, vai tests patiešām ir vajadzīgs, proti, vai relevantu informāciju par daudziem *MEOGRT* beigupunktiem jau nesatur esošie dati. Šajā ziņā var palīdzēt ESAO zivju toksicitātes testēšanas satvars (1).
5. Testēšanas metodes pamatmērķis ir noskaidrot vienas vielas ietekmi. Ja rodas vajadzība testēt maisījumu, ir jāapsver, vai ar to var iegūt paredzētajam regulatīvajam nolūkam pieņemamus rezultātus.
6. Ir svarīgi, lai pirms testa sākšanas būtu pieejama informācija par testējamās ķīmikālījas fizikālķīmiskajām īpašībām, īpaši tālab, lai varētu iegūt stabilus ķīmikālījas šķīdumus. Svarīgi ir arī tas, lai būtu pieejama pietiekami jutīga analītiskā metode testējamās ķīmikālījas koncentrāciju verificēšanai.

TESTA PRINCIPS

7. Testa sākumā dzimumgatavus tēviņus un mātītes (vismaz 12 npa) vaislas pāros 3 nedēļas eksponē testējamajai ķīmikālījai, kura šajā laikā atbilstoši savai toksikokinētiskajai uzvedībai izplatās vecākpaaudzes (F0) organismā. Pēc iespējas tuvāk ceturtās nedēļas

pirmajai dienai savāc ikrus paaudzes F1 sākšanai. Paaudzes F1 audzēšanas laikā (15 nedēļas) novērtē šķilstību [izšķilšanās rādītājs] un izdzīvotību. Turklāt izlases veidā 9–10 npa pārbauda zivju ontoģenētiskos beigupunktus un 12.–14. npa trīs nedēļas novērtē nārstošanu. Kad apritējusi trešā reproduktīvās novērtēšanas nedēļas, sāk paaudzi F2, ko audzē līdz izšķilšanās beigām.

TESTA DERĪGUMA KRITĒRIJI

8. Piemērojami šādi testa derīguma kritēriji:

- izšķīdušā skābekļa koncentrācijai visā testa laikā jābūt ≥ 60 % no gaisa piesātinājuma vērtības;
- vidējai ūdens temperatūrai visā pētījuma gaitā jābūt diapazonā no 24 līdz 26 °C. Atsevišķu akvāriju īslaicīgas novirzes no šīs vidējās vērtības nedrīkst pārsniegt 2 °C;
- kontroļu vidējai fekunditātei abās paaudzēs (F0 un F1) jābūt lielākai nekā 20 ikri uz pāri dienā. Visu novērtēšanas laikā producēto ikrus fertilitātei jāpārsniedz 80 %. Turklāt 16 no rekomendētajiem 24 kontroles vaislas pāriem (> 65 %) vajadzētu producēt vairāk nekā 20 ikrus uz pāri dienā;
- kontrolēs ikrus šķilstībai jābūt ≥ 80 % (vidēji) (gan paaudzē F1, gan F2);
- izdzīvotībai pēc izšķilšanās līdz 3 npa un no 3. npa līdz paaudzes F1 nonāvēšanai (t. i., 15. npa) kontrolēs (F1) jābūt attiecīgi ≥ 80 % (vidēji) un ≥ 90 % (vidēji);
- jābūt pieejamām liecībām, ka testējamās ķīmikālijas koncentrācija šķīdumā ir apmierinoši uzturēta ± 20 % diapazonā ap vidējām izmērītajām vērtībām.

Lai gan ūdens temperatūra nav derīguma kritērijs, apstrādātie replikāti nedrīkstētu būt statistiski atšķirīgi, un arī apstrādātās testa grupas nedrīkstētu statistiski viena no otras atšķirties (ik dienas veiktu temperatūras mērījumu ziņā un neskaitot īslaicīgas novirzes).

9. Lai gan vairāk eksponētajās grupās var būt novērojami samazināti vairošanās rādītāji, reprodukcijai vismaz trešās lielākās ekspozīcijas grupā un visās mazākas ekspozīcijas F0 grupās jābūt pietiekamai, lai piepildītu šķilšanās inkubatorus. Turklāt paaudzes F1 trešās lielākās ekspozīcijas grupā un mazākas ekspozīcijas grupās embriju izdzīvotībai jābūt pietiekamai, lai būtu iespējams izvērtēt beigupunktus gandrīz pieaugušu īpatņu paraugojumā (sk. 36. un 38. punktu un 9. papildinājumu). Turklāt paaudzes F1 otrās augstākās ekspozīcijas grupā jābūt vismaz minimālai izdzīvotībai pēc izšķilšanās (~ 20 %). Tie nav gluži derīguma kritēriji, bet rekomendācijas, kuru ievērošana ļaus aprēķināt robustas *NOEC* vērtības.

10. Ja novērojamas novirzes no testa derīguma kritērijiem, sekas jāaplūko kopsakarā ar testa rezultātu ticamību un šīs novirzes un apsvērumi jāatspoguļo testēšanas pārskatā.

METODES APRAKSTS

Aprīkojums

11. Parastais laboratorijas aprīkojums, jo īpaši:

- a) skābekļa un pH mērinstrumenti;
- b) aprīkojums ūdens cietības un sārmainības noteikšanai;
- c) attiecīgs aprīkojums temperatūras regulēšanai un, vēlams, nepārtrauktam monitoringam;
- d) ķīmiski inerta materiāla tvertnes ar piemērotu ietilpību attiecībā uz ieteicamo noslogojumu un piepildītību (sk. 3. papildinājumu);
- e) pietiekami precīzi svari (t. i., ar precizitāti $\pm 0,5$ mg).

Ūdens

12. Par testa ūdeni var izmantot jebkādu ūdeni, kurā testa sugu dzīvnieki uzrāda pietiekamu ilgtermiņa izdzīvotību un pieaugumu. Tā kvalitātei testa laikā jābūt nemainīgai. Lai nodrošinātu, ka atšķaidīšanai izmantotais ūdens nerada nepienācīgu ietekmi uz testa rezultātu (piem., testējamās ķīmikālijas kompleksēšanās ceļā) vai nelabvēlīgi neietekmē vaislas zivju rādītājus, noteiktos starplaikos jāņem paraugi analīzei. Ja zināms, ka atšķaidīšanai izmantotā ūdens kvalitāte ir relatīvi nemainīga, tad, piem., reizi sešos mēnešos jāveic smago metālu (piem., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), biežāk sastopamo anjonu un katjonu (piem., Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), pesticīdu, kopējā organiskā oglekļa un suspendēto cietvielu mērījumi. Dažas pieņemama atšķaidīšanas ūdens ķīmiskās īpašības ir norādītas 2. papildinājumā. Ūdens pH jābūt diapazonā no 6,5 līdz 8,5, bet konkrētā testā tam jābūt $\pm 0,5$ pH vienību diapazonā.

Ekspozīcijas sistēma

13. Tas, kādai jābūt ekspozīcijas sistēmas uzbūvei un materiāliem, nav noteikts. Veidojot testa sistēmu, jāizmanto stikls, nerūsošais tērauds vai cits ķīmiski inerts materiāls, kas nav kontaminēts citos testos. Šā testa vajadzībām labi piemērota ekspozīcijas sistēma var būt pastāvīgas caurplūdes sistēma (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13).

Testa šķīdumi

14. Testējamās ķīmikālijas izejšķīdumu ekspozīcijas sistēmā ievada ar piemērotu sūkni. Pirms ekspozīcijas sākšanas izejšķīduma caurplūdumu kalibrē pēc testa šķīduma analītiskajiem rādītājiem un testa gaitā to periodiski pārbauda volumetriski. Atkarībā no testējamās ķīmikālijas stabilitātes un ūdens kvalitātes testa šķīdumu katrā kamerā pienācīgi atjaunina

(piem., no vismaz 5 tilpumatjaunināšanās dienā līdz 16 tilpumatjaunināšanās dienā vai līdz 20 ml/min caurplūdumam).

15. Izraudzīto koncentrāciju testa šķīdumus sagatavo, atšķaidot izejšķīdumu. Izejšķīdumu vēlamā sagatavot, testējamo ķīmikāliju atšķaidīšanas ūdenī vienkārši iemaisot vai tajā iejaucot ar mehāniskiem līdzekļiem (piem., samaisot un/vai apstrādājot ar ultraskaņu). Piemērotas koncentrācijas izejšķīduma iegūšanai var izmantot piesātināšanas kolonnas/sistēmas vai pasīvas dozēšanas metodes (14). Katrā ziņā jācenšas izvairīties no šķīdinātāju vai nesēju izmantošanas, jo: 1) daži šķīdinātāji paši var izraisīt toksicitāti un/vai nevēlamu vai negaidītu atbildreakciju, 2) ja testējamās ķīmikālijas koncentrācija pārsniedz tās šķīdību ūdenī (kā nereti gadās, ja izmanto šķīdinātājus), noteiktās efektīvās koncentrācijas var būt nepareizas, 3) šķīdinātāju izmantošana ilgākos testos var radīt ievērojamu bioplēvi, kas saistāma ar mikroorganismu aktivitāti, un tā var ietekmēt vides apstākļus, kā arī spēju uzturēt ekspozīcijas koncentrācijas, un, 4) ja nav vēsturisko datu, kas pierāda, ka šķīdinātājs pētījuma iznākumu neietekmē, šķīdinātājus var izmantot tikai ar šķīdinātāja kontroli, savukārt tas ir pretrunā dzīvnieku labklājības principiem, jo testa veikšanai tad vajadzīgi papildu dzīvnieki. Šķīdinātāju izmanto kā galēju līdzekli sarežģīti testējamu ķīmikāliju gadījumā, un piemērotāko metodi izvēlas, izmantojot ESAO norādījumu dokumentu Nr. 23 par sarežģīti testējamu vielu un maisījumu ūdenstoksiskuma testēšanu (15). Šķīdinātāja izvēli nosaka testējamās ķīmikālijas ķīmiskās īpašības un pieejamie vēsturiskie dati par šķīdinātāja izmantošanu. Ja izmanto par nesēju izmanto šķīdinātāju, jāizvērtē iespēja līdzās bezšķīdinātāja (negatīvajām) kontrolēm (tikai atšķaidīšanas ūdens) izmantot pienācīgas šķīdinātāja kontroles. Ja no šķīdinātāja izmantošanas nevar izvairīties un novērojama mikrobiāla aktivitāte (bioplēves veidošanās), ieteicams visā testa laikā reģistrēt / pārskatīt norādīt bioplēves apmēru katrā tvertnē (vismaz reizi nedēļā). Ideālā gadījumā šķīdinātāja koncentrācija šķīdinātāja kontrolē un visās apstrādātajās grupās būtu jāuztur nemainīga. Ja šķīdinātāja koncentrāciju neuztur nemainīgu, šķīdinātāja kontrolē jāizmanto augstākā šķīdinātāja koncentrācija, ko izmanto apstrādē. Gadījumos, kad par nesēju izmanto šķīdinātāju, maksimālajai šķīdinātāja koncentrācijai nevajadzētu pārsniegt 100 µl/l vai 100 mg/l (15), un ir ieteicams šķīdinātāja koncentrāciju saglabāt pēc iespējas mazu (piem., < 20 µl/l), lai novērstu iespējamu šķīdinātāja ietekmi uz mērītajiem beigupunktiem (16).

Testa dzīvnieki

Zivju izvēle un turēšana

16. Testa suga ir Japānas medaka (*Oryzias latipes*), jo tai ir īss dzīves cikls un nosakāms ģenētiskais dzimums. Lai gan ar līdzīgu testēšanas protokolu var izmantot citu mazu zivju sugu pārstāvjus, šajā testēšanas metodē aprakstītās konkrētās metodes un novērojamie beigupunkti attiecas tikai uz Japānas medaku (sk. 1. punktu). Ir viegli panākt medakas

vairošanos nebrīvē; ir publicētas tās kultivēšanas metodes (17) (18) (19), un ir pieejami dati no īstermiņa letalitātes, agrīno dzīves cikla stadiju un pilna dzīves cikla testiem (5) (6) (8) (9) (20). Visas zivis pakļauj 16 stundu fotoperiodam (8 tumsas stundas). Zivis baro ar dzīviem sālūdens vēžveidīgo *Artemia* spp. nauplijiem, vajadzības gadījumā papildus dodot komerciāli pieejamas barības pārslas. Ar analīzēm regulāri pārliecinās, ka komerciāli pieejamajās barības pārslās nav kontaminantu.

17. Ja vien tiek ievērota pienācīga audzēšanas prakse, īpašs kultivēšanas protokols nav vajadzīgs. Piemēram, līdz 4. npa medakas var audzēt 2 l tvertnēs, kurās tur 240 zivju kāpurus uz tvertni, pēc tam līdz 8. npa 2 l tvertnēs, kurās tur 10 zivis uz tvertni, un beigās tās tur vaislas pāros 2 l tvertnēs.

Zivju aklimatizācija un atlase

18. Testa zivis jāatlasa no viena laboratorijas krājuma, kas vismaz divas nedēļas pirms testa aklimatizējies tādos ūdens kvalitātes un apgaismojuma apstākļos, kas līdzinās testa apstākļiem (piezīme: šis aklimatizācijas periods nav *in situ* pirmsekspozīcijas periods). Ir ieteicams testa zivis kultivēt iekšēji, jo pieaugušu zivju transportēšana ir stressors, kas var kavēt paredzamu nārstošanu. Zivis visa turēšanas perioda laikā divreiz dienā baro ar sālūdens garneļu nauplijiem, un ekspozīcijas fāzē tām vajadzības gadījumā papildus dod komerciāli pieejamas barības pārslas. Uzskatāms, ka, lai nodrošinātu pietiekamu replikāciju, testa sākšanai vajadzīgi vismaz 42 vaislas pāri (ja vajadzīga šķīdinātāja kontrole, tad 54 vaislas pāri, daļēji tāpēc, ka nav vēsturisku datu, kas ļautu izmantot tikai šķīdinātāja kontroli). Turklāt, lai novērstu spontānu XX tēviņu iespējamu iekļaušanu, jāpārliecinās, ka katrs paaudzes F0 vaislas pāris ir XX un XY (proti, normāla dzimumhromosomu kombinācija gan mātītei, gan tēviņam) (sk. 39. punktu).
19. Aklimatizācijas fāzē jāreģistrē kultivēto zivju mirstība un pēc 48 h stabilizācijas perioda jāpiemēro šādi kritēriji:
 - ja mirstība kultivētajā populācijā septiņās dienās pirms pārneses uz testa sistēmu pārsniedz 10 %: partiju tālākai testēšanai neizmanto vispār;
 - ja mirstība populācijā septiņās dienās pirms pārneses uz testa sistēmu ir diapazonā no 5 % līdz 10 %: 2 nedēļu aklimatizācijas periodam pievieno vēl septiņas papildu dienas; ja nākamo septiņu dienu laikā mirstība pārsniedz 5 %, partiju tālākai testēšanai neizmanto vispār;
 - ja mirstība populācijā septiņās dienās pirms pārneses uz testa sistēmu nesasniedz 5 %: partiju pieņem.
20. Divu nedēļu aklimatizācijas periodā pirms testa zivīm nevajadzētu ārstēt slimības, un ekspozīcijas laikā no slimību ārstēšanas jāizvairās vispār, ja iespējams. Zivis ar klīniskām

slimības pazīmēm pētījumā neizmanto. Jāfiksē visi novērojumi un profilaktiska vai terapeitiska slimību ārstēšana kultivēšanas periodā pirms testa.

21. Ekspozīcijas fāzi sāk ar ģenētiski dzimumnošķirtām pieaugušām zivīm, kurām ir skaidri izteiktas dzimumatšķirības un kuras izraudzītas no reproduktīvi nobriedušiem laboratorijas dzīvniekiem, kas kultivēti 25 ± 2 °C. Ņem zivis, kas nedēļā pirms ekspozīcijas pierādījušas spēju vairoties (proti, radījušas dzīvotspējīgus pēcnācējus). Visā testā izmantoto zivju grupā katra dzimuma īpatņu masai testa sākumā jābūt diapazonā ± 20 % no attiecīgā dzimuma īpatņu vidējās aritmētiskās masas. Lai noteiktu vidējo masu, zivju apakšizlasi pirms testa nosver. Atlasītajām zivīm jābūt vismaz 12. npa, mātītēm ≥ 300 mg un tēviņiem ≥ 250 mg.

TESTA PLĀNS

Testējamās koncentrācijas

22. Ieteicams izmantot piecas ķīmikālijas koncentrācijas un vienu vai vairākas kontroles. Izvēloties testējamo koncentrāciju diapazonu, jāņem vērā visi informācijas avoti, tostarp struktūras un aktivitātes kvantitatīvās sakarības (*QSAR*), informācija par analogiem, zivju testu (piem., akūtās mirstības testu) rezultāti (šā pielikuma C.1. nodaļa), zivju īstermiņa reprodukcijas testu rezultāti (šā pielikuma C.48. nodaļa) un citu testēšanas metožu, piem., šā pielikuma C.15., C.37., C.41., C.47. vai C.49. nodaļā aprakstīto metožu (21) (22) (23) (24) (25) (26), rezultāti, ja tādi pieejami, vai, ja nepieciešams, rezultāti no diapazona noteikšanas testa, kurā var būt iekļauta arī reprodukcijas fāze. Ja nepieciešams, diapazona noteikšanas testu var veikt līdzīgos apstākļos (ūdens kvalitāte, testa sistēma, noslogojums ar dzīvniekiem) kā galīgo testu. Ja nākas izmantot šķīdinātāju un vēsturisku datu nav, diapazona noteikšanas testā var noskaidrot šķīdinātāja piemērotību. Augstākā testējamā koncentrācija nedrīkst pārsniegt šķīdību ūdenī, 10 mg/l vai 1/10 no 96 h LC_{50} (27). Zemākajai koncentrācijai jābūt 10 līdz 100 reizes mazākai par augstāko. Piecu koncentrāciju izmantošana šajā testā dod iespēju ne vien izmērīt devas–atbildreakcijas sakarības, bet arī noskaidrot zemāko nenovērojamās ietekmes koncentrāciju (*LOEC*) un *NOEC*, kas dažās regulatīvajās programmās vai jurisdikcijās nepieciešams riska novērtēšanai. Atstatuma koeficients starp testējamās ķīmikālijas nominālajām koncentrācijām blakusesošos apstrādes līmeņos parasti ir $\leq 3,2$.

Apstrādes grupu un kontroļu replikāti

23. Jāizmanto vismaz sešas replikātkameras uz testa koncentrāciju (sk. 7. papildinājumu). Reproductīvajā fāzē (izņemot paaudzei F0) replikācijas struktūru dubulto fekunditātes novērtēšanai, un katrā replikātā ir tikai viens vaislas pāris (sk. 42. punktu).

24. Papildus testējamajām koncentrācijām vajadzīga arī atšķaidīšanas ūdens kontrole un vajadzības gadījumā arī šķīdinātāja kontrole. Lai nodrošinātu pietiekamu statistisko jaudu, kontrolēm jāizmanto dubults replikātkameru skaits (t. i., kontrolēm izmanto vismaz divpadsmit replikātus). Reproductīvajā fāzē replikātu skaitu kontrolēs dubulto (t. i., vismaz 24 replikāti, tikai viens vaislas pāris uz replikātu). Pēc reproducēšanās kontroles replikātos vajadzētu būt ne vairāk kā 20 zivju embriju.

PROCEDŪRA

Testa sākšana

25. Reproductīvi aktīvās pieaugušās zivis, ko izmanto testa paaudzes F0 izveidei, atlasa pēc diviem kritērijiem: vecums (parasti vairāk nekā 12 npa, bet ieteicams nepārsniegt 16 npa) un masa (≥ 300 mg mātītēm un ≥ 250 mg tēviņiem).
26. Mātīšu un tēviņu pārus, kas atbilst šīm specifikācijām, kā atsevišķus pārus ievieto katrā replikāttvertnē, tā testa sākumā iegūstot divpadsmit kontroles replikātus un sešus ar ķīmikāliju apstrādātus replikātus. Šīm tvertnēm pēc nejaušības principa nosaka apstrādi (piem., T1–T5 un kontrole) un replikātu (piem., A–L kontrolei un A–F apstrādei) un tad ievieto ekspozīcijas sistēmā, uz katru tvertni nodrošinot attiecīgu plūsmu.

Ekspozīcijas nosacījumi

27. Pilnīgs testa parametru un nosacījumu kopsavilkums atrodams 3. papildinājumā. Ja šīs specifikācijas tiek ievērotas, kontroles zivju beigupunktu vērtībām vajadzētu būt līdzīgām tām, kas norādītas 4. papildinājumā.
28. Testa laikā vismaz vienā katras apstrādes grupas un kontroles testa traukā mēra izšķīdušo skābekli, pH un temperatūru. Šos mērījumus (izņemot temperatūras mērījumu) visā ekspozīcijas periodā veic vismaz reizi nedēļā. Vidējai ūdens temperatūrai visā testa laikā jābūt diapazonā no 24 līdz 26 °C. Temperatūru visā ekspozīcijas periodā mēra katru dienu. Ūdens pH jābūt diapazonā no 6,5 līdz 8,5, bet konkrētā testā tam jābūt $\pm 0,5$ pH vienību diapazonā. Apstrādātie replikāti nedrīkstētu būt statistiski atšķirīgi, un arī apstrādātās testa grupas nedrīkstētu statistiski viena no otras atšķirties (ik dienas veiktu temperatūras mērījumu ziņā un neskaitot īslaicīgas novirzes).

Ekspozīcijas ilgums

29. Testā trīs nedēļas tiek eksponētas reproductīvi nobriedušas paaudzes F0 zivis. 4. nedēļā aptuveni 24. testa dienā izveido paaudzi F1, bet paaudzes F0 vaislas pārus humāni nonāvē un reģistrē to masu un garumu (sk. 34. punktu). Pēc tam paaudzi F1 eksponē vēl 14 nedēļas (kopā 15 ekspozīcijas nedēļas paaudzei F1) un paaudzi F2 eksponē divas nedēļas līdz izšķīlšanās laikam. Testa kopējais garums principā ir 19 nedēļas (t. i., līdz

paaudzes F2 izšķilšanās laikum). Testa laika grafiki ir redzami 2. tabulā un vēl sīkāk izskaidroti 9. papildinājumā.

Barošanas režīms

30. Zivis var *ad libitum* barot ar sālūdens vēžveidīgajiem *Artemia* spp. (24 h veciem nauplijiem), vajadzības gadījumā papildus dodot komerciāli pieejamas barības pārslas. Ar analīzēm regulāri pārlicinās, ka komerciāli pieejamajās barības pārslās nav kontaminantu, piemēram, hlororganisko pesticīdu, policiklisko aromātisko ogļūdeņražu (turpmāk “PAO”) un polihlorbifenilu (turpmāk “PHB”). Jāizvairās no barības ar paaugstinātu endokrīni aktīvu vielu līmeni (piem., fitoestrogēniem), kas testā varētu ietekmēt atbildreakciju. No testēšanas traukiem pēc vajadzības jāizņem neapēstā barība un izkārnījumi, piem., katras tvertnes apakšdaļu rūpīgi iztīrot ar sifonu. Vienu vai divas reizes nedēļā jānotīra arī katras tvertnes sienas un dibens (piem., noskrāpējot netīrumus ar skrāpi). Barošanas režīma piemērs atrodams 5. papildinājumā. Barības daudzumu nosaka pēc zivju skaita uz replikātu. Tas nozīmē, ka barības daudzumu samazina, ja replikātā ir zivju nāves gadījumi.

Analītiskie konstatējumi un mērījumi

31. Pirms ekspozīcijas perioda sākuma jānodrošina pareiza ķīmikālijas pievades sistēmas darbība. Visām nepieciešamajām analītiskajām metodēm jābūt atzītām, un nepieciešamas arī pietiekamas zināšanas par ķīmikālijas stabilitāti testa sistēmā. Testa laikā pienācīgos intervālos nosaka testējamās ķīmikālijas koncentrācijas, vēlams — vienā katras apstrādes grupas replikātā vismaz reizi nedēļā, katru nedēļu izvēloties citu tās pašas apstrādes grupas replikātu.
32. Testa laikā ar regulāriem starplaikiem (piem., vismaz trīs reizes nedēļā) pārbauda atšķaidītāja un izejšķīduma caurplūdumu. Rezultātus ieteicams balstīt uz izmērītajām koncentrācijām. Tomēr, ja testējamās ķīmikālijas koncentrācija šķīdumā visā testa laikā ir apmierinoši uzturēta $\pm 20\%$ diapazonā ap vidējām izmērītajām vērtībām, rezultātu var balstīt kā uz izmērītajām, tā nominālajām vērtībām. Ja ķīmikālijas zivīs ievērojami uzkrājas, testa koncentrācijas, zivīm augot, var mazināties. Tādos gadījumos ieteicams testējamā šķīduma atjaunināšanās rādītāju katrā kamerā pielāgot tā, lai testa koncentrācija paliktu iespējami nemainīga.

Novērojumi un mērītie beigupunkti

33. Mērītie beigupunkti ir fekunditāte, fertilitāte, izšķilšanās, pieaugums un izdzīvotība, kas ļauj izvērtēt iespējamās populācijas līmeņa ietekmes. Ik dienas turklāt jānovēro uzvedība un jāatzīmē jebkādas uzvedības īpatnības. Citi mehānistiski beigupunkti ietver hepatiskos vtg iRNS vai VTG proteīnu līmeņus, kas noteikti imūntestā (28), fenotipiskos dzimummarķierus, piem., raksturīgās tēviņu anālās spuras papillas, gonādiskā dzimuma histoloģisko izvērtējumu un nieru, aknu un gonādu histopatoloģisko izvērtējumu (sk.

beigupunktu sarakstu 1. tabulā). Visus šos specifiskos beigupunktus izvērtē īpatnā ģenētiskā dzimuma noteikšanas kontekstā, balstoties uz medakas tēviņu gēna *dmy* klātesību vai neesību (sk. 41. punktu). Izvērtē arī laiku līdz nārstošanai. Turklāt, izmantojot anālās spuras papillu skaitu, var iegūt vienkāršu fenotipisko dzimumu attiecību, kas ļauj konkrētas medakas atzīt par fenotipiskiem tēviņiem vai mātītēm. Nav gaidāms, ka šī testēšanas metode ļaus noteikt pieticīgas novirzes no paredzamās dzimumu attiecības, jo salīdzinoši mazais zivju skaits replikātā nedod pietiekamu statistisko jaudu. Turklāt histopatoloģiskās novērtēšanas laikā tiek izvērtētas gonādas un tiek veiktas daudz spēcīgākas gonādiskā fenotipa analīzes ģenētiskā dzimuma kontekstā.

34. Galvenais šīs testēšanas metodes mērķis ir novērtēt testējamās ķīmikālijas iespējamo populācijas līmeņa ietekmi. Mehānistiski beigupunkti (VTG, SDzP un konkrētas gonādiskas histopatoloģiskās ietekmes) var palīdzēt arī noteikt, vai ietekmi mediē endokrīnā iedarbība. Tomēr šos mehānistiskos beigupunktus var iespaidot arī sistēmiska toksicitāte vai cita toksicitāte. Līdz ar to, lai varētu vieglāk saprast atbildreakcijas mehānistiskajos beigupunktos, var būt vajadzība detalizēti novērtēt arī aknu un nieru histopatoloģiju. Ja šo detalizēto izmeklēšanu tomēr neveic, jebkurā gadījumā jāatzīmē un pārskatā jānorāda histopatoloģiskajā izvērtēšanā nejauši ievērotas būtiskas anormālijas.

Humāna zivju nonāvēšana

35. Beidzot paaudzes F0 un F1 ekspozīciju (kad tiek apakšparaugotas gandrīz pieaugušas zivis), zivis būtu jānonāvē ar pienācīgu anestētiska šķīduma daudzumu (piem., trikaīna metānsulfonātu, MS-222 (*CAS* Nr.: 886-86-2), 100–500 mg/l), ko gļotādu kairinājuma mazināšanai atšķaida ar 300 mg/l NaHCO₃ (nātrija bikarbonāts, *CAS* Nr.: 144-55-8). Ja zivīm novērojamas ievērojamu ciešanu pazīmes (ļoti smagas, droši paredzama nāve) un tās uzskatāmas par mirstošām, tās anestezē un eitanazē, bet datu analīzes nolūkos uzskata par nāves gadījumiem. Ja zivi eitanazē tāpēc, ka tā mirst, tas jāatzīmē un jānorāda pārskatā. Atkarībā no tā, kurā pētījuma brīdī zivi eitanazē, var zivi paturēt, lai tai veiktu histopatoloģisko analīzi (zivi fiksēt iespējamās histopatoloģijas vajadzībām).

Manipulācijas ar iekriem un zivju kāpuriem

Ikru ievākšana no vaislas pāriem nākamās paaudzes iegūšanai

36. Pārejot no paaudzes F0 uz paaudzi F1, ikrus ievāc 4. testa nedēļas pirmajā dienā (vai vajadzības gadījumā pirmajās divās dienās), bet no paaudzes F1 uz paaudzi F2 — 18. nedēļas pirmajā dienā (vai attiecīgi pirmajās divās dienās). 18. testa nedēļa atbilst pieaugušām paaudzes F1 zivīm 15 npa (nedēļas pēc apaugļošanas). Lai nodrošinātu, ka visi no vaislas pāra ievāktie ikri ir no viena nārsta, ir svarīgi no katras tvertnes dienu pirms ikru ievākšanas iztīrīt visus iepriekšējos ikrus. Pēc nārsta medaku mātītes dažkārt ikrus līdz brīdim, kad tos var novietot uz substrāta, tur pie uroģenitālās atveres. Ja tvertnē substrāta

nav, ikri būs vai nu pie mātītes, vai tvertnes dibenā. Atkarībā no to novietojuma ikrus 4. testa nedēļā (F0) vai 18. testa nedēļā (F1) vai nu uzmanīgi noņem mātītei, vai ar sifonu noņem no tvertnes dibena. Visus vienā apstrādes reizē savāktos ikrus pirms ievietošanas inkubācijas kamerās apvieno.

37. Ikrus pavadienus, kas iznērstos ikrus notur kopā, noņem. No katra vaislas pāra (1 pāris uz replikātu) ievāc apaugļotos ikrus (līdz 20), tos sagrupē pēc apstrādes veida un sistemātiski sadala pa piemērotām inkubācijas kamerām (6., 7. papildinājums). Izmantojot kvalitatīvu stereomikroskopu, var saskatīt agrīnas apaugļošanās/attīstības pazīmes, piem., apaugļošanās plēves (horija) piebriešanu, notiekošu šūnu dalīšanos vai blastulas veidošanos. Inkubācijas kameras var ievietot atsevišķos “inkubācijas akvārijos”, ko izveido katra veida apstrādei (kāda gadījumā tajos jāmēra ūdens kvalitātes parametri un testējamās ķīmikālijas koncentrācijas), vai replikātakvārijā, kurā tur izšķīlušos kāpurus (piem., eleiteroembrijus jeb brīvi peldošos embrijus). Ja vajadzīga otrā vākšanas diena (23. testa diena), apkopo visus ikrus no abām dienām un tos sistemātiski iedala katrā apstrādes replikātā.

Ikrus audzēšana līdz izšķilšanās brīdim

38. Apaugļotos ikrus pastāvīgi kustina, piem., inkubatorā laižot gaisa burbuļus vai inkubatoru vertikāli šūpojot. Ik dienas pārbauda un reģistrē apaugļoto ikru (embriju) mirstību. Nedzīvos ikrus no inkubatoriem izņem (9. papildinājums). 7. dienā pēc apaugļošanas (dpa) kustināšanu izbeidz vai samazina tā, lai apaugļotie ikri nosēstos inkubatora dibenā. Tas veicina izšķilšanos, kas parasti notiek nākamajā vai aiznākamajā dienā. Saskaita katrā apstrādes un kontroles grupā izšķīlušos īpatņus (jaunos kāpurus, eleiteroembrijus) (replikātus apvienojot). Apaugļotus ikrus, kas kontrolē nav izšķīlušies līdz divkārtotai medianālajai dienai (parasti 16. vai 18. dpa), uzskata par dzīvotnespējīgiem un atmet.
39. Katrā replikāttvertnē ievieto divpadsmit izšķīlušos īpatņus. Izšķīlušos īpatņus no inkubācijas kamerām sakopo un sistemātiski sadala pa replikāttvertnēm (7. papildinājums). To var izdarīt, pēc nejaušības principa izvēloties izšķīlušos īpatni no apstrādes grupas un tad izšķīlušos īpatni neselektīvi ievietojot replikātakvārijā. Katrā tvertnē jābūt vienādam skaitam ($n=12$) izšķīlušos kāpuru (ne vairāk kā 20 kāpuru katrā). Ja nav pietiekami daudz kāpuru, lai varētu aizpildīt visus apstrādes replikātus, ir ieteicams tos sadalīt tā, lai pēc iespējas lielākā skaitā replikātu būtu 12 kāpuri. Ar kāpuriem var droši veikt manipulācijas, izmantojot liela diametra stikla pipetes. Liekos kāpurus humāni nonāvē ar anestēzijas līdzekli. Pēdējās nedēļās pirms vaislas pāru izveides reģistrē dienu, kurā katrā replikātā konstatē pirmo nārstošanu.

Vaislas pāru sagatavošana

Spuru paraugošana un genotipiskā dzimuma noteikšana

40. Genotipiskā dzimuma noteikšanu spuru paraugošanas ceļā veic 9–10 npa (t. i., paaudzei F1 12.–13. testa nedēļā). Lai noteiktu īpatņa genotipisko dzimumu, visas tvertnē esošās zivis anestezē (izmantojot apstiprinātas metodes, piem., *IACUC*) un no astes spuras dorsālā vai ventrālā gala paņem nelielu audu paraugu (29). Replikāta zivis var turēt nelielos būros, vēlams, pa vienai zivij uz būri, replikāttvertnē. Ja tās vienu no otras var atšķirt, katrā būrī var turēt arī divas zivis. Viena metode, kā to panākt, ir, ņemot audu paraugu, astes spuru apgriezt atšķirīgi (piem., vienai dorsālo, vienai ventrālo galu).
41. Medakas genotipisko dzimumu nosaka ar identificētu un sekvenētu gēnu (*dmy*), kas atrodas Y hromosomā. *dmy* klātbūtne liecina par liecina par XY īpatni (neatkarīgi no fenotipa), savukārt *dmy* trūkums liecina par XX īpatni (neatkarīgi no fenotipa) (30); (31). No katra spuras apgriezuma ekstrahē dezoksiribonukleīnskābi (DNS), un *dmy* klātbūtni vai trūkumu var noteikt ar polimerāzes ķēdes reakcijas (PĶR) metodēm (sk. šā pielikuma C.41. nodaļas 9. papildinājumu vai 3. un 4. papildinājumu avotā (29)).

Vaislas pāru izveide

42. Izmantojot informāciju par genotipisko dzimumu, izveido XX-XY vaislas pārus neatkarīgi no ārējā fenotipa, ko var ietekmēt ekspozīcija testējamajai ķīmikālijai. Nākamajā dienā pēc tam, kad noteikts katras zivs genotipiskais dzimums, pēc nejaušības principa no katra replikāta izvēlas divas XX zivis un divas XY zivis un izveido divus XX-XY vaislas pārus. Ja replikātā vai nu divu XX zivju, vai divu XY zivju nav, piemērotas zivis ņem no citiem apstrādes replikātiem. Galvenais ir iegūt ieteikto replikātu vaislas pāru skaitu (12) katrā apstrādes grupā un kontrolēs (24). Veidojot vaislas pārus, neņem zivis ar acīmredzamām anormālijām (problēmas ar peldpūsli, deformēts mugurkauls, ārkārtējas lieluma variācijas utt.). F1 reproduktīvajā fāzē katrā replikāttvertnē vajadzētu būt tikai vienam vaislas pārim.

Gandrīz pieaugušu īpatņu paraugošana un beigupunktu novērtēšana

Vaislas pāros neiekļauto zivju paraugošana

43. Pēc vaislas pāru sagatavošanas zivis, ko tālākai pavairošanai neizraugās, humāni nonāvē, lai varētu veikt gandrīz pieaugušu īpatņu beigupunktu mērījumus 12.–13. testa nedēļā (F1). Ir ļoti svarīgi ar zivīm apieties tā, lai joprojām varētu izsekot, kāds genotipiskais dzimums konkrētai zivij noteikts vaislas pāru atlases laikā. Visus savāktos datus analizē konkrētās zivs genotipiskā dzimuma kontekstā. Katru zivi izmanto dažādiem beigupunktu mērījumiem, tostarp nosaka zivju mazuļu / gandrīz pieaugušu zivju izdzīvotību (7.–12./13. testa nedēļā (F1)), pieaugumu garumā (ja astes spura ir īsāka tāpēc, ka veikta paraugošana ģenētiskā dzimuma analīzei, var mērīt standartgarumu; kopējo garumu var mērīt tikai tad, ja *dmy* noteikšanas vajadzībām paraugota tikai astes spuras dorsālās vai ventrālās daivas gala daļa) un ķermeņa masu (t. i., slapjmasu pēc nosusināšanas), aknu vtg

iRNS (vai VTG) un anālās spuras papillas (sk. 1. un 2. tabulu). Jāņem vērā, ka vaislas pāru masa un garums vajadzīgs arī apstrādes grupas vidējā pieauguma aprēķinam.

Audu paraugošana un vitelogenīna mērīšana

44. Aknas izpreparē un līdz vtg iRNS (vai VTG) mērīšanai glabā ≤ -70 °C. Zivs asti, arī anālo spuru, saglabā piemērotā fiksatorā (piem., Deividsona fiksatorā) vai nofotografē tā, lai vēlāk varētu izskaitīt anālās spuras papillas. Vajadzības gadījumā šajā laikā var paraugot un saglabāt arī citus audus (piem., gonādas). Aknu VTG koncentrāciju kvantificē ar homologu *ELISA* paņēmieni (sk. attiecībā uz medaku ieteiktās procedūras šā pielikuma C.48. nodaļas 6. papildinājumā). Alternatīvas metodes, kā kvantificēt vtg iRNS, t. i., ekstrahēt gēna *vtg I* iRNS no aknu parauga un noteikt gēna *vtg I* kopiju skaitu (uz kopējās iRNS ng) ar kvantitatīvu PQR, izstrādājusi ASV Vides aizsardzības aģentūra (29). Mazāk resursprasīga un tehniski vienkāršāka metode ir nevis noteikt gēna *vtg* kopiju skaitu kontroles un apstrādes grupās, bet gan noteikt relatīvo (kārtas) izmaiņu gēna *vtg I* ekspresijā kontroles un apstrādes grupās.

Sekundārās dzimumpazīmes

45. Parastos apstākļos tikai dzimumgatavību sasniegušiem medaku tēviņiem ir papillas, kas kā sekundāra dzimumpazīme attīstās uz dažu anālās spuras staru savienojumplātnītēm un ir potenciāls endokrīni disruptīvas ietekmes biomarķieris. Anālās spuras papillu (to savienojumplātnīšu, kam ir papillas) skaitīšanas metode ir sniegta 8. papildinājumā. Īpatnā anālās spuras papillu skaitu izmanto arī tam, lai attiecīgo īpatni kategorizētu par ārēji fenotipisku tēviņu vai mātīti nolūkā aprēķināt vienkāršu dzimumu attiecību replikātā. Medaku, kam papillu ir vairāk nekā 0, uzskata par tēviņu; medaku, kam anālās spuras papillu nav, uzskata par mātīti.

Fekunditātes un fertilitātes novērtēšana

46. Paaudzē F0 fekunditāti un fertilitāti novērtē 1. līdz 3. testa nedēļā, bet paaudzē F1 — 15. līdz 17. testa nedēļā. 21 dienu pēc kārtas no katra vaislas pāra ik dienas savāc ikrus. Ikrus katru rītu uzmanīgi noņem no mātīšu pavēderes un/vai ar sifonu noņem no akvārija dibena. Katru dienu reģistrē gan katra replikātu vaislas pāra fekunditāti, gan fertilitāti. Fekunditāte pēc definīcijas ir iznērsto ikru skaits, bet fertilitāte pēc funkcionālās definīcijas ir apaugļoto un dzīvotspējīgo ikru skaits skaitīšanas laikā. Skaitīšanu veic iespējami drīz pēc ikru ievākšanas.
47. Replikātu fekunditāti ik dienas reģistrē kā ikru skaitu uz vaislas pāri; to analizē ar ieteiktajām statistiskajām procedūrām, izmantojot replikātu vidējās vērtības. Replikātu fertilitāte ir vaislas pāra auglīgo ikru kopskaits, kas dalīts ar attiecīgā pāra ikru kopskaitu. Statistiski fertilitāti analizē kā attiecību vienā replikātā. Replikāta šķīstība ir izšķīlušos

īpatņu skaits, dalīts ar ievietoto embriju skaitu (parasti 20). Statistiski šķīlstību analizē kā attiecību vienā replikātā.

Pieaugušu īpatņu paraugošana un beigupunktu novērtēšana

Vaislas pāru zivju paraugošana

48. Pēc 17. testa nedēļas (proti, kad veiksmīgi sākusies paaudze F2) pieaugušos paaudzes F1 īpatņus humāni nonāvē un novērtē dažādus beigupunktus (sk. 1. un 2. tabulu). Anālo spuru nofotografē, lai novērtētu spuras papillas sk. 8. papildinājumu), un/vai asti tieši aiz uroģenitālās atveres noņem un saglabā ar fiksatoru, lai papillas varētu izskaitīt vēlāk. Ja vēlas, daļu astes spuras šajā laikā var paraugot un arhivēt, lai varētu verificēt ģenētisko dzimumu (*dmy*). Vajadzības gadījumā var paņemt audu paraugu, lai varētu atkārtot *dmy* analīzi konkrētās zivs ģenētiskā dzimuma verificēšanai. Ķermeņa dobumu atver, lai to būtu iespējams caurskalot ar piemērotiem fiksatoriem (piem., Deividsona fiksatoru), un visu ķermeni iegremdē fiksatorā. Tomēr, ja pirms fiksācijas veic pienācīgu permeabilizāciju, ķermeņa dobumu atvērt nav vajadzības.

Histopatoloģija

49. Katru zivi histoloģiski izmeklē uz patoloģijām gonādiskajos audos (30) (29). Kā minēts 33. punktā, citus šajā testā izvērtētos mehānistiskos beigupunktus (t. i., VTG, SDzP un konkrētas gonādiskas histopatoloģiskās ietekmes) var ietekmēt arī sistēmiska vai citāda toksicitāte. Līdz ar to, lai varētu vieglāk saprast atbildreakcijas mehānistiskajos beigupunktos, var būt vajadzība detalizēti novērtēt arī aknu un nieru histopatoloģiju. Ja šo detalizēto izmeklēšanu tomēr neveic, jebkurā gadījumā jāatzīmē un pārskatā jānorāda histopatoloģiskajā izvērtēšanā nejauši ievērotas būtiskas anormālijas. Var apsvērt “lejupēju lasīšanu” no augstākās apstrādes grupas (salīdzinājumā ar kontroli) uz apstrādes grupu, kurā ietekme nav novērojama, taču ir ieteicams iepazīties ar histopatoloģiskajiem norādījumiem (29). Parasti visus paraugus sagatavo/sadala, bet pēc tam tos nolasa patoloģi. Ja izmanto “lejupējās lasīšanas” ieeju, jāpiezīmē, ka procedūras *Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS)* pamatā ir pieņēmums, ka, palielinoties devas līmeņiem, palielināsies arī bioloģiskā ietekme (patoloģija). Tāpēc, ja novērtē tikai vienas lielas devas atstātu ietekmi, neskatot vidējas devas, mazinās testa jauda. Šāda pieeja var būt pieņemama, ja, lai noteiktu, ka lielajai devai ietekmes nav, statistiska analīze nav vajadzīga. Šajā izvērtējumā noskaidro arī gonādisko fenotipu.

Citi novērojumi

50. *MEOGRT* sniedz datus, ko var izmantot (piem., pierādījumu svara pieejā), lai vienlaicīgi izvērtētu vismaz divu galveno veidu nelabvēlīga iznākuma ceļus (*AOP*), kas noved pie reproduktīvajiem traucējumiem: a) endokrīniski mediēti ceļi, kas disruptē hipotalāma, hipofīzes un gonādu (HHG) endokrīnisko asi, un b) neendokrīniski mediētas toksicitātes

ceļi, kas izraisa izdzīvotības, pieauguma (garums un masa) un reproduktīvo rādītāju samazinājumu. Šajā testā ir iekļauti arī beigupunkti, ko parasti mēra hroniskās toksicitātes testos, piemēram, pilna dzīves cikla testā un agrīno dzīves cikla stadiju testā, un ar tiem var izvērtēt briesmas, ko rada gan neendokrīniski mediāti iedarbības veidi un endokrīniski mediāti toksiskuma ceļi. Testa laikā ik dienas jānovēro uzvedība un jāatzīmē jebkādas uzvedības īpatnības. Turklāt jāreģistrē jebkāda mirstība un jāaprēķina izdzīvotība līdz zivju atlasei (6./7. testa nedēļa), izdzīvotība pēc atlases līdz gandrīz pieaugušu īpatņu paraugošanai (9.–10. npa) un izdzīvotība no pāru izveides līdz pieaugušu zivju paraugošanai.

1. tabula. Pārskats par *MEOGRT* beigupunktiem*

Dzīves cikla stadija	Beigupunkts	Paaudze
Embriji (2 npa)	Šķīstība (% un laiks līdz izšķilšanās brīdim)	F1, F2
Mazuļi (4 npa)	Izdzīvotība	F1
Gandrīz pieauguši īpatņi (9 vai 10 npa)	Izdzīvotība	F1
	Pieaugums (garums un masa)	
	Vitelogenīns (iRNS vai proteīns)	
	Sekundārās dzimum pazīmes (anālās spuras papillas)	
	Dzimumu attiecība pēc ārējām pazīmēm	
	Laiks līdz 1. nārstam	
Pieaugušas zivis (12–14 npa)	Reprodukcija (fekunditāte un fertilitāte)	F0, F1
Pieaugušas zivis (15 npa)	Izdzīvotība	F1
	Pieaugums (garums un masa)	
	Sekundārās dzimum pazīmes (anālās spuras papillas)	
	Histopatoloģija (gonādu, aknu, nieru)	

* Šie beigupunkti jāanalizē statistiski.

NORISES GRAFIKS

51. 2. tabulā sniegtais *MEOGRT* norises grafiks atspoguļo testa gaitu. *MEOGRT* laikā 4 nedēļas tiek eksponēti pieauguši paaudzes F0 īpatņi un 15 nedēļas — paaudzes F1 īpatņi, kā arī otrā paaudze (F2) — līdz izšķilšanās laikam (2 npa). Kopsavilkums par *MEOGRT* posmiem ir pieejams 9. papildinājumā.

2. tabula. MEOGRT ekspozīcijas un beigupunktu mērījumu grafiks.

MEOGRT ekspozīcijas un beigupunktu grafiks																			
F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																	1	2	
Testa nedēļa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Dzīves cikla stadijas atslēga				Embriji				Kāpuri				Mazuļi				Gandrīz pieauguši īpatņi		Pieaugušas zivis	
Beigupunkti																			
Fekunditāte	F ₀														F ₁				
Fertilitāte	F ₀														F ₁				
Šķīstība					F ₁														F ₂
Izdzīvotība						F ₁						F ₁						F ₁	
Pieaugums				F ₀								F ₁						F ₁	
Vitelogenīns												F ₁							
Sekundārās dzimumpazīmes												F ₁						F ₁	
Histopatoloģija																		F ₁	
Testa nedēļa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
SDzP: sekundārās dzimumpazīmes; ned.: nedēļa; vtg: vitelogenīns																			

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Statistiskā analīze

52. Tā kā visām testa zivīm nosaka genotipisko dzimumu, dati par katra genotipiskā dzimuma zivīm (t. i., XY tēviņiem un XX mātītēm) analizējami atsevišķi. Ja tā nerīkojas, ievērojami samazinās analīzes statistiskā jauda. Veicot datu statistisko analīzi, vēlams ievērot procedūras, kas aprakstītas ESAO dokumentā *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* [“Ekotoksiskuma datu statistiskās analīzes pašreizējās metodes: lietošanas norādījumi”] (32). Sīkāki norādījumi par statistisko analīzi sniegti 10. papildinājumā.

53. Testa plānam un statistisko testu atlasei vajadzētu dot pietiekamu jaudu, lai varētu noteikt bioloģiski svarīgas izmaiņas beigupunktos gadījumos, kad jāziņo *NOEC* (32). Relevanto efektīvo koncentrāciju un parametru ziņošana var būt atkarīga no tiesiskā regulējuma. Ir jāidentificē katra tāda beigupunkta procentuālās izmaiņas, kuru ir svarīgi noteikt vai aplēst.

Eksperimenta plāns jāizstrādā tā, lai tas būtu iespējams. Maz ticams, ka visiem beigupunktiem procentuālās izmaiņas būs vienādas, un tāpat ir maz ticams, ka var izplānot reālistisku eksperimentu, kurš šie kritērijiem atbilstu attiecībā uz visiem beigupunktiem, tāpēc, lai eksperimentu izplānotu pareizi, galvenā uzmanība ir jāpievērš beigupunktiem, kas ir svarīgi konkrētajam eksperimentam. 10. papildinājumā ir pieejama statistiskās analīzes plūsmas diagramma un norādījumi, kā apstrādāt datus un izvēlēties vispiemērotāko statistisko testu vai modeli. Var izmantot citas statistiskas pieejas, ja tās ir zinātniski pamatotas.

54. Katras replikātu kopas ietvaros jāanalizē variācijas, izmantojot dispersijas analīzi vai kontingences tabulu, kā arī pietiekamas un piemērotas statistisko analīžu metodes, kuru pamatā ir šī analīze. Lai varētu veikt multiplo salīdzinājumu starp atsevišķo koncentrāciju un kontroļu rezultātiem, nepārtrauktas atbildreakcijas gadījumā ieteicams izmantot descendentu Džonkhīra–Terpstras testu. Ja dati neatbilst monotonai atbildreakcijai uz koncentrāciju, būtu jāizmanto Daneta tests vai Dannas tests [*Dunn's test*] (pēc pienācīgas datu transformēšanas, ja tāda vajadzīga).
55. Nosakot fekunditāti, ikrus skaita ik dienas, bet tos var analizēt kā ikru kopskaitu vai kā atkārtotu mērījumu. Sīkāka informācija par to, kā analizēt šo beigupunktu, atrodama 10. papildinājumā. Histopatoloģijas datiem, kas ir smaguma atzīmju formā, ir izstrādāts jauns statistiskais tests — *Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS)* (33).
56. Pārskatā norāda visus ar ķīmikāliju apstrādātajā grupā novērotos beigupunktus, kas ievērojami atšķiras no attiecīgo kontroļu beigupunktiem.

Ar datu analīzi saistītie apsvērumi

Kompromitētu apstrādes līmeņu izmantošana

57. Nosakot, vai replikāts vai visa apstrādes grupa liecina par acīmredzamu toksicitāti un būtu no analīzes jāizslēdz, jāņem vērā vairāki faktori. Acīmredzamu toksicitāti definē kā > 4 tādus nāves gadījumus vienā replikātā laikā no 3. līdz 9. npa, ko nevar izskaidrot ar tehnisku kļūdu. Citas acīmredzamas toksicitātes pazīmes ir hemorāģijas, anormāla uzvedība, anormāla peldēšana, anoreksija un jebkuras citas klīniskas saslimšanas pazīmes. Subletālām toksicitātes pazīmēm var būt nepieciešama kvalitatīva izvērtēšana, un tā vienmēr jāveic salīdzinājumā ar atšķaidīšanai izmantotā ūdens kontrolgrupu (tikai tīrs ūdens). Ja acīmredzama toksicitāte ir novērojama augstākā līmeņa vai līmeņu apstrādēs, šīs apstrādes no analīzes cenžē.

Šķīdinātāja kontroles

58. Šķīdinātāja izmantošana ir apsverama tikai kā galējs līdzeklis, kad visas citas ķīmikālijas padošanas iespējas ir jau izskatītas. Ja lieto šķīdinātāju, kopā ar to izmanto arī atšķaidīšanas ūdens kontroli. Testu beidzot, izvērtē potenciālo šķīdinātāja ietekmi. To dara, šķīdinātāja kontrolgrupu statistiski salīdzinot ar atšķaidīšanas ūdens kontrolgrupu. Visrelevantākie šajā analīzē izskatāmie beigupunkti ir pieauguma determinanti (masa), jo tos var ietekmēt vispārēja toksicitāte. Ja šajos beigupunktos konstatē statistiski nozīmīgas atšķirības starp atšķaidīšanas ūdens kontrolgrupu un šķīdinātāja kontrolgrupu, to, vai ir kompromitēts testa derīgums, rūpīgi izvērtē speciālists. Ja abu kontroļu rezultāti ir atšķirīgi, ķīmikālijai eksponētās apstrādes grupas salīdzina ar šķīdinātāja kontroli, ja vien nav zināms, ka priekšroka dodama atšķaidīšanas ūdens kontrolei. Ja statistiski nozīmīgu atšķirību starp abām kontrolgrupām nav, ir ieteicams testējamajai ķīmikālijai eksponētās apstrādes salīdzināt ar abām grupām (šķīdinātāja un atšķaidīšanas ūdens kontrolgrupām) kopā, ja vien nav zināms, ka priekšroka dodama tikai šķīdinātāja vai tikai atšķaidījuma ūdens kontrolgrupai.

Testēšanas pārskats

59. Testēšanas pārskatā norāda šādas ziņas.

Testējamā ķīmikālija: fizikālās īpašības un attiecīgā gadījumā fizikālķīmiskās īpašības:

- ķīmiskās identifikācijas dati;

vienkomponenta viela:

- izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības;
- ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (ciktāl vajadzīgs un iespējams) u. c. (attiecīgā gadījumā arī organiskā oglekļa saturs);

daudzkomponentu vielas, *UVCB* un maisījumi:

- iespējami izsmeļošs raksturojums ar, piem., sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), tīrību, kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Testa suga:

- zinātniskais nosaukums, celms (ja zināms), avots un apaugļoto ikru ievākšanas metode un turpmākas manipulācijas.

Testa apstākļi:

- fotoperiodi
- testa plāns (piem., kameru lielums, materiāls un ūdens tilpums, testa kameru un replikātu skaits, izšķīlušos īpatņu skaits uz replikātu);

- izejšķīdumu sagatavošanas metode un atjaunināšanas biežums (ja tādu izmanto, norāda šķīdināšanas aģentu un tā koncentrāciju);
- testējamās ķīmikālijas dozēšanas metode (piem., sūkņi, atšķaidīšanas sistēmas);
- metodei raksturīgā atgūstamība un nominālās testējamās koncentrācijas, kvantitatīvās noteikšanas robeža, mērījumu vidējās vērtības un to standartnovirzes testa traukos un metode, ar ko tās iegūtas, un pierādījumi, ka mērījumi raksturo testējamās ķīmikālijas koncentrācijas īstā šķīdumā;
- atšķaidīšanas ūdens raksturlielumi: testa vides pH, cietība, temperatūra, izšķīdušā skābekļa koncentrācija, hlora atlikuma līmeņi (ja mērīti), kopējais organiskais ogleklis (ja mērīts), suspendētās cietvielas (ja mērītas), sāļums (ja mērīts) un citi izdarītie mērījumi;
- nominālās testējamās koncentrācijas, izmērīto vērtību vidējie un to standartnovirzes;
- ūdens kvalitāte testa traukos: pH, temperatūra (katru dienu) un izšķīdušā skābekļa koncentrācija;
- sīka informācija par barošanu (piem., barības veidi, avots, dotais daudzums un došanas biežums).

Rezultāti:

- Pierādījumi, ka kontroles atbilst vispārīgajiem derīguma kritērijiem;
- šādi dati par kontrolgrupu (un arī šķīdinātāja kontroli, ja tādu izmanto) un apstrādes grupām: F1 un F2 izšķīlšanās rādītāji (šķīstība un laiks līdz izšķīlšanās brīdim), F1 izdzīvotība pēc izšķīlšanās, F1 pieaugums (garums un ķermeņa masa), F1 genotipiskais dzimums un dzimumdiferenciācija (t. i., sekundārās dzimum pazīmes, ko nosaka pēc anālās spuras papillām un gonādiskās histoloģijas), F1 fenotipiskais dzimums, F1 sekundārās dzimum pazīmes (anālās spuras papillas), F1 vtg iRNS (vai VTG proteīns), F1 histopatoloģiskais novērtējums (gonādas, aknas un nieres) un F0 un F1 reprodukcija (fekunditāte un fertilitāte) (sk. 1. un 2. tabulu);
- statistiskās analīzes pieeja (regresijas analīze vai dispersijas analīze) un datu apstrāde (izmantotie statistiskie testi un modeļi);
- katrai novērtētajai atbildreakcijai — nenovērojamās ietekmes koncentrācija (*NOEC*);
- katrai novērtētajai atbildreakcijai — zemākā novērojamās ietekmes koncentrācija (*LOEC*) ($p=0,05$); katrai novērtētajai atbildreakcijai — EC_x (attiecīgā gadījumā) un ticamības intervāli (piem., 90 % vai 95 %) un EC_x aprēķināšanai pielāgotā modeļa grafiks, koncentrācijas—atbildreakcijas līknes virziena koeficients, regresijas modeļa formula, aplēstie modeļa parametri un to standartkļūdas;

- jebkādas novirzes no šīs testēšanas metodes un novirzes no pieņemamības kritērijiem, kā arī apsvērumi par iespējamo ietekmi uz testa iznākumu.
60. Attiecībā uz beigupunktu mērījumiem jānorāda vidējās vērtības un to standartnovirzes (ja iespējams, gan uz replikātu, gan uz koncentrāciju).

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

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

- (21) Šā pielikuma C.37. nodaļa. Zivju 21 dienas tests. Estrogēniskās un androgēniskās darbības un aromatāzes inhibēšanās īstermiņa skrīnings.
- (22) Šā pielikuma C.41. nodaļa. Zivju dzimumattīstības tests.
- (23) Šā pielikuma C.48. nodaļa. Īsais zivju vairošanās tests.
- (24) Šā pielikuma C.47. nodaļa. Zivju agrīno attīstības stadiju toksicitātes tests.
- (25) Šā pielikuma C.49. nodaļa. Zivju embriju akūtās toksicitātes (*FET*) tests.
- (26) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. *Chemosphere* 92: 1067-1076.
- (27) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50: 301-308.
- (28) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (29) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and 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 (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.
- (32) Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1108-1116.

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Ķīmikālija: viela vai maisījums.

ELISA: imūnfermentatīvā analīze.

Fekunditāte: ikru skaits.

Fertilitāte: dzīvotspējīgo ikru skaits / fekunditāte.

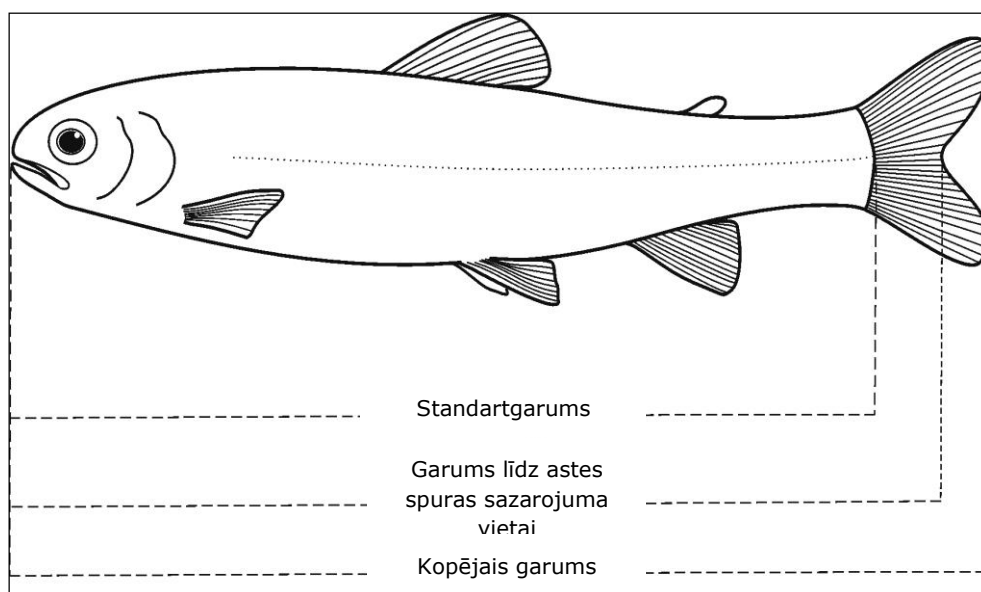
Garums līdz astes spuras sazarojuma vietai (GLS): garums no purna gala līdz vidējo astes spuras staru galam; to izmanto attiecībā uz zivīm, kurām grūti noteikt, kur beidzas mugurkauls (www.fishbase.org).

Šķīstība: izšķīlušos īpatņu skaits / inkubatorā ielikto embriju skaits.

IACUC: Institucionālā dzīvnieku aprūpes un izmantošanas komiteja.

Standartgarums (SG): zivs garums, kas nomērīts no purna gala līdz pēdējā skriemeļa tālākajam galam vai astes pamatnes sānu viduslīnijas tālākajam galam. Vienkārši sakot, šajā mērījumā neņem vērā astes spuras garumu (www.fishbase.org).

Kopējais garums (KG): zivs garums no purna gala līdz astes spuras garākās daivas galam; to parasti mēra, abas daivas saspiežot gar viduslīniju. Tas ir taisnas līnijas mērījums, ko nemēra pa ķermeņa izliekuma līniju (www.fishbase.org).



1. attēls. Dažādo izmantoto garumu ilustrācija.

EC_x: (efektīvā koncentrācija, pie kuras ietekme ir x %) ir koncentrācija, pie kuras ietekme uz testa organismiem konkrētā ekspozīcijas periodā salīdzinājumā ar kontroli ir x %. Piemēram, EC₅₀ ir koncentrācija, kas pēc aplēsēm konkrētā ekspozīcijas periodā ietekmē kādu testa beigupunktu 50 % no eksponētās populācijas.

Caurplūdes tests ir tests, kurā testa šķīdumi visā ekspozīcijas laikā nepārtraukti plūst caur testa sistēmu.

HHG ass: hipotalāma, hipofīzes un gonādu ass.

IUPAC: Starptautiskā Teorētiskās un lietišķās ķīmijas savienība.

Noslogojums: zivju slapjmasa uz ūdens tilpumdaudzumu.

Zemākā novērojamas ietekmes koncentrācija (LOEC) ir testējamās ķimikālijas zemākā testētā koncentrācija, pie kuras, salīdzinot ar kontroli, ķimikālijai ir novērota statistiski nozīmīga ietekme ($p < 0,05$). Pie visām testa koncentrācijām, kas augstākas par LOEC, ir jābūt kaitīgai ietekmei, kura vienāda ar vai lielāka par ietekmi, kas novērota pie LOEC. Ja šos divus nosacījumus nevar izpildīt, jāsniedz pilns paskaidrojums par to, kā LOEC (un līdz ar to arī NOEC) izraudzīta. Norādījumi sniegti 5. un 6. papildinājumā.

Medianālā letālā koncentrācija (LC₅₀): testējamās ķimikālijas koncentrācija, kas pēc aplēsēm testa laikā ir letāla 50 % testa organismu.

Nenovērojamās ietekmes koncentrācija (NOEC): testa koncentrācija, kura ir tieši zem LOEC un kurai, salīdzinot ar kontroli, noteiktā ekspozīcijas periodā nav nekādas statistiski nozīmīgas ietekmes ($p < 0,05$).

SMILES: *Simplified Molecular Input Line Entry Specification.*

Pieplūdtība: zivju skaits uz ūdens tilpumdaudzumu.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

VTG: vitelogenīns, olas dzeltenuma fosfolipīdu glikoproteīna prekursors, kas parasti veidojas tādu seksuāli aktīvu mātīšu organismā, kuras dēj olas / nērš ikrus.

npa: nedēļas pēc apaugļošanas.

2. papildinājums**DAŽI PIENĒMAMA ATŠĶAIDĪŠANAS ŪDENS ĶĪMISKIE RAKSTURLIELUMI**

Viela	Robežkoncentrācija
Daļiņas	5 mg/l
Kopējais organiskais ogleklis	2 mg/l
Nejonizēts amonjaks	1 µg/l
Atlikušais hlors	10 µg/l
Kopējie fosfororganiskie pesticīdi	50 ng/l
Kopējie hlororganiskie pesticīdi un polihlorbifenili	50 ng/l
Kopējais organiskais hlors	25 ng/l
Alumīnijs	1 µg/l
Arsēns	1 µg/l
Hroms	1 µg/l
Kobalts	1 µg/l
Varš	1 µg/l
Dzelzs	1 µg/l
Svins	1 µg/l
Niķelis	1 µg/l
Cinks	1 µg/l
Kadmija	100 ng/l
Dzīvsudrabs	100 ng/l
Sudrabs	100 ng/l

3. papildinājums**TESTA MEOGRT NOSACĪJUMI**

1. Ieteicamās sugas	Japānas medaka (<i>Oryzias latipes</i>)
2. Testa veids	Pastāvīgas caurplūdes
3. Ūdens temperatūra	Testa nominālā temperatūra ir 25 °C. Vidējā temperatūra katrā tvertnē testa laikā ir 24–26 °C.
4. Apgaismojuma kvalitāte	Fluorescējošās spuldzes (plaša spektra un ~150 lm/m ²) (~150 lx) 16 h gaismas, 8 h tumsas
6. Noslogojums	F0: 2 pieauguši īpatņi uz replikātu; F1: sāk ar, maksimums, 20 ikriem (embrijiem) uz replikātu, pie izšķilšanās skaitu samazina līdz 12 embrijiem uz replikātu un tad 9.–10. npa, gatavojoties reproduktīvajai gāzei, saglabā 2 pieaugušus īpatņus (XX–XY vaislas pāri)
7. Minimālais izmantojamais testa kameras tilpums	1,8 l (piem., 18x9x15 cm liela testa kamera)
8. Testa šķīdumu tilpumapmaiņu skaits	Vismaz 5 tilpumatjaunināšanas dienā, līdz 16 tilpumatjaunināšanām dienā (vai plūsmu 20 ml/min)
9. Testa organismu vecums iniciēšanas laikā	F0: > 12 npa, bet ieteicams nepārsniegt 16 npa
10. Organismu skaits uz replikātu	F0: 2 zivis (pāris — tēviņš un mātīte); F1: ne vairāk kā 20 zivju (ikru) uz replikātu (no F0 un F1 vaislas pāriem)
11. Apstrāžu skaits	5 apstrādes, kurām izmanto testējamo ķimikāliju, un attiecīga kontrole vai kontroles
12. Replikātu skaits uz vienu apstrādi	Vismaz 6 replikāti uz katru apstrādi, kurai izmanto testējamo ķimikāliju, un vismaz 12 replikāti kontrolei un šķīdinātāja kontrolei, ja tādu izmanto (replikātu skaits dubultojas F1 reprodukcijas fāzē)
13. Organismu skaits vienā testā	Vismaz 84 zivis F0 un 504 F1 (ja izmanto šķīdinātāja kontroli, 108 zivis F0 un 648 zivis F1). Īpatņu skaitu nosaka, skaitot īpatņus pēc eleiteroembriju stadijas.
14. Barošanas režīms	Zivis <i>ad libitum</i> baro ar sālūdens vēžveidīgajiem <i>Artemia</i> spp. (24 h veciem nauplijiem), vajadzības gadījumā papildus dodot komerciāli pieejamas barības pārslas (6. papildinājumā ir pieejams tāda barošanas režīma piemērs, kas nodrošina pietiekamu augšanu un attīstību, lai

	nebūtu problēmu ar reprodukciju)
15. Aerācija	Neveic, ja vien izšķīdušais skābeklis nepietuvojas < 60 % no gaisa piesātinājuma vērtības
16. Atšķaidīšanas ūdens	Tīrs virszemes, akas vai rekonstituēts ūdens vai athlorēts krāna ūdens
17. Ekspozīcijas periods	Principā 19 nedēļas (no F0 līdz F2 izšķilšanās laikam)
18. Bioloģiskie beigupunkti (galvenie)	Šķilstība (F1 un F2); izdzīvotība (F1, no izšķilšanās līdz 4. npa (kāpura stadijas beigas / mazuļa stadijas sākums), no 4. līdz 9. (vai 10.) npa (no mazuļa stadijas sākuma līdz gandrīz pieaugušiem īpatņiem) un no 9. līdz 15. npa (no gandrīz pieaugušiem īpatņiem līdz pieaugušu īpatņu nonāvēšanai)); pieaugums (F1, garums un masa 9. un 15. npa); sekundārās dzimumpazīmes (F1, anālās spuras papillas 9. un 15. npa); vitelogenīns (F1, vtg iRNS vai VTG proteīns 15 npa); fenotipiskais dzimums (F1, pēc gonādu histoloģijas 15 npa); reprodukcija (F0 un F1, fekunditāte un fertilitāte 21 dienu); laiks līdz nārstam (F1) un histopatoloģija (F1, gonādu, aknu un nieru histopatoloģija 15 npa)
19. Testa derīguma kritēriji	Izšķīdušais skābeklis ≥ 60 % no gaisa piesātinājuma vērtības; vidējā ūdens temperatūra visā testa laikā 24–26 °C; kontrolē(-s) veiksmīgi reproducējas ≥ 65 % mātīšu; vidējā dienas fekunditāte kontrolē(-s) ir ≥ 20 ikri; kontrolēs(vidēji) ≥ 80 % šķilstība (gan paaudzē F1, gan F2); kontrolēs izdzīvotība no izšķilšanās līdz 3. npa — ≥ 80 % (vidēji) un no 3. npa līdz paaudzes īpatņu nonāvēšanai — ≥ 90 % (vidēji) (F1), testējamās ķīmikālijas koncentrācijas šķīdumā apmierinoši uzturētas ± 20 % diapazonā ap vidējām izmērītajām vērtībām.

4. papildinājums

NORĀDĪJUMI PAR TIPISKĀM KONTROLES VĒRTĪBĀM

Jāpiezīmē, ka šo kontroles vērtību pamatā ir ierobežots skaits validācijas pētījumu, un, pieredzei augot, tās var būt jāgroza.

Pieaugums

Visām zivīm, ko paraugo 9. (vai 10.) un 15. nedēļā pēc apaugļošanas (npa), izmēra masu un garumu. Ja ievēro šo protokolu, paredzamā slapjmasa 9. npa ir 85–145 mg tēviņiem un 95–150 mg mātītēm. Paredzamā masa 15. npa ir 250–330 mg tēviņiem un 280–350 mg mātītēm. Lai gan atsevišķu zivju rādītāji var no šiem diapazoniem būtiski novirzīties, ja vidējā kontroles īpatņu masa no tiem būtiski novirzās, it sevišķi tad, ja tā ir mazāka, ir pamats domāt, ka ir problēmas ar barošanu, temperatūras regulēšanu, ūdens kvalitāti, slimībām vai kādu šo faktoru kombināciju.

Šķīstība

Veiksmīga šķīstība kontrolēs parasti ir ap 90 %, tomēr neparasti nav pat tik zemi rādītāji kā 80 %. Ja šķīstība ir zem 75 %, iespējams, ikri attīstības stadijā nav pietiekami kustināti vai nav pienācīgi aprūpēti, piem., nav laikus novākti nedzīvie ikri, līdz ar to sākusies sēnīšu infestācija.

Izdzīvotība

Izdzīvotības rādītāji līdz 3. npa un pēc 3. npa kontrolēs parasti ir vismaz 90 %, bet satraukumam nav pamata arī tad, ja izdzīvotība agrīnajās dzīves cikla stadijās kontrolēs ir pat tikai 80 %. Bažas raisa izdzīvotības rādītāja noslīdēšana zem 80 % (kontrolēs), kas var liecināt, ka akvārijs netiek pietiekami tīrīts, līdz ar to zivju kāpuri mirst no slimībām vai skābekļa trūkuma zema izšķīdušā skābekļa līmeņa dēļ. Nāves cēloņi var būt arī tvertnes tīrīšanas laikā radītas traumas un zivju kāpuru iekļūšana ūdens novades sistēmā.

Vitelogenīna gēns

Lai gan vitelogenīna (vtg) gēna absolūtie līmeņi, izteikti kopijās uz ng kopējās iRNS, dažādās laboratorijās var ievērojami atšķirties izmantoto procedūru vai instrumentu atšķirību dēļ, vtg līmenim kontroles mātītēs vajadzētu būt aptuveni 200 reizes lielākam nekā kontroles tēviņos. Šī attiecība bieži vien sasniedz pat 1000–2000, bet, ja tā ir zem 200, ir pamats aizdomām, ka paraugs ir kontaminēts vai ir problēmas ar izmantoto procedūru un/vai reaģentiem.

Sekundārās dzimumpazīmes

Tēviņiem normālais sekundāro dzimumpazīmju (kopējais to anālās spuras staru segmentu skaits, kam ir papillas) diapazons 9–10 npa ir 40–80 segmenti. Līdz 15. npa kontrolēs

tēviņiem šim diapazonam vajadzētu būt aptuveni 80–120, bet mātītēm — 0. Retos gadījumos dažiem tēviņiem neizskaidrojamā kārtā papillas 9. npa vēl nav attīstījušās, bet, tā kā visiem kontroles tēviņiem tās attīstās līdz 15. npa, šīs parādības cēlonis, visticamāk, ir attīstības aizkavēšanās. Ja kontrolē papillas ir novērojamas mātītēm, populācijā ir XX tēviņi.

XX tēviņi

Normālā XX tēviņu incidence kultūrā 25 °C temperatūrā ir aptuveni 4 %, un tā pieaug, temperatūrai palielinoties. XX tēviņu proporcija populācijā jātiecas minimizēt. Tā kā XX tēviņu incidencei konstatējams ģenētisks komponents un tāpēc tā ir pārmantojama, iedarbīgs līdzeklis, kā samazināt XX tēviņu incidenci populācijā, ir audzējamā krājumu monitorēšana un rūpēšanās, lai krājums netiktu pavairots ar XX tēviņiem.

Nārsts

Nārsts kontroles replikātos pirms fekunditātes novērtēšanas būtu jāmonitorē ik dienas. Nārsta pazīmes kontroles pāros var kvalitatīvi novērtēt vizuāli. Līdz 12.–14. npa nārstojušai vajadzētu būt lielākajai daļai kontroles pāru. Ja līdz šim laikam nārstojošo pāru skaits ir mazs, ir pamats bažām par zivju veselību, briedumu vai labklājību.

Fekunditāte

Veselas, labi barotas medakas 12–14 npa parasti nērš ikrus ik dienas (15 līdz 50 ikrus dienā). 16 no ieteicamajiem 24 kontroles vaislas pāriem (> 65 %) vajadzētu iznērst vairāk nekā 20 ikrus dienā uz vienu pāri, un šis rādītājs var sasniegt pat aptuveni 40 ikrus dienā. Mazāka vērtība var liecināt, ka vaislas pāri ir nenobrieduši, nepietiekami baroti vai neveseli.

Fertilitāte

Kontroles vaislas pāru auglīgo ikru proporcija parasti ir ap 90 %, un nav reti gadījumi, kad tās sasniedz vai pārsniedz 95 %. Ja kontroles ikru fertilitātes rādītājs nesasniedz 80 %, ir pamats bažām, ka dzīvnieki ir neveseli vai audzēšanas apstākļi ir neoptimāli.

5. papildinājums

BAROŠANAS REŽĪMA PIEMĒRS

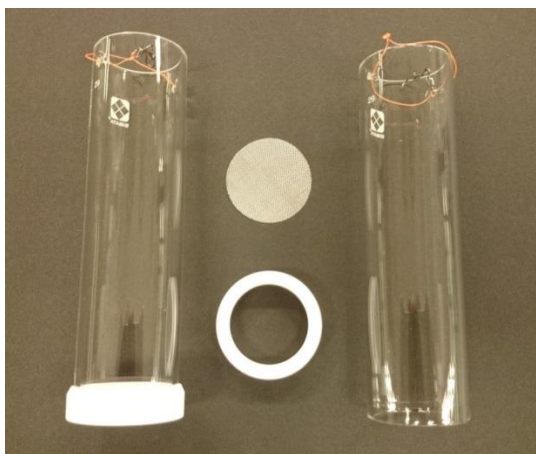
1. tabulā ir sniegts tāda barošanas režīma piemērs, kas nodrošina pietiekamu augšanu un attīstību, lai nebūtu problēmu ar reprodukciju. Novirzes no šā barošanas režīma var būt pieņemamas, bet ir ieteicams tās testēt, lai verificētu, ka novērojama pieņemama augšana un reprodukcija. Ievērojot ieteicamo barošanas režīmu, pirms testa sākšanas jānosaka sāļūdens garneļu sausmasa konkrētā biezas sāļūdens garneļu suspensijas tilpumdaudzumā. To var izdarīt, nosverot konkrētu biezas sāļūdens garneļu suspensijas tilpumdaudzumu, kas uz iepriekš nosvērtām plātnēm 24 stundas žāvēts 60 °C temperatūrā. Lai ņemtu vērā sāls daudzumu suspensijā, izžāvē un nosver identisku suspensijā izmantotā sāls šķīduma tilpumdaudzumu un to atņem no izžāvētās sāļūdens garneļu suspensijas masas. Alternatīva ir sāļūdens garneles pirms žāvēšanas izfiltrēt un noskalot ar destilētu ūdeni; tad nav vajadzības mērīt “tukšā sāls parauga” masu. Iegūto sāļūdens garneļu saussvaru pēc tabulas pārreķina biezas sāļūdens garneļu suspensijas tilpumdaudzumā, kas dodams katrai zivij. Turklāt, lai pārliecinātos, ka zivīm tiek dots pareizais sāļūdens garneļu sausmasas daudzums, biezo sāļūdens garneļu suspensiju ik nedēļas nosver.

1. tabula. Barošanas režīma piemērs

Laiks (pēc izšķilšanās)	Sālūdens garneles (mg sausasmasas uz zivi dienā)
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. diena	5,6
4. nedēļa	7,7
5. nedēļa	9,0
6. nedēļa	11,0
7. nedēļa	13,5
8. nedēļa (nonāvēšana)	22,5

6. papildinājums**IKRU INKUBĀCIJAS KAMERU PARAUGI****A piemērs**

Šis inkubators sastāv no transversāli sadalītas stikla centrifūgas mēģenes, ko savieno nerūsošā tērauda manšete un vietā notur uzskrūvējamais centrifūgas vāciņš. Cauri vāciņam iet neliels stikla vai nerūsošā tērauda stobriņš, kuru novieto netālu no mēģenes apaļā dibena un pa kuru viegli laiž gaisa burbulīšus, lai ikrus suspendētu un mazinātu risku, ka starp tiem izplatīsies saprofitiskas sēnīšinfekcijas, reizē atvieglojot ķīmikāliju apmaiņu starp inkubatoru un tvertni, kurā tas atrodas.

B piemērs

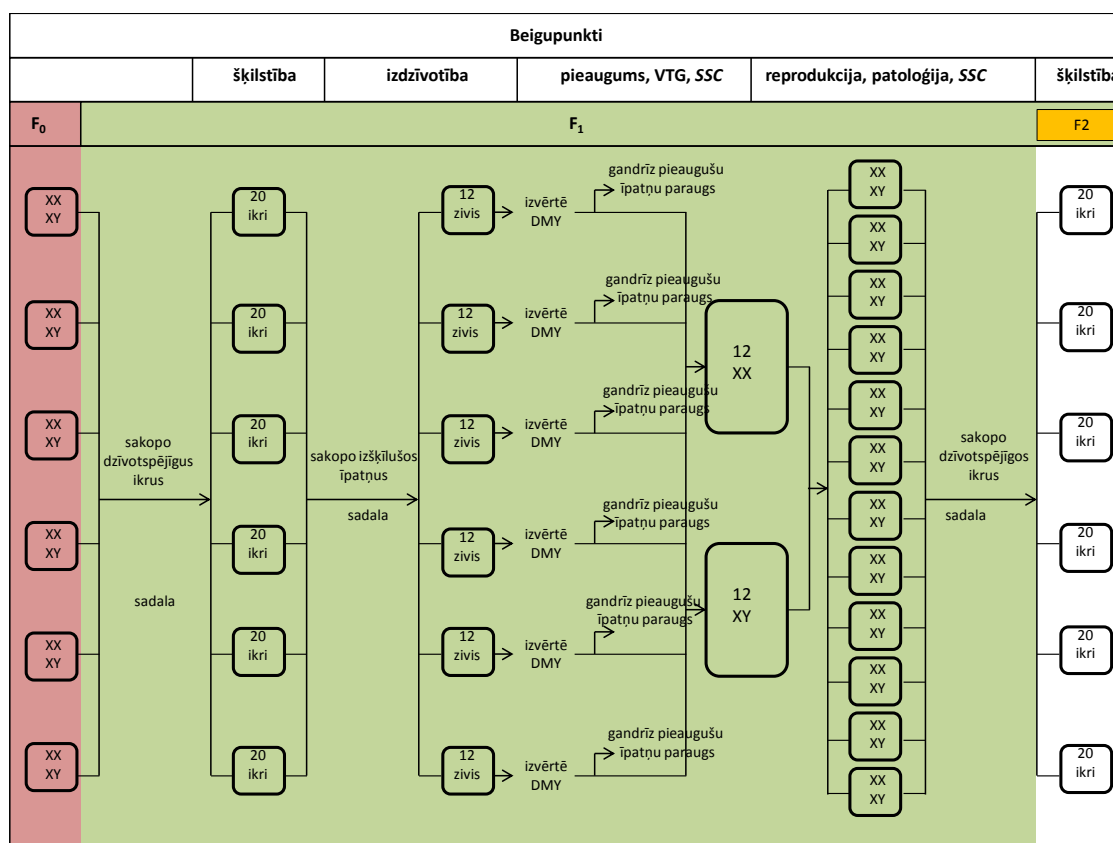


Šis inkubators sastāv no cilindriskā stikla stobriņa (diametrs: 5 cm, garums: 10 cm) un nerūsošā tērauda stieples sieta (0, 25 ϕ un 32 meši), kas piestiprināts stobriņa apakšai ar PTFE gredzenu. Inkubatorus tvertnēs iekar no paceļama stieņa un vertikāli krata (aptuveni 5 cm amplitūdā) medakas ikriem piemērotā ciklā (aptuveni reizi 4 sekundēs).

7. papildinājums

REPLIKĀTU SAKOPOŠANAS UN SADALĪŠANAS SHĒMA TESTĒŠANAS METODEI *MEOGRT*

1. attēls. Replikātu sakopšana un sadalīšana testā *MEOGRT*. Attēlā redzama viena apstrāde vai puse no kontroles. Sakopšanas dēļ replikātu identitāte visā testā nav vienāda. Jāņem vērā, ka jēdziens “ikri” attiecas uz dzīvotspējīgiem apaugļotiem ikriem (kas ekvivalenti embrijiem).



Apstrādes un replikācija

Testēšanas metodē ieteicams izmantot piecas apstrādes uz testējamo ķīmikāliju (izmantojot tehniskās tīrības pakāpes materiālu) un negatīvo kontroli. Replikātu skaits uz apstrādi visā *MEOGRT* laikā nav vienāds, un replikātu skaits kontrole ir divreiz lielāks nekā jebkurā atsevišķajā apstrādē. Paaudzē F₀ katrā apstrādē ar testējamo ķīmikāliju ir seši replikāti, savukārt negatīvajā kontrolē ir 12 replikāti. Ir ļoti ieteicams neizmantot šķīdinātājus, bet, ja tos tomēr izmanto, *MEOGRT* pārskatā iekļaujams gan šķīdinātāja izmantošanas, gan šķīdinātāja izvēles pamatojums. Ja izmanto šķīdinātāju, turklāt nepieciešamas divu veidu kontroles — a) šķīdinātāja kontrole un b) negatīvā kontrole. Katrā no abām kontrolgrupām visos *MEOGRT* laika grafika punktos jābūt visiem vajadzīgajiem replikātiem. Kamēr testa organismi attīstās paaudzē F₁ (un F₂ — līdz izšķīlšanās brīdim), šī replikātu struktūra nemainās. Tomēr, kad organismi ir pieauguši un tiek sagatavoti paaudzes F₁ vaislas pāri,

reproduktīvo pāru replikātu skaitu uz apstrādi optimālā gadījumā dubulto; tāpēc katrā apstrādē ar testējamo ķīmikāliju ir līdz 12 replikātpāriem, bet kontrolgrupā — 24 replikātpāri (un šķīdinātāja kontrolē vēl 24, ja tāda vajadzīga). F1 pāru embriju izšķilšanos nosaka pēc tās pašas replikātu struktūras kā F0 pāru embriju gadījumā — sākotnēji seši replikāti uz apstrādi ar testējamo ķīmikāliju un 12 uz kontrolgrupu.

8. papildinājums

ANĀLĀS SPURAS PAPILLU SKAITĪŠANA

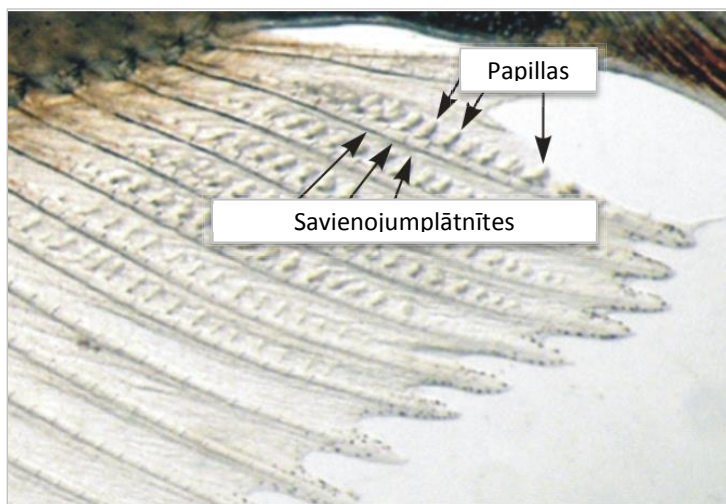
Galvenie materiāli un reaģenti

- Stereomikroskops (ar kameru vai bez tās)
- Fiksators (piem., Deividsona; izmantot Buēna šķīdumu nav ieteicams), ja skaitīšanu neveic no attēla

Procedūras

Pēc nekropsijas anālo spuru nofotografē, lai būtu ērti izskaitīt anālās spuras papillas. Lai gan ieteicamā metode ir ar fotografēšanu, ir iespējams arī anālo spuru aptuveni 1 minūti fiksēt ar Deividsona fiksatoru vai citu piemērotu fiksatoru. Lai izskaitīt papillas būtu vieglāk, ir svarīgi, lai anālā spura fiksācijas laikā būtu izstiepta plakana. Ķermeni ar anālo spuru var Deividsona fiksatorā vai citā piemērotā fiksatorā turēt līdz analīzei. Izskaita, cik savienojumplātnītēm (sk. **1. attēlu**) ir papillas, kas iznāk no savienojumplātnītes aizmugurējās malas.

1. attēls. Anālās spuras papillas



9. papildinājums

DETALIZĒTS *MEOGRT* LAIKA GRAFIKS

1.–3. testa nedēļa (F0)

Nārstojošas paaudzes F0 zivis, kas atbilst atlases kritērijiem (sk. 16.–20. punktu) trīs nedēļas eksponē testējamajai ķīmikālijai, lai attīstības laikā būtu eksponētas gametas un gonādu audi. Katrā replikāttvertnē tur vienu vaislas pāri (kurā ir viena XX mātīte un viens XY tēviņš). Iznērstos ikrus savāc, saskaita un 21 dienu (no 1. testa dienas) novērtē to fertilitāti.

4. testa nedēļa (F0 un F1)

Ir vēlami apaugļotus dzīvotspējīgus ikrus (embrijus) savākt vienā dienā; tomēr, ja embriju nav pietiekami daudz, tos var savākt divās dienās. Ja tos savāc divās dienās, visus apstrāžu embrijus, kas savākti pirmajā dienā, sakopo ar tiem, ko savāc otrajā dienā. Tad visus katrai apstrādei sakopotos embrijus pēc nejaušības principa sadala pa replikātinkubatoriem (20 embriji uz inkubatoru). Ik dienas pārbauda un reģistrē apaugļoto ikru (embriju) mirstību. No inkubatoriem izņem nedzīvus ikrus (par to, ka apaugļoti ikri ir nedzīvi, jo īpaši agrīnās stadijās, var liecināt izteikts caurspīdības zudums un krāsas maiņa, ko rada olbaltumvielu koagulācija un/vai izgulsnēšanās, kā dēļ tie kļūst balti un necaurredzami; *OECD* (210).

Piezīme. Ja kaut vienai apstrādei ikri jāvēc arī otrā dienā, tāpat jārikojas ar visām apstrādēm (arī kontrolēm). Ja pēc otrās ievākšanas dienas embriju skaits kādā apstrādē nav pietiekams 20 embrijiem uz inkubatoru, konkrētās apstrādes embriju skaitu samazina līdz 15 embrijiem uz inkubatoru. Ja nav arī 15 embriju uz inkubatoru, replikātinkubatoru skaitu samazina tiktāl, ka embriju pietiek 15 embrijiem uz inkubatoru. Vēl ir iespējams paaudzē F0 apstrādei un kontrolēm ņemt vairāk vaislas pāru, lai iegūtu vairāk ikru un varētu sasniegt ieteicamos 20 ikrus uz replikātu.

24. testa dienā paaudzes F0 vaislas pārus humāni nonāvē un reģistrē to masu un garumu. Vajadzības gadījumā F0 vaislas pārus var turēt vēl 1–2 dienas, lai paaudzi F1 varētu iegūt vēlreiz.

5.–6. testa nedēļa (F1)

Lai veicinātu izšķilšanos, inkubatoros esošo ikru kustināšanu vienu līdz divas dienas pirms gaidāmās izšķilšanās izbeidz vai samazina. Katru dienu jaunizšķīlušos mazuļus sakopo pēc apstrādes un sistemātiski sadala pa konkrētās apstrādes mazuļu replikāttvertnēm, kur nav vairāk kā 12 izšķīlušos mazuļu. To dara šādi: pēc nejaušības principa izvēlas jaunizšķīlušos mazuļus un tos nešķirojot pēc kārtas liek konkrētās apstrādes replikātos, līdz visos apstrādes replikātos ir 12 jaunizšķīlušies mazuļi. Ja mazuļu nav pietiekami daudz visu replikātu aizpildīšanai, cenšas panākt, lai pēc iespējas daudzākos replikātos būtu 12 mazuļi F1 fāzes sākšanai.

Ikrus, kas kontrolē nav izšķīlušies līdz divkārtotai medianālajai dienai, uzskata par

dzīvotnespējīgiem un atmet. Katra replikāta jaunizšķīlušos mazuļu skaitu reģistrē un aprēķina šķīlstību.

7.–11. testa nedēļa (F1)

Visos replikātos ik dienas pārbauda un reģistrē zivju kāpuru izdzīvotību. 43. testa dienā reģistrē izdzīvojušo zivju skaitu katrā replikātā, kā arī replikātā sākotnēji ievietoto jaunizšķīlušos mazuļu skaitu (nomināli divpadsmit). Tā var aprēķināt, cik procenti dzīvnieku pēc izšķīlšanās sasniedz gandrīz pieaugušu īpatņu stadiju.

Testa nedēļa (F1)

78.–85. testa dienā no katras zivs astes spuras paņem nelielu paraugu, lai noteiktu konkrētā īpatņa genotipisko dzimumu (t. i., veic spuru paraugošanu). Izmantojot šo informāciju, izveido vaislas pārus.

Trīs dienu laikā pēc katras zivs genotipiskā dzimuma noteikšanas pēc nejaušības principa izraugās 12 vaislas pārus uz katru apstrādi un 24 pārus uz katru kontroli. No katra replikāta pēc nejaušības principa izraugās divas XX un divas XY zivis, tās sakopo pēc dzimuma un tad no to vidus pēc nejaušības principa izveido vaislas pāri (t. i., XX–XY pāri). Izveido vismaz 12 replikātus uz katru apstrādi ar ķīmikāliju un vismaz 24 replikātus kontrolei (viens vaislas pāris uz replikātu). Ja replikātā sakopšanai vai nu divu XX zivju, vai divu XY zivju nav, zivis ar attiecīgo dzimuma genotipu ņem no citiem attiecīgās apstrādes replikātiem.

Atlikušās zivis (ne vairāk kā 8 uz replikātu) humāni nonāvē un paraugo, lai noskaidrotu dažādos gandrīz pieaugušo īpatņu beigupunktus. Visu gandrīz pieaugušo īpatņu paraugu *dmy* datus (XX vai XY) saglabā, lai nodrošinātu, ka visus beigupunktu datus ir iespējams sasaistīt ar katras konkrētās zivs ģenētisko dzimumu.

13.–14. testa nedēļa (F1)

Gandrīz pieaugušo īpatņu vaislas pāriem pieaugot, ekspozīciju turpina. 98. testa dienā (t. i., dienā pirms dienas, kurā sāk ikru ievākšanu), ikrus gan izņem no akvārijiem, gan noņem no mātītēm.

15.–17. testa nedēļa (F1)

Katrā replikātā 21 dienu pēc kārtas ievāc iznērstos ikrus un novērtē to fekunditāti un fertilitāti.

18. testa nedēļa (4. testa nedēļas atkārtojums) (F1 un F2)

120. testa dienas rītā katrā replikāttvertnē ievāc ikrus. Ievāktos ikrus novērtē un tos katra vaislas pāra ikrus, kas ir apaugļoti, pēc pavedienu noņemšanas sakopo pēc apstrādes un sistemātiski sadala ikru inkubācijas kamerās (20 apaugļoti ikri uz inkubatoru). Inkubatorus var ievietot atsevišķās “inkubatorvertnēs”, ko sagatavo katrai apstrādei, vai replikāttvertnē, kurā izšķīlušies kāpuri paliks pēc izšķīlšanās. Ir vēlami embrijus savākt vienā dienā; tomēr,

ja embriju nav pietiekami daudz, tos var savākt divās dienās. Ja tos savāc divās dienās, visus apstrāžu embrijus, kas savākti pirmajā dienā, sakopo ar tiem, ko savāc otrajā dienā. Tad visus katrai apstrādei sakopotos embrijus pēc nejaušības principa sadala pa replikātinkubatoriem (20 embriji uz inkubatoru). Piezīme. Ja kaut vienai apstrādei ikri jāvēc arī otrā dienā, tāpat jāīkojas ar visām apstrādēm (arī kontrolēm). Ja pēc otrās ievākšanas dienas embriju skaits kādā apstrādē nav pietiekams 20 embrijiem uz inkubatoru, konkrētās apstrādes embriju skaitu samazina līdz 15 embrijiem uz inkubatoru. Ja nav arī 15 embriju uz inkubatoru, replikātinkubatoru skaitu samazina tiktāl, ka embriju pietiek 15 embrijiem uz inkubatoru.

121. testa dienā (vai 122. testa dienā, lai būtu drošība, ka paaudze F2 sāktā veiksmīgi) F1 vaislas pārus humāni nonāvē un analizē, lai noskaidrotu pieaugušo īpatņu beigupunktus. Vajadzības gadījumā F1 vaislas pārus var turēt vēl 1–2 dienas, lai paaudzi F2 varētu iegūt vēlreiz.

19.–20. testa nedēļa (F2)

Lai veicinātu izšķilšanos, inkubatoros esošo ikru kustināšanu vienu līdz divas dienas pirms gaidāmās izšķilšanās izbeidz vai samazina. Ja testu izbeidz, kad beidzas F2 izšķilšanās, izšķīlušos mazuļos katru dienu saskaita un atmet. (Uzskata, ka embriji, kas nav izšķīrušies pat pēc ilgākas inkubācijas, kas kontrolei ir divkāŗša medianālā izšķilšanās diena, uzskata par dzīvotnespējīgiem.)

10. papildinājums

STATISTISKĀ ANALĪZE

MEOGRT iegūtie bioloģiskie dati pēc veida nav unikāli, un līdzīgu datu (izņemot patoloģijas datus) analizēšanai ir izstrādātas daudzas piemērotas statistiskās metodes atkarībā no datu īpašībām, tostarp normalitātes, dispersiju homogenitātes, tā, vai pētījuma plāns ir piemērots hipotēzes testēšanai vai regresijas analīzei, parametriskajiem vai neparametriskajiem testiem utt. Ieteicamās statistiskās analīzes principā atbilst ESAO ieteikumiem attiecībā uz ekotoksiskuma datiem (*OECD* 2006) un *MEOGRT* datu analīzes lēmumu pieņemšanas plūsmas diagramma ir sniegta 2. attēlā.

Tiek pieņemts, ka visbiežāk datu kopu uzrādītās atbildreakcijas būs monotonas. Turklāt jāapdomā, vai izmantot vienus vai abus statistisko testu. Ja vien nav kāda bioloģiska pamata domāt, ka viens tests būtu nepiemērots, ieteicams izvēlēties vienus testu. Lai gan nākamajā sadaļā ieteikti konkrēti statistiskie testi, tomēr, ja konkrēto *MEOGRT* iegūto datu apstrādei tiek izstrādātas piemērotākas un/vai jaudīgākas statistiskās metodes, tad, lai šīs priekšrocības izmantotu pilnvērtīgi, izmanto attiecīgos statistiskos testus.

MEOGRT dati jāanalizē par katru genotipisko dzimumu atsevišķi. Ir divas stratēģijas, kā analizēt datus par zivīm ar invertētu dzimumu (XX tēviņiem vai XY mātītēm): 1) visus datus par dzimuminvertētām zivīm visā testā cenžēt, izņemot datus par dzimuminversijas prevalenci katrā replikātā; 2) visus datus par visām dzimuminvertētajām zivīm datu kopā paturēt un analizēt pēc genotipa.

Histopatoloģiskie dati

Histopatoloģiskos datus pārskatā norāda smaguma atzīmju formā, un to izvērtē ar jaunizstrādātu statistisko procedūru — *Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS)*, (*Green et al.*, 2014). Rao-Skota korekcija ļauj saglabāt informāciju par replikāciju; procedūra *by Slices* ietver bioloģisko ekspektāciju, ka smaguma atzīmes palielināsies, pieaugot apstrādes koncentrācijām. *RSCABS* rezultāti norāda, kurām apstrādēm katras diagnozes gadījumā ir lielāka patoloģiju prevalence nekā kontrolēm un kāds ir asociētais smaguma līmenis.

Dati par fekunditāti

Fekunditātes datus analizē, izmantojot descendentu Džonkhīra–Terpstras vai Viljamsa testu, kurā nosaka apstrādes efektus, ar nosacījumu, ka dati liecina par monotonu atbildreakciju uz koncentrāciju. Izmantojot descendentu testu, visus salīdzinājumus izdara nozīmības līmenī 0,05 bez korekcijām pēc veikto salīdzinājumu skaita. Paredzams, ka dati atbildīs monotonai atbildei uz koncentrāciju, bet par to var pārliecināties, vai nu datus apskatot, vai izveidojot apstrāžu vidējo vērtību lineāros un kvadrātiskos kontrastus pēc datu hierarhizēšanas. Ja vien nav tā, ka kvadrātiskais kontrasts ir nozīmīgs, bet lineārais — nenozīmīgs, veic trenda testu. Pretējā gadījumā, ja dati ir sadalīti normāli un dispersijas ir

homogēnas, apstrāžu efektus nosaka ar Daneta testu. Ja šīs prasības nav izpildītas, izmanto Dannas testu ar Bonferroni–Holma [*Bonferroni–Holm*] korekciju. Visus norādītos testus veic neatkarīgi no vispārīga F vai Kraskela–Volisa [*Kruskal-Wallis*] testa. Sīkāku informāciju sk. *OECD* 2006.

Ja tam ir statistisks pamatojums, var izmantot alternatīvas metodes, piem., vispārinātu lineāru modeli ar Puasona kļūdām attiecībā uz ikru skaitīšanu (bez transformācijas) (*Cameron and Trividi*, 2013). Ja izmanto alternatīvu pieeju, ieteicams lūgt statistikas speciālista padomu.

Dienas ikru skaitīšana vienas paaudzes ietvaros

ANOVA modeli iegūst ar $Y = \text{laiks} * \text{laiks} + \text{apstrāde} + \text{apstrāde} * \text{laiks} + \text{apstrāde} * \text{laiks} * \text{apstrāde}$ ar nejaušajiem efektiem, kuri ir replikāts(paaudze*apstrāde) un laiks*replikāts(apstrāde), kas pieļauj vairākām paaudzēm abu tipu nevienādās dispersijas elementus. Šeit “laiks” apzīmē ikru skaitīšanas biežumu (piem., dienu vai nedēļu). Tā ir atkārtotu mērījumu analīze: atkārtotos mērījumus veido korelācijas starp vienu un to pašu replikātu novērojumiem.

Apstrādes galvenos efektus testē ar Daneta (vai Daneta–Sjui) testu, kurā veic korekcijas pēc salīdzinājumu skaita. Ir vajadzīgas korekcijas attiecībā uz galveno efektu “paaudze” vai “laiks”, jo šo divu efektu gadījumā “kontroles” līmeņa nav un potenciāli interesanti var būt salīdzināt katru līmeņu pāri. Šo divu galveno efektu gadījumā, ja F tests attiecībā uz galveno efektu ir nozīmīgs līmenī 0,05, šā faktora līmeņu pārveida salīdzinājumus var testēt līmenī 0,05 bez tālākām korekcijām.

Modelis ietver divu un triju faktoru mijiedarbību tā, ka galvenais efekts attiecībā uz laiku var nebūt nozīmīgs, lai gan laikam ir ievērojama ietekme uz rezultātiem. Tā, ja divu vai trīs faktoru mijiedarbība, kurā iesaistīts laiks, ir nozīmīga līmenī 0,05, laika līmeņu salīdzinājumus nozīmības līmenī 0,05 var pieņemt bez tālākām korekcijām.

Tad seko F testi, kuros noskaidro apstrādes nozīmību laikā, — tā sauktie *ANOVA* tabulas “griezumi” [*slices*]. Piemēram, ja griezums, kas atbilst paaudzes F1 apstrādei un laikam 12, ir nozīmīgs līmenī 0,05, tad pārveida salīdzinājumus attiecībā uz F1 apstrādi un laiku 12 var pieņemt līmenī 0,05 bez tālākām korekcijām. Tas pats attiecas uz testiem attiecībā uz laiku paaudzes F1 un apstrādes kontekstā un paaudzi konkrēta laika un apstrādes kontekstā.

Visbeidzot, ja salīdzinājums neietilpst nevienā no minētajām kategorijām, salīdzinājumi jākorrigē atbilstoši p vērtībām, izmantojot Bonferroni–Holma korekciju. Plašāka informācija par šādu modeļu analīzi atrodama *Hocking* (1985) un *Hochberg and Tamhane* (1987).

Vēl viena iespēja ir reģistrēt jēldatus un tos pētījuma pārskatā norādīt kā katras dienas fekunditāti (ikru skaits) uz replikātu. Pēc jēldatiem aprēķina katra replikāta vidējo vērtību un tai veic kvadrātsaknes transformāciju. Transformētajām replikātu vidējām vērtībām piemēro vienvirziena *ANOVA*, bet pēc tam Daneta kontrastus. Var būt lietderīgi katras apstrādes un/vai replikāta fekunditātes datus apskatīt arī vizuāli, izmantojot izkliedes diagrammu, kas ilustrē datus attiecībā pret laiku. Tā var neformāli novērtēt iespējamus efektus laikā.

Visi citi bioloģiskie dati

Visu statistisko analīžu pamatā ir pieņēmums, ka, ja devas izraudzītas pienācīgi, dati būs monotoni. Tātad tiek pieņemts, ka dati ir monotoni, un to monotonitāti formāli izvērtē ar lineāriem un kvadrātiskiem kontrastiem. Ja dati ir monotoni, ieteicams izmantot Džonkhīra–Terpstras replikātu mediānu trenda testu (*OECD* 2006 ieteikums). Ja kvadrātiskais kontrasts ir nozīmīgs, bet lineārais — nenožīmīgs, dati uzskatāmi par nemonotoniem.

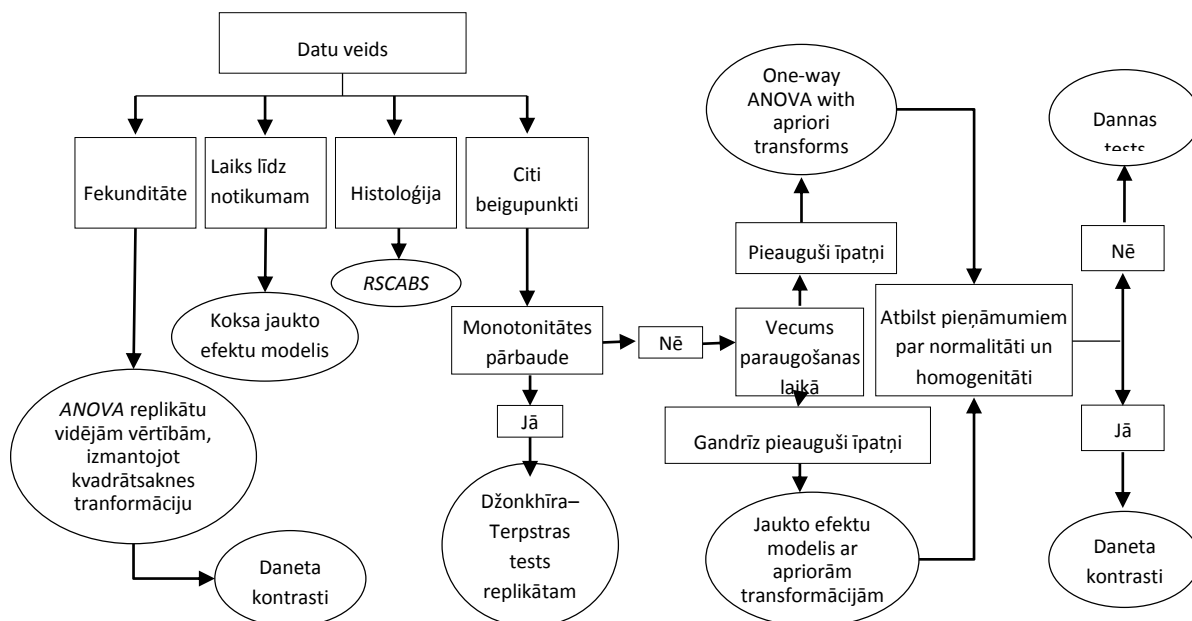
Ja dati ir nemonotoni, it sevišķi tāpēc, ka atbildreakcija uz vienu vai divām augstāko līmeņu apstrādēm ir mazāka, jāapsver iespēja datu kopu cenzēt, proti, to analizēt, šīs apstrādes neņemot vērā. Šis lēmums būs jāpieņem, profesionāli izvērtējot visus pieejamos datus, it sevišķi datus, kas liecina par acīmredzamu toksicitāti šajos apstrādes līmeņos.

Nav ieteicams transformēt garuma un masas datus, lai gan tas dažkārt var būt nepieciešams. Savukārt attiecībā uz vitelogenīna datiem ieteicama logaritmiska transformācija, attiecībā uz SDzP datiem (anālās spuras papillas) — kvadrātsaknes transformācija; attiecībā uz datiem par šķīstības rādītāju, izdzīvotības procentuālo daļu, dzimumu attiecību un auglīgo ikrū procentuālo daļu — arksinusa–kvadrātsaknes transformācija. Laiks līdz izšķilšanās brīdim un laiks līdz pirmajam nārstam jāuztver kā dati par laiku līdz notikumam, un atsevišķu embriju neizšķilšanās konkrētajā periodā vai replikātu nenārstošana jāuztver kā labēji cenzēti dati. Laiks līdz izšķilšanās brīdim jāaprēķina no katra replikāta medianālās izšķilšanās dienas. Šos beigupunktus aprēķina, izmantojot Koksa proporcionālo apdraudējumu modeli jauktiem efektiem.

Bioloģiskajos datos par pieaugušo īpatņu paraugiem ir viens mērījums uz replikātu, proti, katrā replikātakvārijā ir viena XX zivs un viena XY zivs. Tāpēc ieteicams replikātu vidējām vērtībām piemērot vienvirziena *ANOVA*. Ja ir spēkā *ANOVA* pieņēmumi (normalitāte un dispersijas homogenitāte, kas *ANOVA* atlikumos novērtēta attiecīgi ar Šapiro–Vilka [*Shapiro–Wilk*] testu un Levīna [*Levene*] testu), lai noteikt apstrādes, kas atšķiras no kontroles, izmanto Daneta kontrastus. Savukārt, ja *ANOVA* pieņēmumi nav spēkā, tad, lai noteiktu, kuras apstrādes atšķiras no kontroles, izmanto Dannas testu. Līdzīgu procedūru teicams izmantot attiecībā uz datiem procentuālo daļu formā (fertilitāte, šķīstība un izdzīvotība).

Bioloģiskajos datos par gandrīz pieaugušo īpatņu paraugiem ir 1 līdz 8 mērījumi uz replikātu, proti, genotipiskā dzimuma vidējo vērtību replikātā var veidot dažāds īpatņu skaits. Tāpēc ir ieteicams izmantot *ANOVA* modeli jauktiem efektiem, bet pēc tam Daneta kontrastus, ja spēkā normalitātes un dispersijas homogenitātes pieņēmumi (attiecībā uz jaukto efektu *ANOVA* atlikumiem). Ja pieņēmumi nav spēkā, tad, lai noteiktu, kuras apstrādes atšķiras no kontroles, izmanto Dannas testu.

2. attēls. Plūsmas diagramma ar *MEOGRT* datu analīzei ieteicamajām statistiskajām procedūrām.



Literatūra

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

C.53. ABINIEKU KĀPURU AUGŠANAS UN ATTĪSTĪBAS TESTS (*LAGDA*)

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai Nr. 241 (2015). Vajadzībai izstrādāt un validēt testu, ar kuru iespējams konstatēt un raksturot, kādas nelabvēlīgas sekas rada abinieku ekspozīcija toksiskām ķīmikālijām, pamatā ir bažas, ka ķīmikāliju līmeņi vidē var atstāt nelabvēlīgu ietekmi gan uz cilvēku, gan citu dzīvo dabu. ESAO testēšanas vadlīnijā “Abinieku kāpuru augšanas un attīstības tests (*LAGDA*)” aprakstīts toksiskuma tests, kurā izmanto tādas sugas abiniekus, kas ļauj ņemt vērā augšanu un attīstību no apaugļošanas līdz agrīnajai mazuļa stadijai. Šajā testā (kura garums parasti ir 16 nedēļas) tiek novērtēta agrīnā attīstība, metamorfoze, izdzīvotība, pieaugums un daļēja reproduktīvās sistēmas nobriešana. Ar to var novērtēt arī dažādus citus beigupunktus, kas dod iespēju diagnostiski izvērtēt domājamās endokrīni disruptīvas ķīmikālijas (EDK) vai citu veidu ontogēnētiskos un reproduktīvos toksikantus. Šajā testēšanas metodē aprakstītās metodes pamatā ir validācijas darbs, ko ar Āfrikas piešvardi (*Xenopus laevis*) veikusi ASV Vides aizsardzības aģentūra (ASV VAA), un palīgdarbs Japānā (1). Lai gan augšanas un attīstības testēšanas protokolam varētu izmantot arī citu sugu abiniekus (svarīgs priekšnoteikums ir spēja noteikt ģenētisko dzimumu), konkrētās metodes un novērojami beigupunkti, kas izklāstīti šajā testēšanas metodē, attiecas tikai uz *Xenopus laevis*.
2. *LAGDA* ir augstākas pakāpes abinieku tests, kas ļauj iegūt pilnīgāku koncentrācijas–atbildreakcijas informāciju par nelabvēlīgo ietekmi un tāpēc ir piemērots apdraudējumu apzināšanai un raksturošanai un ekoloģisko risku novērtēšanai. Tests atbilst ESAO endokrīno disruptoru testēšanas un novērtēšanas konceptuālā satvara 4. līmenim, kurā ietilpst *in vivo* testi, kas nodrošina arī datus par nelabvēlīgo ietekmi uz endokrīni relevantiem beigupunktiem (2). Vispārējais eksperimenta plāns paredz *X. laevis* embrijus, kas ir 8.–10. stadijā pēc Nivkopa un Fabera [*Nieuwkoop and Faber* (NF)] (3), eksponēt testējamajai ķīmikālijai ne mazāk kā četrās dažādās koncentrācijās (parasti vismaz puslogaritmiskos intervālos), izmantojot arī vienu vai vairākas kontroles, līdz pagājušas 10 nedēļas pēc medianālā laika līdz 62. NF stadijai kontrolē, ar vienu starpposma apakšparaugu 62. NF stadijā (≤ 45 dienas pēc apaugļošanas, parasti aptuveni 45 dienas (dpa)). Katrai testējamajai koncentrācijai izmanto četrus replikātus, bet kontrolei astoņus replikātus. Ekspozīcijas gaitā izvērtētie beigupunkti (starpposma apakšparaugā un galīgajā paraugā, kad tests noslēdzas) ietver beigupunktus, kas liecina par vispārēju toksicitāti, — mirstība, anormāla uzvedība un pieaugums (garums un masa) —, kā arī beigupunktus, kuru mērķis ir raksturot specifiskus endokrīno toksicitāti izraisošus iedarbības veidus, kas vērsti uz estrogēna, androgēna vai vairogdziedzera mediātiem fizioloģiskajiem procesiem. Šajā metodē galvenais uzsvars likts uz iespējamu populācijas līmenī relevantu ietekmi (proti,

nelabvēlīgu ietekmi uz izdzīvotību, attīstību, augšanu un reproduktīvo attīstību), lai varētu aprēķināt nenovērojamas ietekmes koncentrāciju (*NOEC*) vai efektīvo koncentrāciju, kas mērāmajā beigupunktā rada $x\%$ izmaiņu (*EC_x*). Tomēr jāatzīmē, ka uz *EC_x* balstītas pieejas reti ir piemērotas šādiem lieliem pētījumiem, kuros palielināt testējamo koncentrāciju skaitu, lai varētu noteikt vajadzīgo *EC_x*, var būt nepraktiski. Tāpat jāatzīmē, ka metode neattiecas uz pašu reproduktīvo posmu. Šajā testēšanas metodē izmantotās definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

3. Tā kā testētas salīdzinoši nedaudzas ķīmikālijas un šā visai sarežģītā testa validēšanā iesaistījušās salīdzinoši nedaudzas laboratorijas, turklāt eksperimentu datus līdz šim nav dokumentēta interlaboratoriskā reproducējamība, ir gaidāms, ka tad, kad būs pieejami pietiekami daudzi pētījumi, lai varētu novērtēt šā jaunā pētījuma plāna ietekmi, ESAO testēšanas vadlīnija Nr. 241 tiks pārskatīta un vajadzības gadījumā grozīta, ņemot vērā gūto pieredzi. *LAGDA* ir svarīgs tests, kas ļauj novērtēt abinieku populācijas sarukumu iespējamajos cēloņus, izvērtējot ietekmi, ko rada ekspozīcija ķīmikālijām jutīgajā kāpuru stadijā, kurā ietekme uz izdzīvotību un attīstību, arī normālu reproduktīvo orgānu attīstību, var atstāt nelabvēlīgu ietekmi uz populācijām.
4. Tests ir izstrādāts tā, lai detektētu gan endokrīno, gan neendokrīno mehānismu apikālo ietekmi, un tajā ir diagnostiskie beigupunkti, kas ir daļēji specifiski svarīgām endokrīnajām modalitātēm. Jāatzīmē, ka līdz *LAGDA* izstrādei nebija neviena validēta testa, kas pildītu šo funkciju attiecībā uz abiniekiem.
5. Ir svarīgi, lai pirms testa sākšanas būtu pieejama informācija par testējamās ķīmikālijas fizikālķīmiskajām īpašībām, īpaši tālab, lai varētu iegūt stabilus ķīmikālijas šķīdumus. Svarīgi ir arī tas, lai būtu pieejama pietiekami jutīga analītiskā metode testējamās ķīmikālijas koncentrāciju verificēšanai. Lai testam dotu pietiekamu jaudu, kas ļautu izvērtēt tādus populācijas līmenī relevantus beigupunktus kā peiaugums, attīstība un reproduktīvais briedums, aptuveni 16 nedēļas ilgajā testā vajadzīgi kopā 480 dzīvnieki, t. i., *X. laevis* embriji (vai, ja izmanto šķīdinātāja kontroli, 640 embriji).
6. Pirms testēšanas metodes izmantošanas kāda maisījuma testēšanai regulatīvā nolūkā ir jāapsver, vai ar to var iegūt paredzētajam regulatīvajam nolūkam pieņemamus rezultātus. Turklāt šajā testā netiek tieši izvērtēta fekunditāte, tāpēc tas ESAO testēšanas un novērtēšanas konceptuālajā satvarā var nebūt piemērots lietošanai tālākā līmenī par 4.

TESTĒŠANAS METODES ZINĀTNISKAIS PAMATS

7. Mūsu pašreizējā izpratne par abinieku bioloģiju lielā mērā veidojusies, izmantojot laboratorijas paraugsugas *X. laevis* dzīvniekus. Šīs sugas dzīvniekus ir viegli audzēt laboratorijā, to ovulāciju var izraisīt ar cilvēka horionisko gonadotropīnu (*hCG*), un šo dzīvnieku krājumi ir plaši pieejami no komercaudzētājiem.
8. Abinieku, tāpat kā visu citu mugurkaulnieku, reprodukcija norit hipotalāma, hipofīzes un gonādu (HHG) ass kontrolē (4). Šīs endokrīnās sistēmas mediatori ir estrogēni un androgēni, kas nosaka dzimumdimorfo audu attīstību un fizioloģiju. Abinieku dzīves ciklā ir trīs stadijas, kad šī ass ir sevišķi aktīva: 1) gonādu diferenciācija kāpuru attīstības laikā, 2) sekundāro dzimumpazīmju attīstība un gonādu nobriešana mazuļu stadijā un 3) pieaugušo īpatņu funkcionāla reprodukcija. Ir pamats domāt, ka noteiktas ķīmikālijas, piem., estrogēni un androgēni, katrā no šīm attīstības stadijām var izraisīt endokrīnus traucējumus, kuru ietekmē eventuāli mazinās organismu reproduktīvā spēja.
9. Gonādu attīstība sākas 43. NF stadijā, kad attīstās bipotenciālā ģenitālā kore. Gonādu diferenciācija sākas 52. NF stadijā, kad sākotnējās dīgļšūnas vai nu migrē uz medulārajiem audiem (tēviņi), vai paliek attīstošos gonādu kortikālajā reģionā (mātītes) (3). Pirmās ziņas, ka šīs gonādu dzimumdiferenciācijas process ir uzņēmīgs pret ķīmiskām izmaiņām *Xenopus*, parādījās XX gs. 50. gados (5) (6). Ja kurkuļi šajā gonādu diferenciācijas periodā tiek eksponēti estradiolam, tēviņi dzimuminvertējas, proti, izaug par pilnīgi funkcionālām mātītēm (7) (8). Ir iespējama arī mātīšu funkcionāla dzimuminvertēšanās par tēviņiem, par ko ziņots pēc sēklinieku audu implantācijas kurkuļos (9). Taču, lai gan funkcionālu dzimuminversiju *X. tropicalis* izraisa arī ekspozīcija aromatāzes inhibitoram (10), tas nav konstatēts ar *X. laevis*. Vēsturiski toksikantu ietekme uz gonādu diferenciāciju tika novērtēta, gonādas histoloģiski izmeklējot metamorfozes laikā, un dzimuminversiju varēja noteikt, tikai analizējot dzimumu attiecību. Vēl nesen tieši noteikt *Xenopus* ģenētisko dzimumu nebija iespējams. Tomēr nesen atklāti ar dzimumu saistīti *X. laevis* marķieri, kas dod iespēju noteikt ģenētisko dzimumu un dzimuminvertētos dzīvniekus identificēt tiešā veidā (11).
10. Attīstoties jaunajiem tēviņiem, asinīs palielinās testosterona līmenis, kas atbilst sekundāro dzimumpazīmju attīstībai, kā arī sēklinieku attīstībai. Attīstoties mātītēm, olnīcās rodas estradiols, kā ietekmē plazmā parādās vitelogenīns (VTG) un olnīcā — vitelogenīniski oocīti un attīstās olvadi (12). Olvadi ir mātīšu sekundārā dzimumpazīme, kas ietekmē oocītu nobriešanu reprodukcijas laikā. Oocītiem virzoties caur olvadu, tie pārklājas ar gļotainu apvalku un, gatavi apaugļošanai, sakrājas ikru maisā. Tā kā olvadu attīstība *X. laevis* (13) un *X. tropicalis* (12) korelē ar estradiola līmeni asinīs, to, šķiet, regulē estrogēni. Ir saņemtas ziņas, ka pēc ekspozīcijas polihlorbifeniliem (14) un 4-*terc*-oktilfenolam (15) olvadi attīstījušies arī tēviņiem.

TESTA PRINCIPS

11. Testa plāns paredz *X. laevis* embrijus, kas ir 8.–10. NF stadijā, ūdens ceļā eksponēt testējamajai ķīmikālijai četrās dažādās koncentrācijās, izmantojot arī vienu vai vairākas kontroles, līdz pagājušas 10 nedēļas pēc medianālā laika līdz 62. NF stadijai kontrolē, ar vienu starpposma apakšparaugu 62. NF stadijā. Lai gan var būt iespējams ar barību dot arī ļoti hidrofobisku ķīmikāliju devas, līdz šim šajā testā pieredze ar šo ekspozīcijas ceļu ir maza. Katrai testējamajai koncentrācijai izmanto četrus replikātus, bet katrai kontrolei astoņus replikātus. Ekspozīcijas laikā izvērtē beigupunktus, kas liecina par vispārēju toksicitāti (t. i., mirstība, anormāla uzvedība un pieaugums (garums un masa)), kā arī beigupunktus, kuru mērķis ir raksturot specifiskus endokrīno toksicitāti izraisošus iedarbības veidus, kas vērsti uz estrogēna, androgēna vai vairogdziedzeru mediātiem fizioloģiskajiem procesiem (t. i., vairogdziedzeru histopatoloģija, gonādu un gonādu vadu histopatoloģija, anormāla attīstība, vitelogenīns plazmā (pēc izvēles) un genotipisko/fenotipisko dzimumu attiecības).

TESTA DERĪGUMA KRITĒRIJI

12. Piemērojami šādi testa derīguma kritēriji:

- izšķīdušā skābekļa koncentrācijai visā testa laikā jābūt $\geq 40 \%$ no gaisa piesātinājuma vērtības;
- ūdens temperatūrai jābūt $21 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ diapazonā, un atšķirībām starp replikātiem un apstrādēm nevajadzētu pārsniegt $1,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$;
- testa šķīduma pH jāuztur no 6,5 līdz 8,5, un atšķirībām starp replikātiem un apstrādēm nevajadzētu pārsniegt 0,5;
- jābūt pieejamām liecībām, ka testējamās ķīmikālijas koncentrācija šķīdumā ir apmierinoši uzturēta $\pm 20 \%$ diapazonā ap vidējām izmēritajām vērtībām;
- kontrolēs mirstībai katrā replikātā ekspozīcijas periodā vajadzētu būt $\leq 20 \%$;
- dzīvotspējai nārstā, ar kuru izvēlas sākt pētījumu, vajadzētu būt $\geq 70 \%$;
- medianālajam laikam līdz 62. NF stadijai kontrolēs vajadzētu būt ≤ 45 dienām;
- kontrolēs un testa kontrolēs (ja tādas izmanto) testa organismu vidējai masai 62. NF stadijā un testa beigās vajadzētu sasniegt attiecīgi $1,0 \pm 0,2$ un $11,5 \pm 3 \text{ g}$.

13. Lai gan tas nav derīguma kritērijs, ir ieteicams, lai analīzei būtu pieejamas vismaz trīs līmeņu apstrādes ar trim nekompromitētiem replikātiem. Pārmērīga mirstība, kas apstrādi kompromitē, ir > 4 tādi nāves gadījumi ($> 20 \%$) 2 vai vairāk replikātos, ko nevar izskaidrot ar tehnisku kļūdu. Analīzei vajadzētu būt pieejamām vismaz divu līmeņu

apstrādēm bez acīmredzamas toksicitātes. Acīmredzamas toksicitātes pazīmes ir, piemēram (bet ne tikai), pacelšanās ūdens virspusē, gulēšana tvertnes dibenā, peldēšana ar vēderu uz augšu vai haotiska peldēšana, neuzniršana un nereaģēšana uz stimuliem, morfoloģiskas anormālijas (piem., deformētas ekstremitātes), hemorāģiski bojājumi un vēdera uzpūšanās.

14. Ja novērojamas novirzes no testa derīguma kritērijiem, sekas jāaplūko kopsakarā ar testa rezultātu ticamību un šīs novirzes un apsvērumi jāatspoguļo testēšanas pārskatā.

METOŽU APRAKSTS

Aprīkojums

15. Parastais laboratorijas aprīkojums, jo īpaši:

- a) temperatūras regulēšanas aprīkojums (piem., sildītāji vai dzesētāji, kas noregulējami uz $21^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$);
- b) termometrs;
- c) binokulārs stereomikroskops un disekcijas instrumenti;
- d) digitālā kamera ar vismaz 4 megapikseļu izšķirtspēju un mikrorežīmu (ja nepieciešams);
- e) analītiskie svāri ar precizitāti līdz 0,001 mg vai 1 μg ;
- f) izšķīdušā skābekļa un pH mērinstrumenti;
- g) gaismas intensitātes mērītājs, kas rezultātus uzrāda luksos.

Ūdens

Izcelsme un kvalitāte

16. Atšķaidīšanai var izmantot jebkādu vietēji pieejamu ūdeni (piem., avota ūdeni vai caur ogli izfiltrētu krāna ūdeni), kurā *X. laevis* var normāli augt un attīstīties; vajadzētu būt pierādījumiem, ka dzīvnieki šajā ūdenī aug normāli. Tā kā vietējā ūdens kvalitāte dažādās vietās var būtiski atšķirties, ir jāveic ūdens kvalitātes analīzes, jo īpaši, ja nav pieejami vēsturiski dati par ūdens izmantojamību abinieku kāpuru audzēšanā. Ja zināms, ka atšķaidīšanai izmantotā ūdens kvalitāte ir relatīvi nemainīga, tad pirms testēšanas sākuma un/vai, piem., reizi sešos mēnešos jāveic smago metālu (piem., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), biežāk sastopamo anjonu un katjonu (piem., Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} , K^{+} , Cl^{-} , SO_4^{2-}), pesticīdu, kopējā organiskā oglekļa un suspendēto cietvielu mērījumi. Dažas pieņemama atšķaidīšanas ūdens ķīmiskās īpašības ir norādītas 2. papildinājumā.

Jodīda koncentrācija testēšanas ūdenī

17. Lai vairogdziedzeris varētu sintezēt tiroīdhormonus normālai metamorfozes norisei, kāpuriem ar ūdeni un uzturu jāuzņem pietiekami daudz jodīda. Empīriski iegūtu vadlīniju,

kas noteiktu minimālās jodīda koncentrācijas barībā vai uzturā pienācīgai attīstībai, pašlaik nav. Taču jodīda pieejamība var ietekmēt vairogdziedzera sistēmas spēju reaģēt uz vairogdziedzera darbību ietekmējošajām ķīmikālijām, un ir zināms, ka tā var mainīt vairogdziedzera pamataaktivitāti, tāpēc, interpretējot vairogdziedzera histopatoloģijas rezultātus, šim aspektam jāpievērš uzmanība. Līdzšinējā darbā ir pierādīts, ka tests norit veiksmīgi, ja atšķaidīšanas ūdens jodīda (I^-) koncentrācija ir diapazonā no 0,5 līdz 10 $\mu\text{g/l}$. Ideālā gadījumā minimālajai jodīda koncentrācijai atšķaidīšanas ūdenī visā testā jābūt 0,5 $\mu\text{g/l}$ (ko pievieno kā nātriju vai kālija sāli). Ja testēšanas ūdeni rekonstituē no dejonizēta ūdens, tam pievieno jodu minimālajā koncentrācijā 0,5 $\mu\text{g/l}$. Izmērītās jodīda koncentrācijas testa ūdenī (t. i., atšķaidīšanas ūdenī) un testa ūdens papildināšana ar jodu vai citiem sāļiem (ja tāda veikta) jānorāda pārskatā. Joda saturu var mērīt ne tikai testa ūdenī, bet arī barībā.

Ekspozīcijas sistēma

18. Tests ir izstrādāts, izmantojot caurplūdes atšķaidīšanas sistēmu. Sistēmas komponentiem, kas nonāk kontaktā ar ūdeni, jābūt izgatavotiem no stikla, nerūsošā tērauda un/vai citiem ķīmiski inertiem materiāliem. Ekspozīcijas tvertnēm jābūt stikla vai nerūsošā tērauda akvārijiem, un to izmantojamajai ietilpībai jābūt no 4,0 līdz 10,0 l (minimālais ūdens dziļums: 10 līdz 15 cm). Sistēmai jāspēj uzņemt visas ekspozīcijas koncentrācijas, kontroli un vajadzības gadījumā arī šķīdinātāja kontroli; katrā apstrādē jābūt četriem replikātiem un kontrolēs astoņiem. Plūsmas ātrumam uz katru tvertni jābūt nemainīgam, lai uzturētu gan bioloģiskos apstākļus, gan ekspozīciju ķīmikālijai. Ieteicams nodrošināt piemērotu caurplūdumu (piem., vismaz 5 tvertnes ūdens nomaiņas dienā), lai nepieļautu ķīmikālijas koncentrācijas samazināšanos tāpēc, ka to metabolizē gan testa organismi, gan akvārijā esošie mikroorganismi, vai tāpēc, ka tas degradējas abiotiski (hidrolīze, fotolīze) vai zūd (izgarošana, sorbcija). Apstrādes tvertnes nejaušināti jāizkārto ekspozīcijas sistēmā tā, lai mazinātu iespējamo novietojuma ietekmi, piem., nelielas temperatūras, gaismas intensitātes u. tml. atšķirības. Papildu informāciju par caurplūdes ekspozīcijas sistēmu iekārtošanu var iegūt *ASTM Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians* (16).

Ķīmikālijas padošana: testa šķīdumu sagatavošana

19. Lai sagatavotu testa šķīdumus ekspozīcijas sistēmā, tajā ar piemērotu sūkni vai citu aparātu dozē testējamās ķīmikālijas izejšķīdumu. Pirms ekspozīcijas sākšanas izejšķīduma caurplūdumu kalibrē pēc testa šķīduma analītiskajiem rādītājiem un testa gaitā to periodiski pārbauda volumetriski. Testa šķīdums katrā kamerā jāatjaunina, veicot vismaz 5 tilpumatjaunināšanas dienā.
20. Metodi, ar kādu testējamo ķīmikāliju ievadīt sistēmā, nosaka atkarībā no tās fizikālķīmiskajām īpašībām. Tāpēc pirms testa sākšanas par ķīmikāliju jāiegūst bāzlīnijas

informācija, kas palīdz noteikt tās testējamību. Noderīga informācija par testējamās ķīmikālijas specifiskajām īpašībām ir, piemēram, tās struktūrformula, molekulmasa, tīrība, stabilitāte ūdenī un gaismā, pK_a un K_{ow} , šķīdība ūdenī (vēlams, testa vidē) un tvaika spiediens, kā arī bionoārdāmības viegluma testa (testēšanas metode C.4. (17) vai C.29 (18)) rezultāti. Šķīdību un tvaika spiedienu var izmantot, lai aprēķinātu Henrija likuma konstanti, kas norāda, vai var rasties testējamās ķīmikālijas zudumi iztvaikošanas dēļ. Testa veikšana bez iepriekš norādītās informācijas uzmanīgi jāizsver, jo pētījuma plāns būs atkarīgs no testējamās ķīmikālijas fizikālķīmiskajām īpašībām un testa rezultātus interpretēt bez šiem datiem var būt grūti vai bezjēdzīgi. Vajadzētu būt, ka testējamās ķīmikālijas kvantitatīvai noteikšanai testa šķīdumos ir pieejama uzticama analītiska metode ar zināmu pareizību un noteikšanas robežu. Ūdenī šķīstošās testējamās ķīmikālijas var izšķīdināt testēšanas ūdens alikvotā tādā koncentrācijā, kas caurplūdes sistēmā ļauj nodrošināt testa mērķkoncentrāciju. Ķīmikālijām, kas istabas temperatūrā ir šķidrā vai cietā agregātstāvoklī un ūdenī šķīst vidēji labi, var būt jāizmanto šķidrums:šķidrums vai šķidrums:cietvielas (piem., stikla vates kolonna) saturatori (19). Lai gan var būt iespējams ar barību dot arī ļoti hidrofobisku testējamo ķīmikāliju devas, līdz šim šajā testā pieredze ar šo ekspozīcijas ceļu ir maza.

21. Izraudzīto koncentrāciju testa šķīdumus sagatavo, atšķaidot izejšķīdumu. Izejšķīdumu vēlams sagatavot, testējamo ķīmikāliju atšķaidīšanas ūdenī vienkārši iemaisot vai tajā iejaucot ar mehāniskiem līdzekļiem (piem., samaisot un/vai apstrādājot ar ultraskaņu). Piemērotas koncentrācijas izejšķīduma iegūšanai var izmantot piesātināšanas kolonnas/sistēmas vai pasīvas dozēšanas metodes (20). Ieteicams izmantot testa sistēmu bez papildšķīdinātāja; tomēr dažādām testējamajām ķīmikālijām ir dažādas fizikālķīmiskās īpašības, kas parasti prasa atšķirīgas pieejas ķīmikālijas ekspozīcijas ūdens sagatavošanai. Katrā ziņā jācenšas izvairīties no šķīdinātāju vai nesēju izmantošanas, jo: 1) daži šķīdinātāji paši var izraisīt toksicitāti un/vai nevēlamu vai negaidītu atbildreakciju, 2) ja testējamās ķīmikālijas koncentrācija pārsniedz tās šķīdību ūdenī (kā nereti gadās, ja izmanto šķīdinātājus), noteiktās efektīvās koncentrācijas var būt nepareizas, 3) šķīdinātāju izmantošana ilgākos testos var radīt ievērojamu bioplēvi, kas saistāma ar mikroorganismu aktivitāti, un tā var ietekmēt vides apstākļus, kā arī spēju uzturēt ekspozīcijas koncentrācijas un, 4) ja nav vēsturisko datu, kas pierāda, ka šķīdinātājs pētījuma iznākumu neietekmē, šķīdinātājus var izmantot tikai ar šķīdinātāja kontroli, savukārt tas ir pretrunā dzīvnieku labklājības principiem, jo testa veikšanai tad vajadzīgi papildu dzīvnieki. Šķīdinātāju izmanto kā galēju līdzekli sarežģīti testējamu ķīmikāliju gadījumā, un piemērotāko metodi izvēlas, izmantojot ESAO norādījumu dokumentu par sarežģīti testējamu vielu un maisījumu ūdenstoksiskuma testēšanu (21). Šķīdinātāja izvēli nosaka testējamās ķīmikālijas ķīmiskās īpašības un pieejamie vēsturiskie kontroļu dati par šķīdinātāja izmantošanu. Ja vēsturisko datu nav, pirms galīgā pētījuma veikšanas jānosaka šķīdinātāja piemērotība. Ja no šķīdinātāja izmantošanas nevar izvairīties un novērojama

mikrobiāla aktivitāte (bioplēves veidošanās), ieteicams visā testa laikā reģistrēt / pārskatā norādīt bioplēves apmēru katrā tvertnē (vismaz reizi nedēļā). Ideālā gadījumā šķīdinātāja koncentrācija šķīdinātāja kontrolē un visās apstrādātajās grupās būtu jāuztur nemainīga. Ja šķīdinātāja koncentrāciju neuztur nemainīgu, šķīdinātāja kontrolē jāizmanto augstākā šķīdinātāja koncentrācija, ko izmanto apstrādē. Gadījumos, kad par nesēju izmanto šķīdinātāju, maksimālajai šķīdinātāja koncentrācijai nevajadzētu pārsniegt 100 µl/l vai 100 mg/l (21), un ir ieteicams šķīdinātāja koncentrāciju saglabāt pēc iespējas mazu (piem., ≤ 20 µl/l), lai novērstu iespējamu šķīdinātāja ietekmi uz mērījumiem beigupunktiem (22).

Testa dzīvnieki

Testa suga

22. Testa suga ir *X. laevis* šādu iemeslu dēļ: 1) to bieži audzē laboratorijās visā pasaulē, 2) to ir viegli iegūt no komerciāliem piegādātājiem un 3) tai var noteikt ģenētisko dzimumu.

Pieaugušo dzīvnieku kopšana un audzēšana

23. Piemērota *X. laevis* kopšana un audzēšana ir aprakstīta standartizētā vadlīnijā (23). *X. laevis* turēšanu un kopšanu apraksta arī Read (24). Lai inducētu vairošanos, trim līdz pieciem pieaugušu mātīšu un tēviņu pāriem intraperitoneāli injicē cilvēka horionisko gonadotropīnu (*hCG*). Mātītēm un tēviņiem injicē, piem., attiecīgi aptuveni 800–1000 SV [starptautiskās vienības] un 500–800 SV *hCG*, kas izšķīdināts 0,6–0,9 % fizioloģiskā šķīduma (vai varžu Ringera šķīduma, kas ir izotonisks fizioloģiskais šķīdums abiniekiem; www.hermes.mbl.edu/biologicalbulletin/compendium/comp-RGR.html). Injicē aptuveni 10 µl/g ķermeņa masas (~ 1000 µl). Pēc inducēšanas vaislas pārus netraucēti tur lielās tvertnēs, kurās ir statistiski apstākļi, lai veicinātu amplexu. Vairošanās tvertnēm jābūt ar nerūsošā tērauda sieta dubultdibenu (piem., ar 1,25 cm acīm), kas ikvienam ļauj uzkrāties tvertnes apakšā. Vardes, kas saņēmušas *hCG* injekciju vēlā pēcpusdienā, parasti lielāko daļu ikru iznērš nākamās dienas priekšpusdienā. Kad iznērsts un apaugļots pietiekams daudzums ikru, pieaugušos dzīvniekus no vairošanās tvertnēm izņem. Tad ikrus savāc un atglāto ar L-cisteīnu (23). Sagatavo 2 % L-cisteīna šķīdumu, kura pH koriģē līdz 8,1 ar 1 M NaOH. Šo 21 °C silto šķīdumu ielej 500 ml Erlenmeijera kolbā, kurā ir viena nārsta ikri, un minūti vai divas uzmanīgi skalo uz riņķi, bet pēc tam 6–8 reizes rūpīgi noskalo ar 21 °C silto kultūršķīdumu. Tad ikrus pārnes uz kristalizācijas trauku un nosaka to dzīvotspēju, kam jābūt > 70 %, un embrijos, kuros konstatējama šūnu dalīšanās, anormālijām jābūt minimālām.

TESTA PLĀNS

Testējamās koncentrācijas

24. Ir ieteicams izmantot vismaz četras ķīmikālijas koncentrācijas un attiecīgas kontroles (vajadzības gadījumā arī šķīdinātāja kontroles). Parasti ieteicams izmantot koncentrāciju intervālu (atstatumu koeficientu), kas nepārsniedz 3,2.
25. Lai izvairītos no acīmredzami toksiskām koncentrācijām, testa vajadzībām augstākās testējamās koncentrācijas noteikšanai pēc iespējas lielā mērā izmanto līdzšinējo abinieku pētījumu rezultātus. Šo koncentrāciju noteikt var palīdzēt informācija par struktūras un aktivitātes kvantitatīvajām sakarībām, informācija par analogiem un dati no līdzšinējiem abinieku pētījumiem, piem., abinieku metamorfozes testa (testēšanas metode C.38 (25)) un *Xenopus* varžu embriju teratoģenēzes testa (23) un/vai testiem ar zivīm, piem., testēšanas metodēm C.48, C.41 un C.49(26) (27) (28). Pirms *LAGDA* var veikt diapazona noteikšanas eksperimentu. Ir ieteicams diapazona noteikšanas nolūkos veicamo ekspozīciju sākt 24 stundu laikā pēc apaugļošanas un turpināt 7–14 dienas (vai vairāk, ja nepieciešams), un testējamās koncentrācijas noteikt tādas, ka intervāli starp tām nepārsniedz koeficientu 10. Diapazona noteikšanas eksperimenta rezultāti būtu jāizmanto augstākās *LAGDA* testējamās koncentrācijas noteikšanai. Jāatzīmē, ka, ja nākas izmantot šķīdinātāju, diapazona noteikšanas pētījuma ietvaros var noskaidrot arī šķīdinātāja piemērotību (t. i., vai tas ietekmē pētījuma iznākumu).

Apstrādes grupu un kontroļu replikāti

26. Jāizmanto vismaz četras replikāttvertnes uz testa koncentrāciju un vismaz astoņi replikāti uz kontroli (un šķīdinātāja kontroli, ja tāda vajadzīga), proti, lai panāktu pienācīgu statistisko jaudu, replikātu skaitam kontrolē un šķīdinātāja kontrolē, ja tāda ir, jābūt divreiz lielākam par replikātu skaitu katrā apstrādes grupā. Katrā replikātā jābūt ne vairāk kā 20 dzīvniekiem. Minimālais dzīvnieku skaits būtu 15 (5 62. NF stadijas apakšparaugam un 10 mazuļi). Tomēr, lai ņemtu vērā mirstību un panāktu, ka dzīvnieku skaits nenoslīd zem kritiskā skaita 15, katram replikātam pievieno papildu dzīvniekus.

PROCEDŪRA

Testa pārskats

27. Testu sāk ar tikko iznērstiem embrijiem (8.–10. NF stadija) un turpina līdz mazuļu attīstībai. Dzīvniekus ik dienas apskata, lai konstatētu nāves gadījumus vai anormālas uzvedības pazīmes. 62. NF stadijā savāc kāpuru apakšparaugu (līdz 5 dzīvniekiem uz replikātu) un noskaidro vairākus beigupunktus (1. tabula). Kad visi dzīvnieki sasnieguši 66. NF stadiju, proti, noslēgušies metamorfoze (vai aptuveni 70 dienas pēc testa sākšanas — atkarībā no tā, kura diena ir agrāka), veic nejaušinātu atlasīti (bez apakšparaugošanas), lai dzīvnieku skaitu samazinātu (10 uz tvertni) (sk. 43. punktu), bet atlikušos dzīvniekus turpina eksponēt, līdz pagājušas 10 nedēļas pēc medianālā laika līdz

62. NF stadijai kontrolē. Testu beidzot (mazuļu paraugošana), veic papildu mērījumus (1. tabula).

Ekspozīcijas nosacījumi

28. Pilnīgs testa parametru kopsavilkums atrodams 3. papildinājumā. Ekspozīcijas periodā ik dienas mēra testa šķīdumos izšķīdušo skābekli, temperatūru un pH. Elektrovadītspēju, sārmainību un cietību mēra reizi mēnesī. Testa šķīdumu ūdens temperatūra dažādos replikātos un dažādās apstrādēs (vienas dienas ietvaros) nedrīkstētu atšķirties par vairāk nekā 1,0 °C. Savukārt testa šķīdumu pH dažādos replikātos un dažādās apstrādēs nedrīkstētu atšķirties par vairāk nekā 0,5.
29. Ekspozīcijas tvertnes ik dienas var iztīrīt ar sifonu, lai noņemtu neapēsto barību un ekskrementus, izvairoties no tvertņu krusteniskas kontaminācijas. Jāuzmanās dzīvniekiem neradīt stresu un tos netraumēt, it sevišķi pārvietošanas, akvārija tīrīšanas un manipulāciju laikā. Jāizvairās no stresu izraisošiem apstākļiem/darbībām, piem., skaļa un/vai nerimtīga trokšņa, klauvēšanas pa akvārijiem, tvertņu vibrācijām.

Ekspozīcijas ilgums

30. Ekspozīciju testējamajai ķimikālijai sāk ar jauniznēršiem embrijiem (8.–10. NF stadija) un turpina, līdz pagājušas desmit nedēļas pēc medianālā laika līdz 62. NF stadijai kontrolē (≤ 45 dienas pēc testa sākšanas). Parasti *LAGDA* ilgst 16 nedēļas (ne vairāk kā 17 nedēļas).

Testa sākšana

31. Testa sākšanai ņem tādus vecākdzīvniekus, par kuriem iepriekš pierādīts, ka to pēcnācējiem var noteikt ģenētisko dzimumu (5. papildinājums). Pēc pieaugušo dzīvnieku nārsta embrijus savāc, atgloto ar cisteīnu un atlasa pēc dzīvotspējas (23). Ar cisteīnu apstrādātie embriji atlasē laikā nelīp pie virsmām. Atlasi veic ar stereomikroskopu, izmantojot piemērota lieluma pipeti nedzīvo embriju izņemšanai. Ir vēlams testam izmantot viena nārsta ikrus, kuru dzīvotspēja pārsniedz 70 %. 8.–10. NF stadijas embrijus nejaušināti sadala ekspozīcijai pakļautajās apstrādes tvertnēs, kurās ir pietiekams atšķaidīšanas ūdens tilpumdaudzums, līdz katrā tvertnē ir 20 embriji. Pārvietošanas laikā ar embrijiem jāapietas uzmanīgi, lai mazinātu manipulāciju izraisīto stresu un izvairītos no ievainojumiem. 96 h pēc apaugļošanas kurkuļiem vajadzētu būt pārvietojušamies ūdens slānī uz augšu un piestiprinājušamies tvertnes sienām.

Barošanas režīms

32. Ļoti svarīgs *LAGDA* protokola aspekts ir barības un barošanas režīma izmaiņas dažādās *X. laevis* dzīves cikla stadijās. Pārbarošana kāpuru fāzē parasti palielina skoliozes incidenci un smagumu (8. papildinājums), tāpēc no tās būtu jāizvairās. Savukārt nepietiekama barošana kāpuru fāzē noved pie ļoti atšķirīgiem attīstības rādītājiem kontrolēs, kas

potenciāli var kompromitēt statistisko jaudu vai novest pie maldīgiem testa rezultātiem. Caurplūdes apstākļiem ieteicamā *X. laevis* kāpuru un mazuļu diēta un barošanas režīms ir aprakstīti 4. papildinājumā, bet var izmantot arī alternatīvu pieeju, ja vien testa organismi aug un attīstās apmierinoši. Jāatzīmē, ka, ja tiek mērīti endokrīnajai sistēmai specifiski beigupunkti, barība nedrīkst saturēt endokrīni aktīvas vielas, piemēram, sojas miltus.

Kāpuru barošana

33. Kāpurus ieteicams barot ar foreļu starterbarību, spirulīnas aļģu diskem un zelta zivtiņām domātām pārslām (piem., *TetraFin*[®] pārslām, *Tetra*, Vācija), kas sajauktas kultūras (vai atšķaidīšanas) ūdenī. Maisījumu dod trīs reizes dienā darbdienās un reizi dienā nedēļas nogalēs. No 8. dienas pēc apaugļošanas kurkuļus baro arī ar dzīvjiem 24 h veciem sāļūdens garneļu (*Artemia* spp.) nauplijiem — divreiz dienā darbdienās un reizi dienā nedēļas nogalēs. Kāpuru barošanai, kam katrā testa tvertnē jānorit konsekventi, testa dzīvniekiem jāļauj pienācīgi augt un attīstīties, lai nodrošinātu testa rezultātu reproducējamību un pārnesamību: 1) medianālajam laikam līdz 62. NF stadijai kontrolēs vajadzētu būt ≤ 45 dienām un 2) ieteicams, lai vidējā masa kontrolēs 62. NF stadijā būtu $1,0 \pm 0,2$ g.

Mazuļu barošana

34. Kad metamorfoze ir beigusies, dzīvniekus baro ar pirmšķirīgu grimstošu varžu barību, piem., *Sinking Frog Food -3/32* (*Xenopus Express*, FL, ASV) (4. papildinājums). Vardulēnu (agrīno stadiju mazuļu) gadījumā granulas nedaudz sasmalcina kafijas dzirnaviņās vai blenderī vai sadrupina sīkākos gabaliņos piestā. Kad mazuļi ir pietiekami lieli, lai varētu granulas ēst veselas, tās samalt vai sadrupināt vairs nav nepieciešams. Dzīvniekus baro reizi dienā. Mazuļi jābaro tā, lai tie varētu pienācīgi augt un attīstīties: kontrolēs mazuļu vidējai masai testa beigās ieteicams būt $11,5 \pm 3$ g.

Analītiskā ķīmija

35. Pirms testa sākšanas, izmantojot, piemēram, pieejamo informāciju un zināšanas, jānoskaidro testējamās ķīmikālijas stabilitāte (piem., šķīdība, noārdāmība un gaistamība) un visas vajadzīgās analītiskās metodes. Ja devu dod ar atšķaidīšanas ūdeni, ir ieteicams pirms testa sākšanas izanalizēt katras replikāttvertnes testa šķīduma koncentrāciju, lai pārliecinātos par sistēmas veiktspēju. Ekspozīcijas periodā pienācīgos intervālos nosaka testējamās ķīmikālijas koncentrācijas, vēlams — reizi nedēļā vismaz vienā katras apstrādes grupas replikātā, katru nedēļu izvēloties citu tās pašas apstrādes grupas replikātu. Rezultātus ieteicams balstīt uz izmērītajām koncentrācijām. Tomēr, ja testējamās ķīmikālijas koncentrācija šķīdumā visā testa laikā ir apmierinoši uzturēta ± 20 % diapazonā ap nominālo koncentrāciju, rezultātu var balstīt kā uz izmērītajām, tā nominālajām vērtībām. Turklāt izmērīto testējamo koncentrāciju variācijas koeficientam (VK) visā testa periodā katrā apstrādē un katrā koncentrācijā vajadzētu pastāvīgi būt 20 % vai mazākam. Ja izmērītās koncentrācijas neturas diapazonā no 80 līdz 120 % no nominālās

koncentrācijas (piem., testējot ļoti bionoārdāmas vai adsorbīvas ķīmikālijas), efektīvās koncentrācijas caurplūdes testiem būtu jānosaka un jāizsaka attiecībā pret aritmētisko vidējo koncentrāciju.

36. Atšķaidīšanas ūdens un izejšķīduma caurplūdums visu ekspozīcijas laiku būtu piemērotos intervālos jāpārbauda (piem., trīs reizes nedēļā). Ja ķīmikāliju kādā nominālajā koncentrācijā vai tajās visās nevar detektēt (piem., tāpēc, ka tā testa traukos ātri noārdās vai adsorbējas vai ievērojami uzkrājas eksponēto dzīvnieku organismā), ir ieteicams testa šķīduma atjaunināšanas rādītāju katrā kamerā koriģēt tā, lai testa koncentrācija būtu pēc iespējas nemainīga.

Novērojumi un beigupunktu mērījumi

37. Ekspozīcijas laikā izvērtē beigupunktus, kas liecina par vispārēju toksicitāti (tostarp mirstība, anormāla uzvedība, piem., klīniskas slimības un/vai vispārējas toksicitātes pazīmes) un raksturo pieaugumu (garums un masa), kā arī patoloģiskos beigupunktus, kuri var reaģēt gan uz vispārējo toksicitāti, gan endokrīnajiem iedarbības veidiem, kas vērsti uz estrogēna, androgēna vai vairogdziedzera mediātiem ceļiem. Turklāt testa beigās pēc izvēles var izmērīt VTG koncentrāciju plazmā. VTG mērījumi var palīdzēt saprastu pētījuma rezultātus domājamo ED₅₀ endokrīno iedarbības mehānismu kontekstā. Kopsavilkums par beigupunktiem un mērījumu grafiku ir sniegts 1. tabulā.

1. tabula. Pārskats par LAGDA beigupunktiem

Beigupunkti*	Ik dienu	Starpposma paraugošana (kāpuru paraugošana)	Testa beigas (mazuļu paraugošana)
Mirstība un anormālijas	X		
Laiks līdz 62. NF stadijai		X	
Histo(pato)loģija (vairogdziedzeris)		X	
Morfometrija (masas un garuma pieaugums)		X	X
Hepatosomatiskais indekss (HSI)			X
Ģenētisko/fenotipisko dzimumu attiecības			X
Histopatoloģija (gonādas, reproduktīvie kanāli, nieres un aknas)			X
Vitelogenīns (VTG) (pēc izvēles)			X

* Visus beigupunktus analizē statistiski.

Mirstība un dienišķie novērojumi

38. Katru dienu pārbauda, vai testa tvertnēs nav mirušu dzīvnieku un katras tvertnes mirstību reģistrē. Mirušie dzīvnieki iespējami ātri no testa tvertnes jāizņem. Jānosaka mirušo dzīvnieku attīstības stadija — posms līdz 58. NF stadijai (pirms priekšējo ekstremitāšu parādīšanās), 58.–62. NF stadija, 63.–66. NF stadija (no 62. NF stadijas līdz pilnīgai astes absorbcijai) vai posms pēc 66. NF stadijas (pēckāpuru posms). Ja mirstība pārsniedz 20 %, tas var liecināt par nepienācīgiem testēšanas apstākļiem vai acīmredzami toksisku testējamās ķīmikālijas ietekmi. Īpaši jutīgi pret neķīmiskiem nāves cēloņiem dzīvnieki mēdz būt pirmajās attīstības dienās pēc nārsta un metamorfozes klimaksa laikā. Šādai mirstībai vajadzētu būt novērojamai arī kontrolēs.
39. Jebkāda novērota anormāla uzvedība, acīmredzamas malformācijas (piem., skolioze) vai bojājumi jāreģistrē. Novērotie skoliozes gadījumi jāuzskaita (incidence) un jāizvērtē to smagums (piem., neizteikta — N, minimāla — 1, vidēja — 2, smaga — 3; 8. papildinājums). Jācenšas panākt, lai vidēja un smaga skolioze visā pētījuma laikā būtu maz izplatīta (piem., mazāk nekā 10 % kontrolēs), lai gan arī lielāka anormāliju prevalence kontrolēs ne vienmēr ir iemesls testu izbeigt. Normālai uzvedībai raksturīgi, ka ūdenī esošajiem kāpuriem aste atrodas augstāk par galvu, ir regulāras un ritmiskas astes spuras kustības, tie periodiski uznirst, tiem kustas operkulas, tie reaģē uz stimuliem. Par anormālu uzvedību liecina, piem., pacelšanās ūdens virspusē, gulēšana tvertnes dibenā, peldēšana ar vēderu uz augšu vai haotiska peldēšana, neuzniršana un nereagēšana uz stimuliem. Attiecībā uz postmetamorfiskiem dzīvniekiem līdzās norādītajai anormālajai uzvedībai jāreģistrē arī ievērojamas barības uzņemšanas atšķirības dažādās apstrādēs. Smagas malformācijas un bojājumi var ietvert morfoloģiskas anormālijas (piem., deformētas ekstremitātes), hemorāģiskus bojājumus, vēdera uzpūšanos un bakteriālu infekciju vai sēnīšinfekciju. Mazuļu galvas bojājumi tieši aiz nāsīm var liecināt par nepietiekamu mitrumu. Šie konstatējumi ir kvalitatīvi, un tie būtu jāuztver kā klīniskas slimības/stresa pazīmes un jāskata salīdzinājumā ar kontroles dzīvniekiem. Ja šo pazīmju biežums eksponētajās tvertnēs ir lielāks nekā kontrolēs, pieņem, ka tās liecina par acīmredzamu toksicitāti.

Kāpuru apakšparaugošana

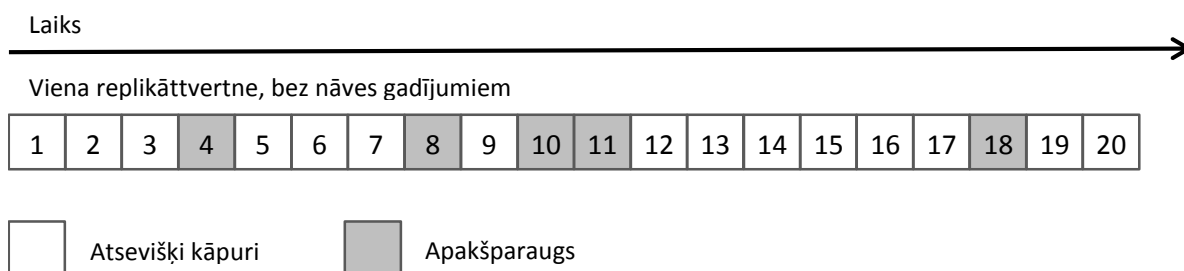
Kāpuru apakšparaugošanas kopapskats

40. Kurkuļus, kas sasnieguši 62. NF stadiju, no tvertnēm izņem un vai nu iekļauj paraugā, vai pārvieto uz nākamo ekspozīcijas fāzi jaunā tvertnē, vai fiziski nošķir no pārējiem tās pašas tvertnes kurkuļiem ar atdalītāju. Kurkuļus ik dienas pārbauda, un reģistrē, kurā pētījuma dienā katrs kurkulis sasniedz 62. NF stadiju. Šajā novērtējumā izmantojamā pazīme ir galvas forma. Kad galva ir samazinājusies tiktāl, ka vizuāli izskatās tikpat plata kā kurkuļa

torss, un priekšējās ekstremitātes ir sirds vidus līmenī, uzskata, ka īpatnis ir sasniedzis 62. NF stadiju.

41. Mērķis ir uz katru replikāttvertni paraugot kopā piecus 62. NF stadijas kurkuļus. Tas būtu jādara pilnīgi nejaušināti, bet jāizlemj jau iepriekš. Hipotētisks replikāttvertnes paraugs redzams **1. attēlā**. Ja tad, kad pirmais īpatnis sasniedz 62. NF stadiju, konkrētā tvertnē ir 20 dzīvi kurkuļi, pēc nejaušības principa izvēlas piecus skaitļus no 1 līdz 20. Pirmais īpatnis, kas sasniedz 62. NF stadiju, ir kurkulis #1, bet pēdējais, kas sasniedz 62. NF stadiju, ir kurkulis #20. Savukārt, ka tvertnē ir 18 dzīvi kurkuļi, nejaušos skaitļus izvēlas no 1 līdz 18. Tā rīkojas ar katru replikāttvertni, kad pirmais īpatnis tajā sasniedz 62. NF stadiju. Ja NF 62. stadijas paraugojumā ir nāves gadījumi, atlikušos paraugus nejaušina vēlreiz atkarībā no tā, cik kāpuru palicis par 62. NF stadiju agrākās stadijās, un cik paraugi vēl vajadzīgi, lai būtu pieci paraugi no replikāta. Dienā, kad kurkulis sasniedz 62. NF stadiju, pēc sagatavotā paraugošanas grafika nosaka, vai kurkuli paraugo vai fiziski nošķir no pārējiem, lai turpinātu tā eksponēšanu. Sniegtajām piemērā (1. attēls) pirmo īpatni, kas sasniedz 62. NF stadiju (t. i., 1. lodziņš) fiziski nošķir no pārējiem kāpuriem, turpina tā eksponēšanu un atzīmē, kurā pētījuma dienā tas sasniedzis 62. NF stadiju. Pēc tam tāpat rīkojas ar 2. un 3. īpatni, savukārt 4. īpatni paraugo, nosakot tā pieaugumu un vairogdziedzera histoloģiju (pēc šā parauga). Procedūru turpina tik ilgi, kamēr 20. īpatnis vai nu tiek pievienots pārējiem īpatņiem, kas sasnieguši 62. NF stadiju, vai tiek paraugots. Nejaušajai atlasei jānodrošina, ka visiem testa dzīvniekiem ir vienāda varbūtība tikt izraudzītiem. To var panākt ar jebkādu nejaušināšanas metodi, bet kādā 62. NF stadijas apakšparaugošanas perioda posmā jātiek notvertam katram kurkulim.

1. attēls. Hipotētisks piemērs: 62. NF stadijas paraugošanas režīms vienā replikāttvertnē.



42. Kāpuru apakšparaugošanā noskaidro šādus beigupunktus: 1) laiks līdz 62. NF stadijai (t. i., no apaugļošanas līdz 62. NF stadijai apritējušo dienu skaits), 2) ārējās anormālijas, 3) morfometrija (piem., masa un garums) un 4) vairogdziedzera histoloģija.

Humāna kurkuļu nonāvēšana

43. 62. NF stadijas kurkuļu apakšparaugu (5 īpatņi uz replikātu) eitanazē, tos uz 30 min iegremdējot pietiekamā daudzumā (piem., 500 ml) anestētiska šķīduma (piem., MS-222, trikaīna metānsulfonāta, CAS Nr. 886-86-2, 0,3 % šķīduma). MS-222 šķīdums būtu ar nātrija bikarbonātu jābuferē, līdz tā pH sasniedz aptuveni 7,0, jo nebuferēts MS-222 šķīduma ir skābs un kairina varžu ādu, tāpēc vāji absorbējas un dzīvniekiem rada nevajadzīgu papildu stresu.
44. Izmantojot tīkliņu, kurkuli izņem no eksperimenta kameras un ievieto eitanāzijas šķīdumā. Dzīvnieks ir pienācīgi eitanazēts un gatavs nekropsijai, kad tas nereaģē uz ārējiem kairinājumiem, piem., pakļējo ekstremitāšu saspišanu ar pinceti.

Morfometrija (masa un garums)

45. Tūlīt pēc tam, kad kurkulis anestēzijas ietekmē beidz reaģēt uz kairinājumiem, izmēra tā slapjmasu (līdz tuvākajam mg) un garumu no purna līdz kloākai (līdz tuvākajam 0,1 mm) (sk. 2.a attēlu). Izmantojot attēlu analīzes programmatūru, garumu no purna līdz kloākai var izmērīt no fotogrāfijas. Pirms svēršanas kurkuļi jānosusina, lai noņemtu lieko ūdeni. Pēc ķermeņa lieluma (masas un garuma no purna līdz kloākai) mērījumiem reģistrē vai piefiksē jebkādas smagas morfoloģiskas anormālijas un/vai klīniskas toksicitātes pazīmes, piem., skoliozi (sk. 8. papildinājumu), petehijas un asinsizplūdumus, un ieteicams šos datus dokumentēt digitāli. Jāatzīmē, ka petehijas ir nelieli sarkani vai violeti asinsizplūdumi ādas kapilāros.

Audu ievākšana un fiksācija

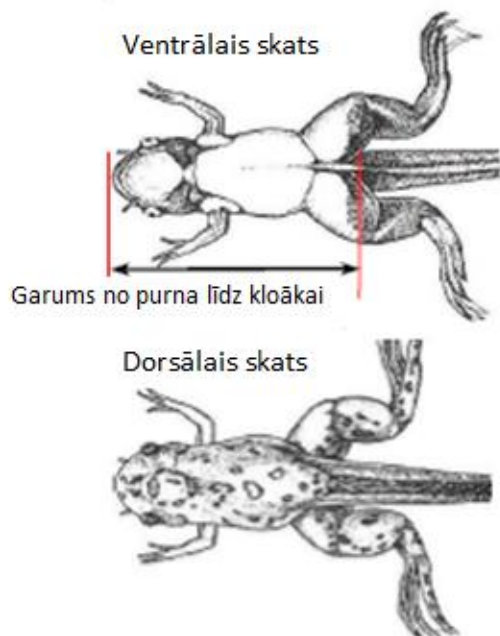
46. Novērtē kāpuru apakšparauga vairogdziedzeru histoloģiju. Torsa apakšdaļu aiz priekšējām ekstremitātēm noņem un izmet. Apgriežto ķermeni fiksē ar Deividsona fiksatoru. Tvertnē vajadzētu būt vismaz 10 reizes vairāk fiksatora nekā audu (aptuveni, pēc tilpuma). Lai interesējošos audus pienācīgi fiksētu, fiksators jāmaisa vai jāskalina riņķveidā. Visus audus Deividsona fiksatorā tur vismaz 48 h, bet ne ilgāk kā 96 h; tad tos noskalo ar dejonizētu ūdeni un glabā 10 % neitrālā buferētā formalīnā (1) (29).

Vairogdziedzera histoloģija

47. Katram kāpuru apakšparaugam (fiksētajiem audiem) histoloģiski novērtē vairogdziedzeri, t. i., nosaka diagnozi un bojājumu smagumu (29) (30).

2. attēls. Atskaites punkti, pēc kuriem testā *LAGDA* mēra 62. NF stadijas īpatņu (a) un varžu mazuļu (b) garumu no purna līdz kloākai. 62. NF stadijas īpatņu (a) pazīmes: galva tikpat plata kā torss, ožas nervs īsāks par ožas sīpola diametru (dorsālais skats) un priekšējās ekstremitātes sirds līmenī (ventrālais skats). Attēli adaptēti no *Nieuwkoop and Faber* (1994).

a. Kāpuru apakšparaugošana (62. NF stadija)



b. Mazuļu paraugošana

**Kāpuru ekspozīcijas beigas**

48. Ņemot vērā kurkuļu sākotnējo skaitu, gaidāms, ka neliela procentuālā to daļa neattīstīsies normāli un to metamorfoze pilnīgi nenoslēgsies (66. NF stadija) saprātīgā laikā. Kāpuru ekspozīcijai nevajadzētu pārsniegt 70 dienas. Kurkuļus, kuru metamorfoze nav beigusies līdz šā perioda beigām, eitanazē (sk. 43. punktu), izmēra to slapjmasu un garumu no purna līdz kloākai, nosaka to stadiju pēc *Nieuwkoop and Faber* (1994) un atzīmē jebkādas konstatētas ontogēnētiskas anormālijas.

Atlase pēc 66. NF stadijas

49. Pēc 66. NF stadijas (pilnīga astes resorbcija) katrā tvertnē līdz ekspozīcijas beigām vajadzētu palikt desmit īpatņiem. Tāpēc, kad visi dzīvnieki sasnieguši 66. NF stadiju vai apritējušas 70 dienas (atkarībā no tā, kas notiek ātrāk), veic atlasī. Pēc 66. NF stadijas sasniegšanas nejaušināti izvēlas, kuru dzīvnieku ekspozīciju neturpināt.

50. Dzīvniekus, kuri nav atlasīti ekspozīcijas turpināšanai, eitanazē (sk. 43. punktu). Katram dzīvniekam nosaka ontogēnētisko stadiju, slapjmasu un garumu no purna līdz kloākai (2.b attēls), kā arī veic makroskopisku nekropsiju. Atzīmē fenotipisko dzimumu (balstoties uz gonādu morfoloģiju): mātīte, tēviņš vai nav nosakāms.

Mazuļu paraugošana

Pārskats par mazuļu paraugošanu

51. Atlikušo dzīvnieku eksponēšanu turpina, līdz pagājušas 10 nedēļas pēc medianālā laika līdz 62. NF stadijai atšķaidīšanas ūdens kontrolē (un/vai šķīdinātāja kontrolē, ja tāda ir). Ekspozīcijas perioda beigās atlikušos dzīvniekus (ne vairāk kā 10 vardses uz replikātu) eitanazē un izmēra vai izvērtē un reģistrē dažādos beigupunktus: 1) morfometrija (masa un garums), 2) fenotipisko/genotipisko dzimumu attiecības 3) aknu masa (hepatosomatiskais indekss), 4) histopatoloģija (gonādas, reproduktīvie kanāli, aknas un nieres) un 5) pēc izvēles VTG plazmā.

Humāna varžu nonāvēšana

52. Paraugotos mazuļus, postmetamorfiskās vardses, eitanazē, tām intraperitoneāli injicējot anestēzijas līdzekli, piem., 10 % MS-222 piemērotā fosfātbuferētā šķīdumā. Vardes var paraugot, kad tās vairs nereaģē uz kairinājumu (parasti aptuveni 2 min pēc injekcijas, ja 10 % MS-222 izmanto devā 0,01 ml uz vardes masas g). Lai gan varžu mazuļus varētu iegremdēt augstākas koncentrācijas anestēzijas līdzeklī (MS-222), pieredze rāda, ka ar tādu metodi anestēzija notiek vēlāk un ilgums var nebūt piemērots paraugošanai. Injekcija nodrošina efektīvu, ātru eitanāziju pirms paraugošanas. Paraugošanu nevajadzētu sākt, kamēr nav pārbaudīts, ka vardses nereaģē uz kairinājumu, tā pārliecinoties, ka dzīvnieki ir nedzīvi. Ja vardēm novērojamas ievērojamu ciešanu pazīmes (ļoti smagas, droši paredzama nāve) un tās uzskatāmas par mirstošām, tās anestezē un eitanazē, bet datu analīzes nolūkos uzskata par nāves gadījumiem. Ja vardi eitanazē tāpēc, ka tā mirst, tas jāatzīmē un jānorāda pārskatā. Atkarībā no tā, kurā pētījuma brīdī vardi eitanazē, var vardi paturēt, lai tai veiktu histopatoloģisko analīzi (vardi fiksēt iespējamās histopatoloģijas vajadzībām).

Morfometrija (masa un garums)

53. Slapjmasu un garumu no purna līdz kloācai (2.b attēls) mēra tāpat kā kāpuru apakšparaugojuma gadījumā.

VTG plazmā (pēc izvēles)

54. VTG ir plaši atzīts biomarķieris, kas liecina par ekspozīciju estrogēniskām ķīmikālijām. Testā *LAGDA* pēc izvēles var mērīt paraugoto mazuļu VTG līmeni plazmā (tas var būt īpaši relevanti, ja ir aizdomas, ka testējamā ķīmikālija ir estrogēns).
55. Eitanazēto mazuļu pakaļējās ekstremitātes nogriež un asinis savāc pa heparinizētu kapilāru (lai gan piemērotas var būt arī citas asins savākšanas metodes, piem., sirds punkcija). Asinis izlaiž mikrocentrifūgas stobriņā (piem., ar tilpumu 1,5 ml) un centrifugē, lai iegūtu plazmu. Plazmas paraugus līdz VTG noteikšanai glabā -70 °C vai zemākā temperatūrā. VTG koncentrāciju plazmā var izmērīt ar imūnfermentatīvo analīzi (*ELISA*) (6. papildinājums) vai kādu citu metodi, piem., masspektrometriju (31). Lielāka jutīguma dēļ priekšroka dodama sugai specifiskām antivielām.

Ģenētiskā dzimuma noteikšana

56. Katram varžu mazulim nosaka ģenētisko dzimumu, balstoties uz *Yoshimoto et al.* (11) izstrādātajiem marķieriem. Lai noteiktu ģenētisko dzimumu, disekcijas laikā ņem vienas pakalējās ekstremitātes daļu (vai to visu, vai jebkādu citu audu) un to ievieto mikrocentrifūgas stobriņā (varžu audu paraugus var ņemt no jebkādiem audiem). Līdz dezoksiribonukleīnskābes (DNS) izolēšanai audus var glabāt -20 °C vai zemākā temperatūrā. DNS izolēšanu no audiem var veikt ar komerciāli pieejamiem piederumu komplektiem, un analīzi uz marķiera esību vai neesību veic ar polimerāzes ķēdes reakcijas (PĶR) metodi (5. papildinājums). Parasti kontrolgrupu dzīvnieku histoloģiskais dzimums un genotips mazuļu paraugošanas laikā sakrīt par 95 %.

Audu ņemšana un fiksēšana histopatoloģijas vajadzībām

57. Histoloģiskajai analīzei galīgās paraugošanas laikā ņem gonādas, reproduktīvos kanālus, nieres un aknas. Atver vēdera dobumu, disektējot izņem aknas un tās nosver. Tad no vēdera apakšdaļas izņem gremošanas orgānus (piem., kuņģi, zarnas), atklājot gonādas, nieres un reproduktīvos kanālus. Jāatzīmē jebkādas smagas morfoloģiskas anormālijas gonādās. Beigās noņem pakalējās ekstremitātes, ja tās nav jau iepriekš noņemtas asiņu savākšanai. Izņemtās aknas un ķermeni ar gonādām vēl *in situ* nekavējoties ievieto Deividsona fiksatorā. Tvertnē vajadzētu būt vismaz 10 reizes vairāk fiksatora nekā audu (aptuveni, pēc tilpuma). Visus audus Deividsona fiksatorā tur vismaz 48 h, bet ne ilgāk kā 96 h; tad tos noskalo ar dejonizētu ūdeni un glabā 10 % neitrālā buferētā formalīnā (1) (29).

Histopatoloģija

58. Katru paraugoto mazuli histoloģiski izvērtē uz gonādu, reproduktīvo kanālu, nieru un aknu audu patoloģijām, t. i., nosaka diagnozi un piešķir smaguma atzīmi (32). No šā izvērtējuma iegūst arī gonādu fenotipu (piem., olnīcas, sēklinieki, hermafrodītisms), un kopā ar īpatņa ģenētiskā dzimuma raksturojumu šos novērojumus var izmantot fenotipisko/genotipisko dzimumu attiecību aprēķināšanai.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Statistiskā analīze

59. Testā *LAGDA* iegūst trīs veidu statistiski analizējamus datus: 1) kvantitatīvi nepārtrauktu beigupunktu dati (masa, garums no purna līdz kloākam, HSI, VTG), 2) “laiks līdz notikumam” tipa dati, kas raksturo attīstības gaitu laika griezumā (t. i., dienas līdz 62. NF stadijai no testa sākšanas) un 3) ordināli dati, kas ir smaguma atzīmes vai ontoģenētiskās stadijas no histopatoloģiskajiem izvērtējumiem.

60. Ir ieteicams, lai testa plāns un statistisko testu atlase dotu pietiekamu jaudu noteikt bioloģiski svarīgas izmaiņas beigupunktos gadījumos, kad jāziņo *NOEC* vai *ECx*. Veicot datu statistisko analīzi (parasti — balstoties uz replikātu vidējām vērtībām), vēlams ievērot procedūras, kas aprakstītas dokumentā *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* [“Ekotoksiskuma datu statistiskās analīzes pašreizējās metodes: lietošanas norādījumi”] (33). Diagramma, pēc kuras pieņemams lēmums par ieteicamo statistisko analīzi, un norādījumi, kā datus apstrādāt un kā izvēlēties testam *LAGDA* vispiemērotāko statistisko testu vai modeli, ir sniegti 7. papildinājumā.
61. Tā kā visām vardēm nosaka genotipisko dzimumu, mazuļu paraugojuma dati (piem., pieaugums, HSI) analizējami par katra genotipiskā dzimuma dzīvniekiem atsevišķi.

Ar datu analīzi saistītie apsvērumi

Kompromitētu replikātu un apstrāžu izmantošana

62. Replikātus un apstrādes var kompromitēt pārmērīga mirstība acīmredzamas toksicitātes, slimības vai tehniskas kļūdas dēļ. Ja apstrāde ir kompromitēta slimības vai tehniskas kļūdas dēļ, analīzei jābūt pieejamām trim nekompromitētām apstrādēm ar trim nekompromitētiem replikātiem. Ja acīmredzama toksicitāte konstatējama augsto līmeņu apstrādēs, ir vēlams, lai analīzei būtu pieejami vismaz trīs apstrādes līmeņi ar trim nekompromitētiem replikātiem (atbilstoši maksimālās pieļaujamās koncentrācijas pieeju, ko izmanto ESAO testēšanas vadlīnijās (34)). Līdzās nāves gadījumiem acīmredzamas toksicitātes pazīmes ietver uzvedības īpatnības (piem., pacelšanās ūdens virspusē, gulēšana tvertnes dibenā, peldēšana ar vēderu uz augšu vai haotiska peldēšana, neuzniršana), morfoloģiskus bojājumus (piem., hemorāģiski bojājumi, vēdera uzpūšanās) vai normālas barošanās inhibēšanos kvalitatīvā salīdzinājumā ar kontroles dzīvniekiem.

Šķīdinātāja kontrole

63. Testu beidzot, izvērtē potenciālo šķīdinātāja ietekmi (ja tāds izmantots). To dara, šķīdinātāja kontrolgrupu statistiski salīdzinot ar atšķaidīšanas ūdens kontrolgrupu. Visrelevantākie šajā analīzē izskatāmie beigupunkti ir pieauguma determinanti (masa un garums), jo tos var ietekmēt vispārēja toksicitāte. Ja šajos beigupunktos konstatē statistiski nozīmīgas atšķirības starp atšķaidīšanas ūdens kontrolgrupu un šķīdinātāja kontrolgrupu, to, vai ir kompromitēts testa derīgums, rūpīgi izvērtē speciālists. Ja abu kontroļu rezultāti ir atšķirīgi, ķimikālijai eksponētās apstrādes grupas salīdzina ar šķīdinātāja kontroli, ja vien nav zināms, ka priekšroka dodama atšķaidīšanas ūdens kontrolei. Ja statistiski nozīmīgu atšķirību starp abām kontrolgrupām nav, ir ieteicams testējamajai ķimikālijai eksponētās apstrādes salīdzināt ar abām grupām (šķīdinātāja un atšķaidīšanas ūdens kontrolgrupām) kopā, ja vien nav zināms, ka priekšroka dodama tikai šķīdinātāja vai tikai atšķaidījuma ūdens kontrolgrupai.

Testēšanas pārskats

64. Testēšanas pārskatā norāda šādas ziņas.

Testējamā ķimikālija:

- fizikālās īpašības un attiecīgā gadījumā fizikālķīmiskās īpašības;
- vienkomenta viela:
 - izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības;
 - ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (ciktāl vajadzīgs un iespējams) u. c. (attiecīgā gadījumā arī organiskā oglekļa saturs);
- daudzkomponentu vielas, *UVCB* un maisījumi:
 - iespējami izsmelošs raksturojums ar, piem., sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), tīrību, kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Testa suga:

- zinātniskais nosaukums, celms (ja zināms), avots un apaugļoto iekru ievākšanas metode un turpmākas manipulācijas;
- skoliozes incidence izmantotās izejkultūras vēsturiskajās kontrolēs.

Testa apstākļi:

- fotoperiodi;
- testa plāns (piem., kameru lielums, materiāls un ūdens tilpums, testa kameru un replikātu skaits, testa organismu skaits uz replikātu);
- izejšķīdumu sagatavošanas metode un atjaunināšanas biežums (ja tādu izmanto, norāda šķīdināšanas aģentu un tā koncentrāciju);
- testējamās ķimikālijas dozēšanas metode (piem., sūkņi, atšķaidīšanas sistēmas);
- metodei raksturīgā atgūstamība un nominālās testējamās koncentrācijas, kvantitatīvās noteikšanas robeža, mērījumu vidējās vērtības un to standartnovirzes testa traukos un metode, ar ko tās iegūtas, un pierādījumi, ka mērījumi raksturo testējamās ķimikālijas koncentrācijas īstā šķīdumā;
- atšķaidīšanas ūdens raksturlielumi: testa vides pH, cietība, temperatūra, izšķīdušā skābekļa koncentrācija, hlora atlikuma līmeņi (ja mērīti), kopējais jods, kopējais organiskais ogleklis (ja mērīts), suspendētās cietvielas (ja mērītas), sāļums (ja mērīts) un citi izdarītie mērījumi;

- nominālās testējamās koncentrācijas, izmērīto vērtību vidējie un to standartnovirzes;
- ūdens kvalitāte testa traukos: pH, temperatūra (katru dienu) un izšķīdušā skābekļa koncentrācija;
- sīka informācija par barošanu (piem., barības veidi, avots, dotais daudzums un došanas biežums).

Rezultāti:

- pierādījumi, ka kontroles atbilst derīguma kritērijiem;
 - šādi dati par kontroli (un šķīdinātāja kontroli, ja tāda ir) un apstrādes grupām: novērotā mirstība un anormālijas, laiks līdz 62. NF stadijai, vairogdziedzera histoloģiskais novērtējums (tikai paraugotajiem kāpuriem), pieaugums (masa un garums), HSI (tikai paraugotajiem mazuļiem), ģenētisko/fenotipisko dzimumu attiecības (tikai paraugotajiem mazuļiem), gonādu, reproduktīvo kanālu, nieru un aknu histopatoloģiskā novērtējuma rezultāti (tikai paraugotajiem mazuļiem) un VTG plazmā (tikai paraugotajiem mazuļiem un tikai tad, ja šo mērījumu veic);
 - statistiskās analīzes pieeja un datu apstrāde (izmantotais statistiskais tests vai modelis);
 - katrai novērtētajai atbildreakcijai — nenovērojamās ietekmes koncentrācija (*NOEC*);
 - katrai novērtētajai atbildreakcijai — zemākā novērojamās ietekmes koncentrācija (*LOEC*) ($\alpha=0,05$); katrai novērtētajai atbildreakcijai — ECx (attiecīgā gadījumā) un ticamības intervāli (piem., 95 %) un ECx aprēķināšanai pielāgotā modeļa grafiks, koncentrācijas–atbildreakcijas līknes virziena koeficients, regresijas modeļa formula, aplēstie modeļa parametri un to standartklūdas;
 - jebkādas novirzes no testēšanas metodes un novirzes no pieņemamības kritērijiem, kā arī apsvērumi par iespējamo ietekmi uz testa iznākumu.
65. Attiecībā uz beigupunktu mērījumiem jānorāda vidējās vērtības un to standartnovirzes (ja iespējams, gan uz replikātu, gan uz koncentrāciju).
66. Jāaprēķina medianālais laiks līdz 62. NF stadijai kontrolēs un jāattēlo kā replikātu mediānu vidējā vērtība ar standartnovirzi. Šis medianālais laiks jāaprēķina arī apstrādēs un jāattēlo kā replikātu mediānu vidējā vērtība ar standartnovirzi.

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

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

- (23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, USA.
- (24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84 pp.
- (25) Šā pielikuma C.38. nodaļa. Abinieku metamorfozes tests.
- (26) Šā pielikuma C.48. nodaļa. Īsaivs zivju vairošanās tests.
- (27) Šā pielikuma C.41. nodaļa. Zivju dzimumattīstības tests.
- (28) Šā pielikuma C.49. nodaļa. Zivju embriju akūtās toksicitātes (*FET*) tests.
- (29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.
- (31) Luna LG and Coady K. (2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.
- (32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197-202.

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Apikālais beigupunkts: beigupunkts ar ietekmi populācijas līmenī.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

ELISA: imūnfermentatīvā analīze.

EC_x: (efektīvā koncentrācija, pie kuras ietekme ir x %) ir koncentrācija, pie kuras ietekme uz testa organismiem konkrētā ekspozīcijas periodā salīdzinājumā ar kontroli ir x %. Piemēram, EC₅₀ ir koncentrācija, kas pēc aplēsēm konkrētā ekspozīcijas periodā ietekmē kādu testa beigupunktu 50 % no eksponētās populācijas.

dpa: dienas pēc apaugļošanas.

Caurplūdes tests: tests, kurā testa šķīdumi visā ekspozīcijas laikā nepārtraukti plūst caur testa sistēmu.

HHG ass: hipotalāma, hipofīzes un gonādu ass.

IUPAC: Starptautiskā Teorētiskās un lietišķās ķīmijas savienība.

Zemākā novērojamas ietekmes koncentrācija (LOEC) ir testējamās ķimikālijas zemākā testētā koncentrācija, pie kuras, salīdzinot ar kontroli, ķimikālijai ir novērota statistiski nozīmīga ietekme ($p < 0,05$). Pie visām testa koncentrācijām, kas augstākas par LOEC, ir jābūt kaitīgai ietekmei, kura vienāda ar vai lielāka par ietekmi, kas novērota pie LOEC. Ja šos divus nosacījumus nevar izpildīt, jāsniedz pilns paskaidrojums par to, kā LOEC (un līdz ar to arī NOEC) izraudzīta. Norādījumi sniegti 7. papildinājumā.

Medianālā letālā koncentrācija (LC₅₀): testējamās ķimikālijas koncentrācija, kas pēc aplēsēm testa laikā ir letāla 50 % testa organismu.

Nenovērojamās ietekmes koncentrācija (NOEC): testa koncentrācija, kura ir tieši zem LOEC un kurai, salīdzinot ar kontroli, noteiktā ekspozīcijas periodā nav nekādas statistiski nozīmīgas ietekmes ($p < 0,05$).

SMILES: *Simplified Molecular Input Line Entry Specification*.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

VTG: vitelogenīns, olas dzeltenuma fosfolipīdu glikoproteīna prekursors, kas parasti

veidojas tādu seksuāli aktīvu mātišu organismā, kuras dēj olas / nēš ikrus.

2. papildinājums**DAŽI PIENĒMAMA ATŠĶAIDĪŠANAS ŪDENS ĶĪMISKIE RAKSTURLIELUMI**

Viela	Robežkoncentrācija
Daļiņas	5 mg/l
Kopējais organiskais ogleklis	2 mg/l
Nejonizēts amonjaks	1 µg/l
Atlikušais hlors	10 µg/l
Kopējie fosfororganiskie pesticīdi	50 ng/l
Kopējie hlororganiskie pesticīdi un polihlorbifenili	50 ng/l
Kopējais organiskais hlors	25 ng/l
Alumīnijs	1 µg/l
Arsēns	1 µg/l
Hroms	1 µg/l
Kobalts	1 µg/l
Varš	1 µg/l
Dzelzs	1 µg/l
Svins	1 µg/l
Niķelis	1 µg/l
Cinks	1 µg/l
Kadmija	100 ng/l
Dzīvsudrabs	100 ng/l
Sudrabs	100 ng/l

3. papildinājums**TESTA *LAGDA* NOSACĪJUMI**

1. Testa suga	<i>Xenopus laevis</i>
2. Testa veids	Pastāvīgas caurplūdes
3. Ūdens temperatūra	Nominālā temperatūra ir 21 °C. Vidējā temperatūra testa laikā ir 21 ± 1 °C (atšķirībām starp replikātiem un apstrādēm nevajadzētu pārsniegt 1,0 °C)
4. Apgaismojuma kvalitāte	Fluorescējošās spuldzes (plaša spektra), 600–2000 lx (lm/m ²) uz ūdens virsmas
5. Fotoperiods	12 h gaismas, 12 h tumsas
6. Testa šķīduma tilpumdaudzums un testa trauks (tvertne)	4–10 l (ūdens dziļums: vismaz 10–15 cm) Stikla vai nerūsošā tērauda tvertne
7. Testa šķīdumu tilpumapmaiņa	Nemainīga, lai uzturētu gan bioloģiskos apstākļus, gan ekspozīciju ķīmikālijai (piem., 5 tvertnes tilpumapmaiņas dienā)
8. Testa organismu vecums iniciēšanas laikā	8.–10. Nivkopa un Fabera (NF) stadija
9. Organismu skaits uz replikātu	20 dzīvnieki (embriji) uz tvertni (replikātu), kad ekspozīcija tiek sākota, un 10 dzīvnieki (mazuļi) uz tvertni (replikātu) no 66. NF stadijas līdz ekspozīcijas beigām
10. Apstrāžu skaits	Vismaz 4 apstrādes, kurām izmanto testējamo ķīmikāliju, un attiecīga kontrole vai kontroles
11. Replikātu skaits uz vienu apstrādi	4 replikāti uz apstrādi ar testējamo ķīmikāliju un 8 replikāti kontrolei vai kontrolēm
12. Organismu skaits uz testējamo koncentrāciju	Vismaz 80 dzīvnieki uz apstrādi ar testējamo ķīmikāliju un 160 replikāti kontrolei vai kontrolēm
13. Atšķaidīšanas ūdens	Jebkāds ūdens, kurā <i>X. laevis</i> var normāli augt un attīstīties (piem., avota ūdens vai caur ogli izfiltrēts krāna ūdens)
14. Aerācija	Nav obligāta, bet tvertnes var būt jāaerē, ja izšķīdušā skābekļa līmenis nokrītas zem ieteicamās robežvērtības un tiek maksimizēts testa šķīduma caurplūdums.
15. Testa šķīdumā izšķīdušais	Izšķīdušais skābeklis: ≥ 40 % no gaisa piesātinājuma vērtības vai

skābeklis	$\geq 3,5$ mg/l
16. Testa šķīduma pH	6,5–8,5 (atšķirībām starp replikātiem un apstrādēm nevajadzētu pārsniegt 0,5)
17. Testa šķīduma cietība un sārmainība	10–250 mg CaCO ₃ /l
18. Barošanas režīms	(Sk. 4. papildinājumu)
19. Ekspozīcijas periods	No 8.–10. NF stadijas līdz laikam, kad aprit desmit nedēļas pēc medianālā laika līdz 62. NF stadijai ūdens un/vai šķīdinātāja kontrolgrupā (ne vairāk kā 17 nedēļas)
20. Bioloģiskie beigupunkti	Mirstība (un novērotās anormālijas), laiks līdz 62. NF stadijai (paraugotie kāpuri), vairogdziedzera histoloģiskais novērtējums (paraugotajiem kāpuriem), pieaugums (masa un garums), hepatosomatiskais indekss (paraugotajiem mazuļiem), ģenētisko/fenotipisko dzimumu attiecības (paraugotajiem mazuļiem), gonādu, reproduktīvo kanālu, nieru un aknu histopatoloģija (paraugotajiem mazuļiem) un vitelogenīna līmenis plazmā (paraugotajiem mazuļiem un tikai tad, ja šo mērījumu veic)
21. Testa derīguma kritēriji	Izšķīdušais skābeklis > 40 % no gaisa piesātinājuma vērtības; ūdens temperatūra 21 ± 1 °C diapazonā un atšķirības starp replikātiem un apstrādēm $< 1,0$ °C; testa šķīduma pH no 6,5 līdz 8,5; mirstība kontrolē ≤ 20 % katrā replikātā, un vidējais laiks līdz 62. NF stadijai kontrolē ≤ 45 dienas; kontrolēs un testa kontrolēs (ja tādas izmanto) testa organismu vidējā masa 62. NF stadijā un testa beigās attiecīgi $1,0 \pm 0,2$ un $11,5 \pm 3$ g; pieejamas liecības, ka testējamās ķīmikālijas koncentrācija šķīdumā ir apmierinoši uzturēta ± 20 % diapazonā ap vidējām izmēritajām vērtībām.

4. papildinājums

BAROŠANAS REŽĪMS

Jāatzīmē, ka, lai gan ieteicams izmantot šo barošanas režīmu, ir pieļaujami izmantot arī citus, ja vien testa organismi aug un attīstās pienācīgi ātri.

Kāpuru barošana

Kāpuru barības sagatavošana

- A. 1:1 (tilp./tilp.) foreļu starterbarība: aļģes/*TetraFin*® (vai ekvivalents);
- foreļu starterbarība: 50 g foreļu starterbarības (smalkas granulas vai pulveris) sajauc ar 300 ml piemērota filtrēta ūdens, to 20 s jaucot blenderī augstas intensitātes režīmā;
 - aļģu/*TetraFin*® (vai ekvivalenta) maisījums: 12 g spirulīnas aļģu disku sajauc ar 500 ml filtrēta ūdens, tos 40 s jaucot blenderī augstas intensitātes režīmā, 12 g *TetraFin*® (vai ekvivalenta) sajauc ar 500 ml filtrēta ūdens un tad abus sajauc kopā, lai iegūtu 1 l 12 g/l spirulīnas aļģu un 12 g/l *TetraFin*® (vai ekvivalenta);
 - sajaukto foreļu starterbarību un aļģu/*TetraFin*® (vai ekvivalenta) maisījumu sajauc vienādos tilpumdaudzumos
- B. Sālūdens garneles:

15 ml sālūdens garneļu ikru izšķīdina 1 l sālsūdens (ko sagatavo, 1 l dejonizēta ūdens pievienojot 20 ml NaCl). Tos 24 h aerē istabas temperatūrā pastāvīgā gaismā un tad ievāc sālūdens garneles. Aerēšanu izbeidz un sālūdens garneļēm 30 min ļauj nosēsties. Cistas, kas paceļas trauka augšā, izlej un izmet, bet garneles pienācīgi izfiltrē un ielaiž 30 ml filtrēta ūdens.

Barošanas protokols

1. tabulā norādīts, kāda veida barību un cik daudz dod, veicot ekspozīciju, kamēr dzīvnieki ir kāpura stadijās. Dzīvniekus baro trīs reizes dienā no pirmdienas līdz piektdienai un reizi dienā nedēļas nogalēs.

1. tabula. *X. laevis* kāpuru barošanas režīms caurplūdes apstākļos

Laiks* (pēc apaugļošanas)	Foreļu starterbarība: aļģes/ <i>TetraFin</i> ® (vai ekvivalents);		Sālūdens garneles	
	Darbdiena (3 reizes dienā)	Nedēļas nogale (1 reizi dienā)	Darbdiena (2 reizes dienā)	Nedēļas nogale (1 reizi dienā)
4.–14. diena (0.–1. nedēļa)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (8.–15. dienā)	0,5 ml (8.–15. dienā)
2. nedēļa	0,67 ml	2,4 ml	1 ml (no 16. dienas)	1 ml (no 16. dienas)

3. nedēļa	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
4. nedēļa	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
5. nedēļa	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
6. nedēļa	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
7. nedēļa	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
(8.–10. nedēļa)	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

* 0. diena ir tā, kurā injicē *hCG*.

Pāreja no kāpuru diētas uz mazuļu diētu

Kāpuru metamorfozei noslēdzoties, to diētu maina uz mazuļu diētu, kā aprakstīts tālāk. Šīs pārejas laikā būtu jāsamazina kāpuru barības daudzums, vienlaikus palielinot mazuļu barības daudzumu. To var panākt, kāpuru barības daudzumu proporcionāli samazinot un tajā pašā laikā proporcionāli palielinot mazuļu barības daudzumu, katrai piecu kurkuļu grupai pārsniedzot 62. NF stadiju un tuvojoties metamorfozes beigām — 66 NF stadijai.

Mazuļu barošana

Mazuļu diēta

Kad metamorfoze ir beigusies (66. stadija), barošanā pāriet tikai uz 3/32 " pirmšķirīgu grimstošu varžu barību (*Xenopus Express*TM, FL, ASV) vai ekvivalentu.

Sasmalcinātu granulu sagatavošana pārejai no kāpuru diētas uz mazuļu diētu

Grimstošās varžu barības granulas nedaudz sasmalcina kafijas dzirnaviņās, blenderī vai pietā tā, lai granulu lielums samazinātos par aptuveni 1/3. Apstrādi turpinot pārāk ilgi, iegūst pulveri, un tas nav vēlamī.

Barošanas protokols

2. tabulā norādīts, kāda veida barību un cik daudz dod mazuļiem un pieaugušiem īpatņiem. Dzīvniekus baro reizi dienā. Jāatzīmē, ka, dzīvniekiem metamorfozējoties, tie joprojām saņem daļu sāļūdens garneļu, kamēr metamorfoze nav noslēgusies > 95 % dzīvnieku.

Dzīvniekus nevajadzētu barot testa beigu dienā, lai barība neietekmētu masas mērījumus.

2. tabula *X. laevis* mazuļu barošanas režīms caurplūdes apstākļos. Jāatzīmē, ka nemetamorfozējušies dzīvnieki, arī tādi, kuru metamorfoze aizkavējusies sakarā ar apstrādi ar ķīmikāliju, nesasmalcinātas granulas ēst nevar.

Laiks (Nedēļas pēc medianālās metamorfozes dienas)	Sasmalcināto granulu daudzums	Veselo granulu daudzums (mg uz vardulēnu)
---	----------------------------------	--

	(mg uz vardulēnu)	
Beidzoties dzīvnieku metamorfozei	25	0
0.–1. nedēļa	25	28
2.–3. nedēļa	0	110
4.–5. nedēļa	0	165
6.–9. nedēļa	0	220

* 0. nedēļas pirmā diena ir kontroles dzīvnieku medianālā metamorfozes diena.

5. papildinājums

ĢENĒTISKĀ DZIMUMA NOTEIKŠANA

Xenopus laevis ģenētiskā dzimuma noteikšanas pamatā ir *Yoshimoto et al.*, 2008. Detalizētas genotipēšanas procedūras vajadzības gadījumā var atrast minētajā publikācijā. Var izmantot arī citas metodes (piem., augsta caurlaiduma kvantitatīvo *PCR*), ja tās uzskata par piemērotām.

X. laevis praimeru

Marķieris DM-W

Tiešais: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Atgriezeniskais: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Pozitīvā kontrole

Tiešais: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Atgriezeniskais: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

DNS attīrīšana

Attīriet DNS no muskuļu vai ādas audiem ar, piem., *Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit* (cat # 69506) vai līdzīgu produktu, ievērojot attiecīgā piederumu komplekta instrukcijas. DNS var eluēt no rotācijas stobriņiem, izmantojot mazāk buferšķīduma, lai paraugi būtu koncentrētāki, ja tas šķiet nepieciešams *PCR*. Jāatzīmē, ka DNS ir diezgan stabila, tāpēc jāizvairās no krusteniskās kontaminācijas, kuras iespaidā tēviņus varētu identificēt kā mātītes vai otrādi.

PCR

Paraugprotokols ar *Sigma JumpStart™ Taq* ir sniegts **1. tabulā**.

1. tabula. Paraugprotokols ar *Sigma JumpStart™ Taq*

Pamatmaisījums [<i>master mix</i>]	1x (μl)	[Final]
Beznukleāzu ūdens <i>NFW</i>	11	—
10x buferis	2,0	—

MgCl ₂ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP (10 mM katrs)	0,4	200 µM
Praimera marķieris (8 µM)	0,8	0,3 µM
Marķieris, atgriezeniskais praimeris (8 µM)	0,8	0,3 µM
Praimera kontrole (8 µM)	0,8	0,3 µM
Kontrole, atgriezeniskais praimeris (8 µM)	0,8	0,3 µM
<i>JumpStartTM Taq</i>	0,4	0,05 vienības/µl
DNS veidne	1,0	~200 pg/µl

Piezīme. Gatavojot pamatmaisījumus, sagatavojiet lielāku daudzumu, lai kompensētu pipetēšanā radušos zudumus (piemērs: 25x būtu izmantojams tikai 24 reakcijām).

Reakcija

Pamatmaisījums 19,0 µl

Veidne 1,0 µl

Kopā 20,0 µl

Termociklera profils:

1. etaps. 94 °C 1 min
2. etaps. 94 °C 30 s
3. etaps. 60 °C 30 s
4. etaps. 72 °C 1 min
5. etaps. Atgriezties uz 2. etapu. 35 cikli
6. etaps. 72 °C 1 min
7. etaps. Turēt 4 °C

PCR produktus var nekavējoties ievietot gēlā vai glabāt 4 °C.

Agarozes gēla elektroforēze (3 %) (paraugprotokols)

50X TAE

Tris 24,2 g

Ledus etiķskābe 5,71 ml

Na₂ (EDTA)·2H₂O 3,72 g

Pievieno ūdeni, līdz tilpums sasniedz 100 ml

1X TAE

H₂O 392 ml

50X TAE 8 ml

3:1 agaroze

3 daļas NuSieve™ GTG™ agarozes

1 daļa Fišera agarozes (ar zemu elektroendoosmozi (EEO))

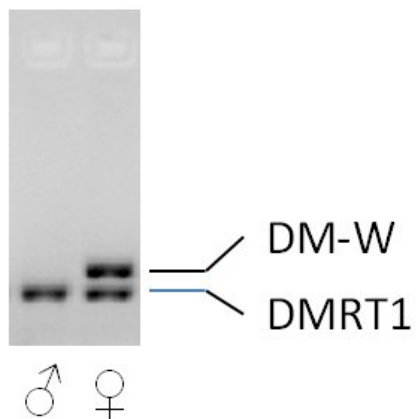
Metode

1. Sagatavo 3 % gēlu, 1,2 g agarozes maisījuma pievienojot 43 ml 1X TAE. Saskalina, lai sadalītu lielus sakopojumus.
2. Agarozes maisījumu karsē mikroviļņu krāsnī, līdz tas pilnīgi izšķīdis (neļaujot iet pāri). Ļauj mazliet atdzist.
3. Pievieno 1,0 µl etīdija bromīda (10 mg/ml). Kolbu saskalina. Jāatzīmē, ka etīdija bromīds ir mutagēnisks, tāpēc, cik tās tas tehniski iespējams, šim solim vajadzētu izmantot citas ķīmikālijas, lai mazinātu riskus darbinieku veselībai¹.
4. Gēlu ielej veidnē ar ķemmīti. To pilnīgi atdzesē.
5. Gēlu ievieto aparātā. Gēlu pārklāj ar 1X TAE.
6. Katrim 10 µl PCR produkta pievieno 1 µl 6x uznešanas krāsas.
7. Paraugus ar pipeti ievieto iedobēs.
8. Veic elektroforēzi (konstanti 160 volti) ~20 min.

Agarozes gēla attēlu, kurā redzami tēviņiem un mātītēm raksturīgie raksti, sk. **1. attēlā**.

¹ Saskaņā ar 4. panta 1. punktu Eiropas Parlamenta un Padomes 2004. gada 29. aprīļa Direktīvā 2004/37/EK par darba ņēmēju aizsardzību pret risku, kas saistīts ar kancerogēnu vai mutagēnu iedarbību darbā (Sestā atsevišķā direktīva Padomes Direktīvas 89/391/EEK 16. panta 1. punkta nozīmē) (OV L 158, 30.4.2004., 50. lpp.).

1. **attēls.** Agarozes gēla attēls, kurā redzami tēviņam (♂) (viena josla, ~203 bp: DMRT1) un māītei (♀) (divas joslas, ~259 bp: DM-W un 203 bp:DMRT1) raksturīgie raksti.



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. papildinājums

VITELOGENĪNA MĒRĪŠANA

Vitelogenīnu (VTG) mēra, izmantojot imūnfermentatīvo analīzi (*ELISA*), kas sākotnēji izstrādāta melngalvas mailītes VTG mērīšanai (*Parks et al.*, 1999). Pašlaik *X. laevis* nav pieejamas nekādas komerciāli pieejamas antivielas. Tomēr, ņemot vērā, cik daudz ir informācijas par šo proteīnu un cik viegli pieejami ir izmaksēfektīvi komerciāli antivielu ieguves pakalpojumi, ir pamats domāt, ka laboratorijas varētu viegli izstrādāt *ELISA* šim mērījumam (*Olmstead et al.*, 2009). *Olmstead et al.* (2009) turklāt aprakstīts testa variants, kas pielāgots VTG mērīšanai *X. tropicalis* (sk. tālāk). Šajā metodē tiek izmantota antiViela pret *X. tropicalis* VTG, bet ir zināms, ka tā darbojas arī ar *X. laevis* VTG. Jāatzīmē, ka var izmantot arī nekonkurējošu *ELISA* un ka tai var būt mazāka noteikšanas robeža nekā tālāk aprakstītajai metodei.

Materiāli un reaģenti

- Iepriekš adsorbētas 1. antivielas (Av) serums

1 daļu seruma, kas satur 1. antivielu pret *X. tropicalis* VTG, sajauc ar 2 daļām tēviņu plazmas un atstāj istabas temperatūrā ~75 min, novieto uz ledus uz 30 min, 1 h centrifugē ar > 20 K x G 4 °C temperatūrā, nolej supernatantu, alikvotē un glabā -20 °C.
- 2. antiViela

kazu prettrušu IgG-HRP konjugāts (piem., *Bio-Rad* 172-1019)
- VTG etalons

attīrīts *X. laevis* VTG 3,3 mg/ml
- TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidīns) (piem., KPL 50-76-00 vai *Sigma* T0440)
- normālais kazu serums (*NGS*) (piem., *Chemicon*® S26-100 ml)
- 96 iedobju EIA polistirola mikrotitrēšanas plates (piem., ICN: 76-381-04, Costar:53590, Fisher:07-200-35)
- 37 °C hibridizācijas krāsns (vai ātras ekvilibācijas gaisinkubators) platēm, ūdens vanna stobriņiem
- Cits parasts laboratorijas aprīkojums, ķīmikālijas un piederumi.

Receptes

Klājbūferis (50 mM karbonātbūferis, pH 9,6)

NaHCO₃ 1,26 g

Na₂CO₃ 0,68 g

ūdens 428 ml

10X PBS (0,1 M fosfāta, 1,5 M NaCl):

NaH₂PO₄·H₂O 0,83 g

Na₂HPO₄·7 H₂O 20,1 g

NaCl 71 g

ūdens 810 ml

Skalošanas buferis (PBST):

10X PBS 100 ml

ūdens 900 ml

Koriģēt pH līdz 7,3 ar 1 M HCl, tad pievienot 0,5 ml *Tween-20*

Testa buferis:

normālais kazu serums (NGS) 3,75 ml

Skalošanas buferis 146,25 ml

Paraugu ņemšana

Ar heparinizētu mikrohematokritu caurulīti paņem asinis un liek uz ledus. Pēc 3 min ilgas centrifugēšanas caurulīti atzīmē, atlauž un plazmu izspiež 0,6 ml mikrocentrifūgas stobriņos, kas satur 0,13 vienības liofilizēta aprotinīna. (Šos stobriņus sagatavo iepriekš, tajos ievietojot pienācīgu aprotinīna daudzumu, tos sasaldējot un nelielā karstumā liofilizējot vakuumkoncentratorā, kamēr tie ir sausi.) Līdz analizēšanai plazmu glabā -80 °C.

Procedūra vienai platei

Plates pārklāšana

20 µl attīrīta VTG sajauc ar 22 ml karbonātbufera (galīgā koncentrācija: 3 µg/ml). Uz katru 96 iedobju plates iedobi pārnes 200 µl maisījuma. Plati pārklāj ar adhezīvu noslēdzošu plēvi un atstāj inkubēties 37 °C 2 h (vai 4 °C uz nakti).

Plates bloķēšana

2 ml normālā kazu seruma (NGS) pievienojot 38 ml karbonātbufera, sagatavo bloķējošo šķīdumu. Noņem pārklājšķīdumu un plati nokrata sausu. Uz katru iedobi pārnes 350 µl bloķējošā šķīduma. Plati pārklāj ar adhezīvu noslēdzošu plēvi un atstāj inkubēties 37 °C 2 h

(vai 4 °C uz nakti).

Etalonu sagatavošana

5,8 µl attīrīta VTG etalona vienreizlietojamā 12 x 75 mm borsilikāta stikla mēģenē sajauc ar 1,5 ml testa buferšķīduma. Tā iegūst 12 760 ng/ml. Tad veic sērijveida atšķaidīšanu, 750 µl testa buferšķīduma pievienojot 750 µl iepriekšējā atšķaidījuma, lai iegūtu šādas galīgās koncentrācijas: 12 760, 6380, 3190, 1595, 798, 399, 199, 100 un 50 ng/ml.

Paraugu sagatavošana

Sāk ar plazmas šķīdumu testa buferšķīdumā attiecībā 1:300 (piem., 1 µl plazmas sajauc ar 299 µl testa buferšķīduma) vai 1:30. Ja paredzams liels daudzums VTG, var būt vajadzīga papildu atšķaidīšana vai atšķaidīšana lielākā daudzumā. Jācenšas B/B₀ noturēt etalondiapazonā. Ja paraugā VTG nav manāms, piem., kontroles tēviņu un mātīšu (kas visi ir nenobrieduši) gadījumā, izmanto šķīdumu 1:30. Mazāk atšķaidīti paraugi var uzrādīt nevēlamu matricas ietekmi.

Ir ieteicams katrā platē veikt analīzi pozitīvam kontrolparaugam. To ņem no plazmas sakopojuma, kurā ir inducēts augsts VTG līmenis. Šo sakopojumu sākotnēji izšķīdina NGS, sadala alikvotās un glabā -80 °C. Katrai platei atkausē vienu alikvotu, to tālāk izšķīdina testa buferšķīdumā un analizē tāpat kā testējamo paraugu.

Inkubēšana ar 1. antivielu

1. Av sagatavo, iepriekš adsorbētas 1. Av serumu atšķaidot ar testa buferšķīdumu attiecībā 1:2000 (piem., 8 µl uz 16 ml testa buferšķīduma). 300 µl 1. Av šķīduma stikla stobriņā sajauc ar 300 µl parauga/etalona. Līdzīgi sagatavo B₀ stobriņu: 300 µl testa buferšķīduma un 300 µl antivielas. Un, izmantojot 600 µl testa buferšķīduma (tikai buferšķīdumu, bez Av), sagatavo NSB stobriņu. Stobriņus pārklāj ar parafilmu un uzmanīgi vorteksē, lai sajauktu. Uz 1 h inkubē 37 °C ūdens vannā.

Plates noskalošana

Tieši pirms 1. Av inkubācijas beigām plati noskalo. To izdara, izkratot saturu un nosusinot ar absorbējošu papīru. Tad iedobes piepilda ar 350 µl skalošanas šķīduma, to izlej un nosusina. Te noder daudzkanālu atkārtojumpipete vai plašu skalotājs. Skalošanas posmu atkārtoti vēl divas reizes (kopā skalo trīs reizes).

Plates uzpildīšana

Kad plate izskalota, stobriņus izņem no ūdens vannas un viegli vorteksē. Pievieno 200 µl no katra parauga, etalona, B₀ un NSB, lai plates iedobes būtu uzpildītas dubultā. Plati pārklāj ar adhēzīvu noslēdzošu plēvi un atstāj inkubēties 37 °C 1 h.

Inkubēšana ar 2. antivielu

Kad beigusies iepriekšējā posmā aprakstītā inkubācija, plati atkal trīs reizes izskalo, kā aprakstīts iepriekš. Atšķaidīto 2. Av sagatavo, 2,5 µl 2. Av sajaucot ar 50 ml testa buferšķīduma. Uz katru iedobi pārnes 200 µl atšķaidītas 2. Av, noslēdz kā iepriekš un atstāj inkubēties 37 °C 1 h.

Substrāta pievienošana

Kad inkubācija ar 2. Av ir pabeigta, plati trīs reizes izskalo, kā aprakstīts iepriekš. Tad uz katru iedobi pārnes 100 µl TMB substrāta. Reakcijai ļauj turpināties 10 min, vēlams, ne spilgtā gaismā. Reakciju izbeidz, pievienojot 100 µl 1 M fosforskābes. Krāsai jāmainās no zilās uz koši dzeltenu. Ar mikroplašu lasītāju izmēra absorbciju pie 450 nm.

B/B₀ aprēķināšana

No visiem mērījumiem atskaita vidējo NSB vērtību. Katra parauga un etalona B/B₀ aprēķina, absorbcijas vērtību (B) dalot ar vidējo absorbciju paraugā B₀.

Standartlīknes iegūšana un nezināmo noskaidrošana

Ar grafiku datorprogrammatūru (piem., *Slidewrite*TM vai *Sigma Plot*[®]) iegūst standartlīkni, kas parauga B/B₀ ekstrapolē, balstoties uz etalonu B/B₀. Parasti daudzumu atliek uz logaritmiskas skalas un līkne ir sigmoīda. Tomēr, ja izmanto šauru etalonu diapazonu, tā var izskatīties lineāra. Paraugu daudzumus koriģē pēc atšķaidījuma koeficienta un pārskatā norāda kā mg VTG uz ml plazmas.

Minimālo noteikšanas robežu noteikšana

Bieži vien (it sevišķi normālu tēviņu gadījumā) var nebūt skaidrs, kā norādīt rezultātus, kas iegūti no zemām vērtībām. Šādos gadījumos to, vai vērtība norādāma kā nulle vai cits skaitlis, nosaka ar 95 % ticamības intervālu. Ja parauga rezultāts ir nulles etalona (B₀) ticamības intervāla robežās, rezultāts norādāms kā nulle. Minimālais noteikšanas līmenis ir zemākais etalons, kas pastāvīgi atšķiras no nulles etalona; t. i., abi ticamības intervāli nepārklājas. Ja parauga rezultāts ir minimālās noteikšanas līmeņa ticamības intervāla robežās vai to pārsniedz, ziņo aprēķināto vērtību. Ja paraugs ir robežās no nulles standarta līdz minimālā noteikšanas līmeņa intervālam, kā parauga vērtību ziņo pusi no minimālā noteikšanas līmeņa.

LITERATŪRA

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

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan

CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 123: 113-125.

7. papildinājums

STATISTISKĀ ANALĪZE

Testā *LAGDA* iegūst trīs veidu statistiski analizējamus datus: 1) kvantitatīvi nepārtrauktu beigupunktu dati, 2) “laiks līdz notikumam” tipa dati, kas raksturo attīstības gaitu laika griezumā (t. i., laiks līdz 62. NF stadijai) un 3) ordināli dati, kas ir smaguma atzīmes vai ontogēnētiskās stadijas no histopatoloģiskajiem izvērtējumiem. Diagramma, pēc kuras pieņemams lēmums par ieteicamo statistisko analīzi testam *LAGDA*, ir sniegta 1. attēlā. Turklāt tālāk sniegtas dažas piezīmes, kas var noderēt, veicot *LAGDA* mērījumu statistisko analīzi. Mirstības, pieauguma (masa un garums) un hepatosomatiskā indeksa (HSI) mērījumu rezultāti diagrammā, pēc kuras pieņem lēmumu par analīzi, būtu jāanalizē pēc diagrammas atzara “Citi beigupunkti”.

Nepārtrauktu beigupunktu dati

Vispirms jāpārbauda, vai nepārtrauktu beigupunktu dati ir monotoni, tos hierarhizējot, piemēklējot *ANOVA* modeli un salīdzinot lineāros un kvadrātiskos kontrastus. Ja dati ir monotoni, veic descendentu Džonkhīra–Terpstras trenda testu ar replikātu mediānām un neveic nekādu tālāku analīzi. Normālsadalītiem datiem ar homogēnām dispersijām var izmantot arī descendento Viljamsa testu. Ja dati nav monotoni (kvadrātiskais kontrasts nozīmīgs un lineārais nenožīmīgs), tie jāanalizē, izmantojot jaukto efektu *ANOVA* modeli. Tad jāpārbauda datu normalitāte (vēlams, ar Šapiro–Vilka vai Andersona–Dārlinga testu) un dispersijas homogenitāte (vēlams, ar Levīna testu). Abus testus veic ar jaukto efektu *ANOVA* modeļa atlikumiem. Formālo normalitātes un dispersijas homogenitātes testu vietā var izmantot ekspertu atzinumus, bet priekšroka dodama formālajiem testiem. Ja dati ir normālsadalīti un dispersija ir homogēna, ir izpildīti jaukto efektu *ANOVA* pieņēmumi un nozīmīgu apstrādes ietekmi var noteikt ar Daneta testu. Ja tiek konstatēta nenormalitāte vai dispersijas heterogenitāte, ir pārkāpti Daneta testa pieņēmumi un ir jāveic normalizējoša, dispersiju stabilizējoša transformācija. Ja šādu transformāciju atrast neizdodas, nozīmīgu apstrādes ietekmi nosaka ar Dannas testu. Kad vien iespējams, veic vienpusēju, nevis abpusēju testu, bet tas, kurš test konkrētam beigupunkta ir piemērots, ir jāizspriež speciālistam.

Mirstība

Dati par mirstību jāanalizē par laiku, kas aptver visu testu, un izsakāmi kā procentuālā daļa dzīvnieku, kas konkrētā tvertnē miruši. Kurkuļi, kuru metamorfoze nenoslēdzas dotajā laikposmā, kurkuļi, kas ir kāpuru apakšparauga kohortā, atlasē atmettie varžu mazuļi un visi dzīvnieki, kas mirst eksperimentatora kļūdas dēļ, ietverami cenzētajos datos, un procentu aprēķina saucējā tos neiekļauj. Pirms jebkādu statistisko analīžu veikšanas mirstības proporcijām jāveic arksinusa–kvadrātsaknes transformācija. Alternatīva ir izmantot descendentu Kohrana–Ārmitidža testu, vēlams, ar Rao–Skota korekciju, ja izkļiede ir pārmērīga.

Masa un garums (pieauguma dati)

Tēviņi un mātītes metamorfozes laikā nav dzimumdimorfi, tāpēc kāpuru apakšparauguma pieauguma datus analizē neatkarīgi no dzimuma. Savukārt mazuļu pieauguma datus analizē atsevišķi pēc ģenētiskā dzimuma. Šiem beigupunktiem var būt jāveic logaritmiska transformācija, jo dati par lielumu bieži vien ir lognormāli.

Hepatosomatiskais indekss (HSI)

Aknu masu normalizē kā visa ķermeņa masas proporciju (t. i., HSI) un analizē atsevišķi pēc ģenētiskā dzimuma.

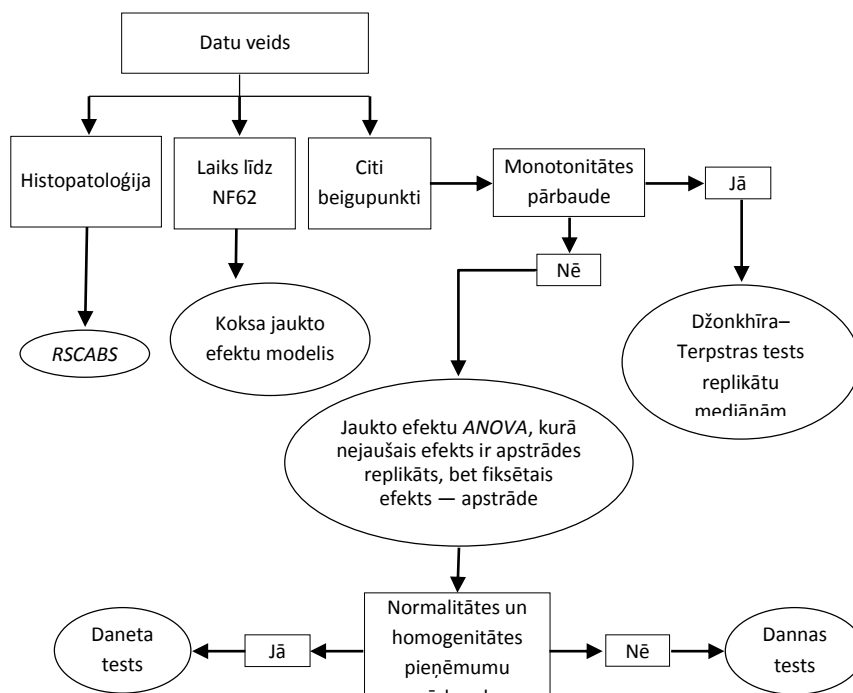
Laiks līdz 62. NF stadijai

Dati par laiku līdz metamorfozei apstrādājami kā dati par laiku līdz notikumam, un nāves gadījumi vai tas, ka īpatnis nenasniedz 62. NF stadiju 70 dienās, jāuztver kā labēji cenzēti dati (t. i., patiesā vērtība pārsniedz 70 dienas, bet pētījums beidzas, pirms dzīvnieki 70 dienās sasnieguši 62. NF stadiju). Testa beigu dienu nosaka pēc medianālā laika līdz 62. NF stadijai (metamorfozes beigās) atšķaidīšanas ūdens kontrolēs. Medianālo laiku līdz metamorfozes beigām var noteikt ar Kaplana–Meiera reizinājuma robežas novērtētājiem. Šis beigupunkts jāanalizē, izmantojot jaukto efektu Koksa proporcionālo apdraudējumu modeli, kurā ņem vērā pētījuma replikātu struktūru.

Histopatoloģiskie dati (smaguma atzīmes un ontoģenētiskās stadijas)

Histopatoloģiskie dati tiek iegūti smaguma atzīmju vai ontoģenētisko stadiju formā. Testā *RSCABS* (Rao–Scott Cochran–Armitage by Slices) katram histopatoloģiskās atbildreakcijas smaguma līmenim tiek izmantots descendents Kohrana–Ārmitidža trenda tests ar Rao–Skota korekciju (Green et al., 2014). Rao–Skota korekcija testā ļauj ņemt vērā eksperimenta plānu ar replikātraukiem. Procedūra *by Slices* ietver bioloģisko ekspektāciju, ka ietekmes smagums pieaugs, palielinoties devai vai koncentrācijai, vienlaikus saglabājot īpatņu atzīmes un atspoguļojot konstatētās ietekmes smagumu. Procedūra *RSCABS* ne vien nosaka, kuras apstrādes statistiski atšķiras no kontrolēm (t. i., kurām novērojamas smagākas patoloģijas nekā kontrolēm), bet arī nosaka, pie kādas smaguma atzīmes atšķirība konstatējama, tā analīzei dodot vajadzīgo kontekstu. Kas attiecas uz gonādu un reproduktīvo kanālu ontoģenētiskās stadijas noteikšanu, ar datiem jāveic papildu manipulācijas, jo viens no *RSCABS* pieņēmumiem ir: ietekmes smagums pieaug līdz ar devas palielināšanos. Novērotā ietekme var būt attīstības aizkavēšanās vai paātrināšanās. Tāpēc dati par ontoģenētiskajām stadijām būtu jāanalizē tādi, kādi norādīti, lai noteiktu attīstības paātrinājumu, bet tad manuāli jāinvertē pirms otrās analīzes, ar kuru nosaka attīstības palēninājumu.

1. attēls. Diagramma, pēc kuras pieņemams lēmums par ieteicamo statistisko analīzi testa *LAGDA* datiem.



LITERATŪRA

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

8. papildinājums

APSVĒRUMI, KAS SAISTĪTI AR SKOLIOZES GADĪJUMU APSEKOŠANU UN MINIMALIZĒŠANU

Testa populācijās morfoloģiskos un uzvedības novērojumus var apgrūtināt idiopātiska skolioze, kas *Xenopus laevis* kurkuļos parasti izpaužas kā saliekta aste. Jācenšas minimalizēt vai pavisam novērst skoliozes incidenci, gan krājumā, gan testa apstākļos. Galīgajā testā ieteicams panākt, ka vidējas un smagas skoliozes prevalence nesasniedz 10 %, lai uzlabotu ticamību, ka ar testu var detektēt ar apstrādi saistītu ontogēnētisko ietekmi uz citādi veselīgiem abinieku kāpuriem.

Dienišķajos novērojumos galīgā testa laikā jāreģistrē gan skoliozes incidence (īpatņu skaits), gan smagums, ja tā novērojama. Jāraksturo anormālijas vieta (piem., pirms kloākas vai aiz tās) un izliekuma virziens (piem., laterāls vai dorsoventrāls — virzienā no muguras uz vēderu). Skoliozes smagumu var vērtēt ar šādām atzīmēm:

N (neizteikta) — izliekuma nav;

(1) minimāla — viegls laterāls izliekums aiz kloākas, novērojams tikai miera stāvoklī;

(2) vidēja — laterāls izliekums aiz kloākas, novērojams pastāvīgi, bet kustības netraucē;

(3) smaga — laterāls izliekums pirms kloākas VAI jebkāds izliekums, kas traucē kustēties, VAI jebkāds dorsoventrāls izliekums.

ASV VAA *FIFRA* zinātniskā konsultatīvā panelgrupa (*FIFRA SAP 2013*) izskatīja datu kopsavilkumu par skoliozi piecpadsmit abinieku metamorfozes testos ar *X. laevis* (no 51. NF stadijas līdz posmam pēc 60. stadijas) un sniedza vispārīgus ieteikumus, kā testa populācijās šīs anormālijas prevalenci mazināt. Lai gan *LAGDA* ontogēnētiskais laika griezumums ir plašāks, tie ir relevanti arī šim testam.

Vēsturiskie nārsta rādītāji

Par vaislas pāriem principā jāizmanto kvalitatīvi, veseli pieauguši īpatņi; likvidējot vaislas pārus, kuru pēcnācējiem ir skolioze, tās gadījumu skaitu laika gaitā var mazināt. Konkrētāk, var būt lietderīgi minimalizēt savvaļā sagūstītu nārsta baru izmantošanu. Testā *LAGDA* ekspozīcijas periodu sāk ar 8.–10. NF stadiju sasniegušiem embrijiem, un nav iespējams testa sākumā noteikt, vai konkrētiem īpatņiem parādīsies skolioze. Tāpēc līdzās skoliozes incidences apsekošanai testa dzīvniekos būtu jādokumentē vēsturiskie ikru kamolu rādītāji (arī skoliozes prevalence kāpuros, kam ļauj attīstīties). Var būt lietderīgi turpināt monitorēt to katra kamola ikru daļu, ko konkrētā pētījumā neizmanto, un novērojumus iekļaut pārskatā (*FIFRA SAP 2013*).

Ūdens kvalitāte

Ir svarīgi gan laboratorijas krājumā, gan testā nodrošināt pietiekamu ūdens kvalitāti. Līdzās ūdens kvalitātes kritērijiem, ko tipiski izvērtē ūdenstoksiskuma testos, var būt lietderīgi monitorējot sekot līdzi, vai nav konstatējama barības vielu nepietiekamība (piem., C vitamīna, kalcija, fosfora nepietiekamība) vai selēna vai vara pārdaudzums, un to izlabot; ir ziņas ka šie apstākļi dažādos apmēros izraisa skoliozi laboratorijā audzētos *Rana* sp. un *Xenopus* sp. dzīvniekos (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; pēc FIFRA SAP 2013 ziņām). Ūdens kvalitāti un testa īpatņu veselību parasti uzlabo piemērots dietārais režīms (sk. 4. papildinājumu) un regulāra tvertnes tīrīšana.

Diēta

Konkrēti ieteikumi attiecībā uz dietāro režīmu (par kuriem zināms, ka tie labi der testam LAGDA) sniegti 4. papildinājumā. Ieteicams barības avotus pārbaudīt uz bioloģiskiem toksīniem, herbicīdiem un citiem pesticīdiem, par kuriem zināms, ka tie *X. laevis* vai citos ūdensdzīvniekos izraisa skoliozi (Schlenk and Jenkins 2013). Piemēram, ar skoliozi zivīs (Schultz *et al.* 1985) un vardēs (Bacchetta *et al.* 2008) asociēta eksponētība dažiem holīnesterāzes inhibitoriem.

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

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