

Bruksela, 25 lutego 2019 r.
(OR. en)

6800/19
ADD 2

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

PISMO PRZEWODNIE

Od:	Komisja Europejska
Data otrzymania:	22 lutego 2019 r.
Do:	Sekretariat Generalny Rady

Nr dok. Kom.:	Annex to D060575/02
Dotyczy:	ZAŁĄCZNIK DO ROZPORZĄDZENIA KOMISJI (UE) .../... z dnia XXX r. zmieniające, w celu dostosowania do postępu technicznego, załącznik do rozporządzenia (WE) nr 440/2008 ustalającego metody badań zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH)

Delegacje otrzymują w załączeniu dokument Annex to D060575/02.

Załącznik: Annex to D060575/02

B.71 TESTY DZIAŁANIA UCZULAJĄCEGO NA SKÓRĘ *IN VITRO* DOTYCZĄCE KLUCZOWEGO ZDARZENIA AKTYWACJI KOMÓREK DENDRYTYCZNYCH W MECHANIZMIE WYWOŁYWANIA SKUTKÓW SZKODLIWYCH W ZAKRESIE DZIAŁANIA UCZULAJĄCEGO NA SKÓRĘ

WPROWADZENIE OGÓLNE

Metoda badawcza oparta na kluczowym zdarzeniu aktywacji komórek dendrytycznych

1. Substancja działająca uczulająco na skórę oznacza substancję, która wywołuje reakcję alergiczną w następstwie kontaktu ze skórą, zgodnie z definicją określoną przez Globalny Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów ONZ (ONZ GHS) (1) oraz w rozporządzeniu Unii Europejskiej (WE) nr 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin (CLP)¹. Panuje ogólna zgoda co do kluczowych zdarzeń biologicznych stanowiących podstawę działania uczulającego na skórę. Istniejącą wiedzę dotyczącą mechanizmów chemicznych i biologicznych powiązanych z działaniem uczulającym na skórę podsumowano w formie mechanizmu wywoływania skutków szkodliwych w ramach programu OECD dotyczącego mechanizmu wywoływania skutków szkodliwych (2), poczynwszy od molekularnego zdarzenia inicjującego poprzez zdarzenia pośrednie aż do skutku szkodliwego, tj. alergicznego kontaktowego zapalenia skóry. Na przykład molekularnym zdarzeniem inicjującym (tj. pierwszym kluczowym zdarzeniem) jest wiązanie kowalencyjne substancji elektrofilowych z centrami nukleofilowymi w białkach skóry. Drugie kluczowe zdarzenie w tym mechanizmie wywoływania skutków szkodliwych następuje w keratynocytach i obejmuje reakcje zapalne oraz zmiany w ekspresji genów powiązane ze specyficznymi mechanizmami sygnalizacji komórkowej, takimi jak mechanizmy zależne od elementu odpowiedzi antyoksydacyjnej/elektrofilowej (ARE). Trzecim kluczowym zdarzeniem jest aktywacja komórek dendrytycznych, na ogół oceniana na podstawie ekspresji specyficznych markerów powierzchniowych komórki, chemokinów i cytokinów. Czwartym kluczowym zdarzeniem jest aktywacja i proliferacja limfocytów T, która jest

¹ Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006, Dz.U. L 353 z 31.12.2008, s. 1.

oceniana pośrednio w ramach testu lokalnych węzłów chłonnych przeprowadzonego na myszach (LLNA) (3).

2. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 442E (2017). Opisano w niej testy *in vitro*, które dotyczą mechanizmów opisanych na podstawie kluczowego zdarzenia aktywacji komórek dendrytycznych w mechanizmie wywoływania skutków szkodliwych w zakresie działania uczulającego na skórę (2). Metoda badawcza uwzględnia badania, które należy stosować do wsparcia rozróżnienia substancji działających uczulająco na skórę i substancji niewykazujących takiego działania zgodnie z GHS ONZ i rozporządzeniem CLP.

W niniejszej metodzie badawczej opisano następujące badania:

- badanie aktywacji ludzkich linii komórkowych (h-CLAT);
 - badanie aktywacji linii komórkowej U937 (U-SENS™)
 - test genu reporterowego Interleukiny 8 (test IL-8 Luc).
3. Badania uwzględnione w niniejszej metodzie badawczej i odpowiedniej wytycznej OECD dotyczącej badań mogą różnić się w zależności od procedury wykorzystywanej do generowania danych i odczytów pomiarów, lecz mogą być stosowane bez rozróżnienia na potrzeby spełnienia wymogów poszczególnych państw w zakresie wyników badań nad kluczowym zdarzeniem aktywacji komórek dendrytycznych w mechanizmie wywoływania skutków szkodliwych w zakresie działania uczulającego na skórę, przy jednoczesnym wykorzystaniu wzajemnej akceptacji danych OECD.

Kontekst i zasady badań prowadzonych z wykorzystaniem metody badawczej opartej na kluczowym zdarzeniu

4. Ocena działania uczulającego na skórę obejmuje na ogół wykorzystanie zwierząt laboratoryjnych. W przypadku klasycznych metod, w których wykorzystuje się świnki morskie, tj. testu maksymalizacji na świnkach morskich (Magnussona-Kligmana) (test GPMT) oraz testu Buehlera (metody badawczej B.6) (4), ocenia się zarówno fazę indukcyjną, jak i fazę wywołania działania uczulającego na skórę. Przeprowadzany na myszach test lokalnych węzłów chłonnych (LLNA) (metoda badawcza B.42) (3) oraz jego dwie nieradioaktywne modyfikacje, LLNA: DA (metoda badawcza B.50) (5) i LLNA: BrdU-ELISA (metoda badawcza B.51) (6), w ramach których ocenia się wyłącznie reakcję indukcyjną, także zyskały akceptację, ponieważ zapewniają one przewagę nad testami prowadzonymi na świnkach morskich pod względem dobrostanu zwierząt i obiektywnego pomiaru fazy indukcyjnej działania uczulającego na skórę.

5. Niedawno przyjęto, oparte na analizie mechanistycznej, metody badawcze *in chemico* i *in vitro* dotyczące pierwszego kluczowego zdarzenia (metoda badawcza B.59; bezpośrednie oznaczanie reaktywności peptydów (7)) i drugiego kluczowego zdarzenia (metoda badawcza B.60; metoda badawcza z wykorzystaniem lucyferazy ARE-Nrf2 (8)) w mechanizmie wywoływania skutków szkodliwych w zakresie działania uczulającego na skórę jako metody ułatwiające ocenę zagrożenia działaniem uczulającym na skórę substancji chemicznych.
6. Badania opisane w niniejszej metodzie badawczej pozwalają określić ilościowo zmianę ekspresji markera powierzchniowego (markerów powierzchniowych) komórki związanego z procesem aktywacji monocytów i komórek dendrytycznych po narażeniu na działanie czynników uczulających (np. CD54, CD86) albo zmiany ekspresji IL-8 – cytokiny związanej z aktywacją komórek dendrytycznych. Zgłoszono, że substancje działające uczulająco na skórę wywołują ekspresję markerów błony komórkowej, takich jak CD40, CD54, CD80, CD83 i CD86 dodatkowo oprócz indukcji prozapalnych cytokin, takich jak IL-1 β i TNF- α , i szeregu chemokinów, takich jak IL-8 (CXCL8) i CCL3 (9)(10)(11)(12), związanych z aktywacją komórek dendrytycznych (2).
7. Ponieważ aktywacja komórek dendrytycznych stanowi jednak tylko jedno kluczowe zdarzenie inicjujące mechanizm wywoływania skutków szkodliwych w zakresie działania uczulającego na skórę (2)(13), informacje wygenerowane przy użyciu samych tylko markerów badań aktywacji komórek dendrytycznych mogą nie być wystarczające do tego, aby stwierdzić występowanie lub brak występowania potencjalnego działania uczulającego na skórę substancji chemicznych. Dlatego też proponuje się, aby dane wygenerowane przy zastosowaniu testów opisanych w niniejszej metodzie badawczej stosować do wsparcia rozróżnienia substancji działających uczulająco na skórę (tj. należących do kategorii 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) i substancji niewykazujących takiego działania w przypadku ich wykorzystania w ramach zintegrowanych podejść do badań i oceny (IATA), wraz z innymi istotnymi informacjami uzupełniającymi, np. pochodzącymi z testów *in vitro*, odnoszącymi się do innych kluczowych zdarzeń inicjujących mechanizm wywoływania skutków szkodliwych w zakresie działania uczulającego na skórę, jak również pochodzącymi z metod niebadawczych, w tym danych z podejść przekrojowych z zastosowaniem analogicznych substancji chemicznych (13). Przykłady wykorzystania danych wygenerowanych w tych badaniach w ramach zdefiniowanego podejścia, tj. podejścia ujednoliconego zarówno pod kątem zbioru wykorzystywanych źródeł informacji, jak i procedury stosowanej w odniesieniu do danych w celu uzyskania prognoz, zostały opublikowane (13) i mogą zostać wykorzystane jako użyteczne elementy w ramach IATA.
8. Badań opisanych w niniejszej metodzie badawczej nie można stosować samodzielnie w celu dalszego klasyfikowania substancji działających uczulająco na skórę do podkategorii

1A i 1B, zgodnie z GHS ONZ / rozporządzeniem CLP przez organy realizujące podział na te dwie kategorie, ani w celu przewidzenia ich siły działania na potrzeby podjęcia decyzji dotyczących oceny bezpieczeństwa. Jednakże w zależności od ram regulacyjnych do zaklasyfikowania substancji chemicznej do kategorii 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP można wykorzystać same wyniki dodatnie wygenerowane przy zastosowaniu tych metod.

9. Termin „badana substancja chemiczna” jest używany w niniejszej metodzie badawczej w odniesieniu do substancji będącej przedmiotem badania¹ i nie jest powiązany z możliwością zastosowania badań do badania substancji jednoskładnikowych, substancji wieloskładnikowych lub mieszanin. Aktualnie dostępne są ograniczone informacje na temat możliwości zastosowania badań do substancji wieloskładnikowych / mieszanin (14)(15). Z technicznego punktu widzenia badania mogą jednak mieć zastosowanie do badania zarówno substancji wieloskładnikowych, jak i mieszanin. Przed zastosowaniem niniejszej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy jednak zastanowić się nad tym, czy zastosowanie niniejszej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak – dlaczego². Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny. Ponadto podczas badania substancji wieloskładnikowych lub mieszanin należy rozważyć możliwe zakłócenie obserwowanych reakcji przez składniki cytotoksyczne.

¹ W czerwcu 2013 r. na posiedzeniu wspólnym OECD uzgodniono, że – w przypadkach, w których będzie to możliwe – w nowych, zaktualizowanych wytycznych dotyczących badań należy bardziej konsekwentnie stosować termin „badana substancja chemiczna” w odniesieniu do substancji będącej przedmiotem badania.

² To zdanie zaproponowano i uzgodniono podczas posiedzenia grupy roboczej krajowych koordynatorów programu wytycznych dotyczących badań w kwietniu 2014 r.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Organizacja Narodów Zjednoczonych (ONZ) (2015). Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS). Wydanie szóste zmienione. Nowy Jork i Genewa: publikacje Organizacji Narodów Zjednoczonych. ISBN:978-92-1-117006-1. Dostępne na stronie internetowej:
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. Seria dotycząca badań i oceny nr 168. Dostępne na stronie internetowej:
[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) Rozdział B.42 niniejszego załącznika: Badanie lokalnych węzłów chłonnych. Rozdział B.6 niniejszego załącznika: Sensybilizacja skóry.
- (4) Rozdział B.50 niniejszego załącznika: Działanie uczulające na skórę: badanie lokalnych węzłów chłonnych DA.
- (5) Rozdział B.51 niniejszego załącznika: Działanie uczulające na skórę: badanie lokalnych węzłów chłonnych BrdU-ELISA.
- (6) Rozdział B.59 niniejszego załącznika: Działanie uczulające na skórę *in chemico*: Bezpośrednie oznaczanie reaktywności peptydów (DPRA).
- (7) Rozdział B.60 niniejszego załącznika: Badanie działania uczulającego na skórę *in vitro*: metoda badawcza z wykorzystaniem lucyferazy ARE-Nrf2.
- (8) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271-96.
- (9) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL i 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 i 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 i 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). Seria dotycząca badań i oceny nr 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, załącznik 1 i załącznik 2. ENV/JM/HA(2016)29. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju. Dostępne na stronie internetowej: <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.

Dodatek 1

BADANIE DZIAŁANIA UCZULAJĄCEGO NA SKÓRĘ *IN VITRO*: BADANIE AKTYWACJI LUDZKICH LINII KOMÓRKOWYCH (H-CLAT)

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

1. Badanie h-CLAT pozwala określić ilościowo zmianę ekspresji markerów powierzchniowych komórek związanych z procesem aktywacji monocytów i komórek dendrytycznych (tj. CD86 i CD54) w ludzkiej białaczkowej linii monocytarnej THP-1 po narażeniu na działanie czynników uczulających (1)(2). Pomiary poziomów ekspresji markerów powierzchniowych komórek CD86 i CD54 wykorzystuje się później do wsparcia rozróżnienia substancji działających uczulająco na skórę i substancji niewykazujących takiego działania.
2. Badanie h-CLAT oceniono w ramach badania walidacyjnego koordynowanego przez laboratorium referencyjne Unii Europejskiej ds. metod alternatywnych wobec testów na zwierzętach (EURL ECVAM) i późniejszej niezależnej wzajemnej oceny przeprowadzonej przez Naukowy Komitet Doradczy EURL ECVAM (ESAC). Uwzględniając wszystkie dostępne dowody i wkład ze strony organów regulacyjnych i zainteresowanych stron, EURL ECVAM (3) zaleciło stosowanie badania h-CLAT w ramach IATA do wsparcia rozróżnienia substancji działających uczulająco i substancji niewykazujących takiego działania na potrzeby klasyfikacji i oznakowania pod względem zagrożeń. Przykłady wykorzystania danych z badania h-CLAT w połączeniu z innymi informacjami są opisane w literaturze (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).
3. Udowodniono, że badanie h-CLAT można przeprowadzać również w laboratoriach posiadających doświadczenie w zakresie technik związanych z kulturą komórkową i analizą przy użyciu cytometrii przepływowej. Poziom odtwarzalności prognoz, którego można oczekiwać od tego badania, ma wartość rzędu 80 % wewnątrz laboratoriów i pomiędzy nimi (3)(12). Wyniki uzyskane w badaniu walidacyjnym (13) i innych opublikowanych badaniach (14) ogólnie wskazują na to, że – w porównaniu z wynikami LLNA – dokładność rozróżniania substancji działających uczulająco na skórę (tj. należących do kategorii 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) i substancji niewykazujących takiego działania wynosi 85 % (N = 142) przy czułości na poziomie 93 % (94/101) oraz swoistości na poziomie 66 % (27/41) (na podstawie ponownej analizy wykonanej przez EURL ECVAM (12) przy uwzględnieniu wszystkich istniejących danych, ale nie uwzględniając ujemnych wyników substancji chemicznych, których log K_{ow} wynosi powyżej 3,5 zgodnie z opisem z pkt 4). Prawdopodobieństwo wystąpienia prognoz fałszywie ujemnych przy zastosowaniu metody h-CLAT jest większe w

przypadku substancji chemicznych wykazujących niską lub średnią siłę działania uczulającego na skórę (tj. należących do podkategorii 1B wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) niż w przypadku substancji wykazujących wysoką siłę działania uczulającego na skórę (tj. należących do podkategorii 1A wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) (4)(13)(15). Wszystkie te informacje łącznie wskazują na użyteczność metody h-CLAT w identyfikowaniu zagrożeń związanych z działaniem uczulającym na skórę. Przedstawione tutaj wartości dokładności h-CLAT jako samodzielnego badania są jednak wyłącznie orientacyjne, ponieważ badanie to należy rozpatrywać w połączeniu z innymi źródłami informacji w kontekście IATA i zgodnie z przepisami pkt 7 i 8 wprowadzenia ogólnego. Co więcej, przy ocenie metod niewymagających wykorzystania zwierząt pod kątem działania uczulającego na skórę należy pamiętać, że LLNA, jak również inne badania przeprowadzane na zwierzętach, mogą nie w pełni odzwierciedlać sytuację w odniesieniu do ludzi.

4. Na podstawie obecnie dostępnych danych wykazano, że metoda h-CLAT ma zastosowanie do badanych substancji chemicznych obejmujących szereg organicznych grup funkcyjnych, mechanizmów reagowania, sił działania uczulającego na skórę (jak określono w badaniach *in vivo*) oraz właściwości fizykochemicznych (3)(14)(15). Metoda h-CLAT ma zastosowanie do badanych substancji chemicznych, które są rozpuszczalne lub tworzą stabilną dyspersję (tj. koloid lub zawiesinę, w których badana substancja chemiczna nie osadza się ani nie oddziela od rozpuszczalnika/nośnika w różne fazy) w odpowiednim rozpuszczalniku/nośniku (zob. pkt 14). Badane substancje chemiczne o log K_{ow} powyżej 3,5 mają tendencję do generowania wyników fałszywie ujemnych (14). Dlatego nie powinno się uwzględniać wyników ujemnych badanych substancji chemicznych, których log K_{ow} jest wyższy od 3,5. Wyniki dodatnie badanych substancji chemicznych, których log K_{ow} jest wyższy od 3,5, można jednak dalej wykorzystywać do wsparcia identyfikacji badanej substancji chemicznej jako substancji działającej uczulająco na skórę. Ponadto z powodu ograniczonej wydolności metabolicznej zastosowanych linii komórkowych (16) oraz warunków doświadczalnych prohapteny (tj. substancje wymagające aktywacji enzymatycznej np. przez enzymy P450) oraz prehapteny (tj. substancje aktywowane przez utlenianie), w szczególności te o niskim tempie utleniania, również mogą dawać wyniki ujemne w h-CLAT (15). Fluorescencyjne badane substancje chemiczne można ocenić za pomocą badania h-CLAT (17), jednak badane substancje chemiczne o wysokiej fluorescencji emitujące fale tej samej długości co izotiocyanian fluoresceiny (FITC) lub jodek propidyny będą zakłócać detekcję przy użyciu cytometrii przepływowej, co uniemożliwia ich prawidłową ocenę z wykorzystaniem przeciwciał skoniugowanych z FITC lub jodku propidyny. W takim przypadku można użyć odpowiednio innych przeciwciał znakowanych fluorochromem lub innych markerów cytotoksyczności, o ile można wykazać, że pozwalają one uzyskać wyniki podobne do wyników otrzymywanych w przypadku przeciwciał znakowanych FITC (zob. pkt 24) lub jodku propidyny (zob.

pkt 18), np. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości wymienionych w dodatku 1–2. W świetle powyższego wyniki ujemne należy interpretować w kontekście zdefiniowanych ograniczeń i w połączeniu z innymi źródłami informacji w ramach IATA. W przypadkach, w których można przedstawić dowody na brak możliwości zastosowania metody h-CLAT w odniesieniu do innych konkretnych kategorii badanych substancji chemicznych, nie należy jej stosować w odniesieniu do tych konkretnych kategorii.

5. Jak opisano powyżej, metoda h-CLAT wspiera rozróżnienie substancji działających uczulająco na skórę i substancji niewykazujących takiego działania. Może ona jednak również potencjalnie wpłynąć na ocenę siły działania uczulającego (4)(5)(9), gdy stosuje się ją w ramach podejść zintegrowanych takich jak IATA. Wymagane jest jednak przeprowadzenie dalszych prac, najlepiej na podstawie danych dotyczących ludzi, aby ustalić, w jaki sposób wyniki badania h-CLAT mogą potencjalnie wpłynąć na ocenę siły działania.
6. Definicje znajdują się w dodatku 1.1.

ZASADA BADANIA

7. Metoda h-CLAT jest testem *in vitro*, który pozwala określić ilościowo zmiany ekspresji markera powierzchniowego komórki (tj. CD86 i CD54) w ludzkiej linii komórkowej białaczki monocytarnej, tj. komórkach THP-1, po 24 godzinach narażenia na działanie badanej substancji chemicznej. Te cząsteczki powierzchniowe są typowymi markerami aktywacji monocytarnej THP-1 i mogą imitować aktywację komórek dendrytycznych, która odgrywa kluczową rolę w uczulaniu limfocytów T. Zmiany ekspresji markera powierzchniowego mierzy się za pomocą cytometrii przepływowej po wybarwieniu komórek przeciwciałami znakowanymi fluorochromem. Jednocześnie przeprowadza się również pomiar cytotoksyczności, aby ocenić, czy podwyższona ekspresja markera powierzchniowego zachodzi przy stężeniach niższych niż stężenia cytotoksyczne. Względną intensywność fluorescencji markerów powierzchniowych w porównaniu z kontrolą z rozpuszczalnikiem/nośnikiem wylicza się i wykorzystuje w modelu prognozowania (zob. pkt 26), aby wesprzeć rozróżnienie substancji działających uczulająco i substancji niewykazujących takiego działania.

WYKAZANIE BIEGŁOŚCI

8. Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania badania opisanego w niniejszym dodatku do metody badawczej B.71 laboratorium powinny wykazać swoją biegłość techniczną z zastosowaniem dziesięciu substancji służących do wykazania biegłości wymienionych w dodatku 1.2. Ponadto użytkownicy badania powinni prowadzić bazę danych historycznych

wygenerowanych podczas kontroli reaktywności (zob. pkt 11) oraz kontroli dodatnich i kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem (zob. pkt 20–22), a także wykorzystywać te dane do potwierdzenia zachowania odtwarzalności badania w swoim laboratorium w miarę upływu czasu.

PROCEDURA

9. Podstawę niniejszego badania stanowi protokół nr 158 bazy danych na temat metod alternatywnych wobec testów na zwierzętach (DB-ALM) dotyczący h-CLAT (18), który reprezentuje protokół wykorzystany w badaniu walidacyjnym koordynowanym przez EURL ECVAM. Zaleca się, aby ten protokół był stosowany przy wdrażaniu i stosowaniu metody h-CLAT w laboratorium. Poniżej opisano główne elementy i procedury metody h-CLAT, które składają się z dwóch kroków: *testu ustalającego dawkę* i *pomiaru ekspresji CD86/CD54*.

Przygotowanie komórek

10. Do badania metodą h-CLAT należy wykorzystać ludzką białaczkową linię monocytarną THP-1. Zaleca się pozyskiwanie komórek (TIB-202™) z banku komórek posiadającego niezbędne uprawnienia, takiego jak np. zbiór kultur typu amerykańskiego.
11. Komórki THP-1 hoduje się w temperaturze 37 °C, w obecności 5 % CO₂ i w wilgotnym środowisku, w podłożu RPMI-1640 z dodatkiem 10 % bydlęcej surowicy płodowej, 0,05 mM 2-merkaptotetanolu, 100 jednostek/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny. Można zrezygnować z użycia penicyliny i streptomycyny w podłożu. W takim przypadku użytkownicy powinni jednak zweryfikować, czy brak antybiotyku w podłożu nie będzie miał wpływu na wyniki, np. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości wymienionych w dodatku 1.2. W każdym przypadku, aby zminimalizować ryzyko zanieczyszczenia, należy przestrzegać dobrych praktyk w zakresie kultury komórkowej, niezależnie od tego, czy w podłożu do hodowli kultury komórkowej znajdują się antybiotyki, czy też nie. Komórki THP-1 wysiewa się regularnie co 2–3 dni w gęstości od 0,1 do 0,2 × 10⁶ komórek/ml. Powinny one być utrzymywane w gęstości od 0,1 do 1,0 × 10⁶ komórek/ml. Przed wykorzystaniem komórek do badań należy je zakwalifikować, przeprowadzając kontrolę reaktywności. Kontrolę reaktywności komórek należy przeprowadzić, wykorzystując do tego celu kontrole dodatnie, tj. 2,4-dinitrochlorobenzen (DNCB) (nr CAS 97-00-7, czystość ≥ 99 %) i siarczan niklu (NiSO₄) (nr CAS 10101-97-0, czystość ≥ 99 %), oraz kontrolę ujemną, tj. kwas mlekowy (nr CAS 50-21-5, czystość ≥ 85 %), dwa tygodnie po rozmrożeniu. Zarówno 2,4-dinitrochlorobenzen, jak i NiSO₄ powinny wywołać reakcję dodatnią markera powierzchniowego komórki CD86, jak również CD54, a kwas mlekowy powinien wywołać reakcję ujemną markera powierzchniowego komórki CD86, jak również CD54. W teście należy wykorzystać

wyłącznie te komórki, które pomyślnie przeszły kontrolę reaktywności. Komórki można rozmnażać do dwóch miesięcy po rozmrożeniu. Liczba pasaży nie powinna przekraczać 30. Kontrolę reaktywności należy przeprowadzić zgodnie z procedurami opisanymi w pkt 20–24.

12. Komórki THP-1 wysiewa się do badań w gęstości $0,1 \times 10^6$ komórek/ml albo $0,2 \times 10^6$ komórek/ml i dokonuje ich wstępnej hodowli w kolbach z kulturami przez odpowiednio 72 godziny lub 48 godzin. Ważne jest, aby zagęszczenie komórek w kolbie z kulturami tuż po okresie hodowli wstępnej było jak najbardziej spójne w każdym z doświadczeń (stosując jeden z dwóch wyżej wymienionych warunków wstępnej hodowli kultur), ponieważ zagęszczenie komórek w kolbie z kulturami tuż po okresie hodowli wstępnej mogłoby wpłynąć na ekspresję CD86/CD54 wywołaną przez alergen (19). W dniu badania komórki pobrane z kolby z kulturami zawiesza się ponownie w świeżym podłożu w gęstości 2×10^6 komórek/ml. Następnie komórki umieszcza się w dołkach 24-dołkowej płytki płaskodennej po 500 μ l (1×10^6 komórek/dołek) lub w dołkach 96-dołkowej płytki płaskodennej po 80 μ l ($1,6 \times 10^5$ komórek/dołek).

Test ustalający dawkę

13. *Test ustalający dawkę* przeprowadza się, aby określić CV75, czyli stężenie badanej substancji chemicznej, dzięki któremu żywotność komórek (CV) wynosi 75 % w porównaniu z kontrolą z rozpuszczalnikiem/nośnikiem. Wartość CV75 wykorzystuje się do określenia stężenia badanych substancji chemicznych dla pomiaru ekspresji CD86/CD54 (zob. pkt 20–24).

Przygotowanie badanych substancji chemicznych i substancji kontrolnych

14. Badane substancje chemiczne oraz substancje kontrolne przygotowuje się w dniu badania. W metodzie h-CLAT badane substancje chemiczne są rozpuszczane lub tworzą stabilne dyspersje (zob. również pkt 4) w soli fizjologicznej lub podłożu (pierwsze warianty rozpuszczalnika/nośnika) lub w sulfotlenku dimetylu (DMSO, czystość ≥ 99 %) (drugi wariant rozpuszczalnika/nośnika), jeżeli badana substancja chemiczna nie jest rozpuszczalna lub nie tworzy stabilnej dyspersji w dwóch rozpuszczalnikach/nośnikach wymienionych jako pierwsze, do stężeń końcowych wynoszących 100 mg/ml (soli fizjologicznej lub podłoża) lub 500 mg/ml (sulfotlenku dimetylu). Dopuszcza się możliwość stosowania innych rozpuszczalników/nośników niż te opisane powyżej pod warunkiem przedstawienia wystarczającego uzasadnienia naukowego. Należy uwzględnić stabilność badanej substancji chemicznej w końcowym rozpuszczalniku/nośniku.
15. Na początku przygotowuje się roztwory podstawowe badanych substancji chemicznych o stężeniach wynoszących 100 mg/ml (w soli fizjologicznej lub podłożu) lub 500 mg/ml (w sulfotlenku dimetylu), a następnie rozcieńcza zgodnie z następującymi krokami:

- jeżeli rozpuszczalnikiem/nośnikiem jest sól fizjologiczna lub podłoże: przygotowuje się osiem roztworów podstawowych (osiem stężeń) przez dwukrotne rozcieńczenie w postępie geometrycznym przy użyciu odpowiedniego rozpuszczalnika/nośnika. Następnie otrzymane roztwory podstawowe rozcieńcza się 50-krotnie w podłożu (roztwory robocze). W przypadku gdy najwyższe stężenie końcowe na płytce wynoszące 1 000 µg/ml nie jest toksyczne, najwyższe stężenie należy wyznaczyć ponownie poprzez przeprowadzenie nowego badania cytotoksyczności. Końcowe stężenie na płytce nie powinno przekraczać 5 000 µg/ml dla badanych substancji chemicznych, które zostały rozpuszczone w soli fizjologicznej lub podłożu lub utworzyły w nich stabilną dyspersję;
- jeżeli rozpuszczalnikiem/nośnikiem jest sulfotlenek dimetylu: przygotowuje się osiem roztworów podstawowych (osiem stężeń) przez dwukrotne rozcieńczenie w postępie geometrycznym przy użyciu odpowiedniego rozpuszczalnika/nośnika. Następnie otrzymane roztwory podstawowe rozcieńcza się 250-krotnie w podłożu (roztwory robocze). Końcowe stężenie na płytce nie powinno przekraczać 1 000 µg/ml, nawet jeżeli stężenie to nie jest toksyczne.

Roztwory robocze ostatecznie wykorzystuje się do narażenia na działanie substancji chemicznej poprzez dodanie do zawiesiny komórkowej THP-1 na płytce (zob. również pkt 17) roztworu roboczego w objętości równej objętości tej zawiesiny, aby osiągnąć dodatkowe dwukrotne rozcieńczenie (zazwyczaj końcowy zakres stężeń na płytce wynosi 7,81–1 000 µg/ml).

16. W ramach kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem w metodzie h-CLAT stosuje się podłoże (w przypadku badanych substancji chemicznych rozpuszczonych w podłożu albo soli fizjologicznej lub tworzących w nich stabilną dyspersję (zob. pkt 4)) lub w sulfotlenek dimetylu (w przypadku badanych substancji chemicznych rozpuszczonych w sulfotlenku dimetylu lub tworzących w nim stabilną dyspersję) badane w pojedynczym stężeniu końcowym na płytce wynoszącym 0,2 %. Podlega takiemu samemu rozcieńczeniu jakie opisano dla roztworów roboczych w pkt 15.

Podawanie badanych substancji chemicznych i substancji kontrolnych

17. Podłoże lub roztwory robocze opisane w pkt 15 i 16 miesza się w stosunku 1:1 (obj.) z zawiesinami komórkowymi przygotowanymi w 24-dołkowej lub 96-dołkowej płytce płaskodennej (zob. pkt 12). Płytki poddane powyższym procesom następnie inkubuje się przez $24 \pm 0,5$ godziny w temperaturze 37 °C w obecności 5 % CO₂. Należy dołożyć starań, aby nie dopuścić do odparowania lotnych badanych substancji chemicznych i aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu między dołkami przez badane substancje chemiczne, np. szczelnie zaklejając płytkę przed rozpoczęciem inkubacji z wykorzystaniem badanych substancji chemicznych (20).

Barwienie jodkiem propidyny

18. Po upływie 24 godzin $\pm 0,5$ godziny narażenia komórki przenosi się do probówki i zbiera poprzez odwirowanie. Supernatanty odrzuca się, a pozostałe komórki zawiesza się ponownie w 200 μ l (w przypadku płytki 96-dołkowej) lub 600 μ l (w przypadku płytki 24-dołkowej) roztworu chlorku sodu buforowanego fosforanami zawierającego 0,1 % albuminy surowicy bydlęcej (roztwór buforowy do wybarwiania). 200 μ l zawiesiny komórkowej przenosi się do dołków 96-dołkowej płytki okrągłodennej (w przypadku płytki 96-dołkowej) lub probówki Eppendorfa (w przypadku płytki 24-dołkowej) i dwukrotnie przemywa się w 200 μ l (w przypadku płytki 96-dołkowej) lub 600 μ l (w przypadku płytki 24-dołkowej) roztworu buforowego do wybarwiania. Później komórki zawiesza się ponownie w roztworze buforowym do wybarwiania (np. w 400 μ l) i dodaje roztwór jodku propidyny (np. 20 μ l) (przykładowe stężenie końcowe jodku propidyny wynosi 0,625 μ g/ml). Można wykorzystać inne markery cytotoksyczności, takie jak 7-aminoaktynomycyna D (7-AAD), błękit trypanu lub innego rodzaju markery, jeżeli można wykazać, że alternatywne barwniki pozwalają uzyskać wyniki podobne do wyników otrzymywanych w przypadku wykorzystania jodku propidyny, np. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegotności wymienionych w dodatku 1.2.

Pomiar cytotoksyczności z wykorzystaniem cytometrii przepływowej i oszacowanie wartości CV75

19. Wchłanianie jodku propidyny analizuje się za pomocą cytometrii przepływowej z kanałem akwizycji FL-3. Łącznie pozyskuje się 10 000 żywych komórek (nieoznaczonych jodkiem propidyny). Żywotność komórek można obliczyć za pomocą poniższego równania, korzystając z programu do analizy cytometrycznej. Przy niskiej żywotności komórek należy pozyskać do 30 000 komórek, wśród których znajdują się martwe komórki. Ewentualnie dane można pozyskać w ciągu jednej minuty od rozpoczęcia analizy.

$$\text{Cell viability} = \frac{\text{Number of living cells}}{\text{Total Number of acquired cells}} \times 100$$

Wartość CV75 (zob. pkt 13), tj. stężenie wykazujące przeżywalność komórek THP-1 na poziomie 75 % (cytotoksyczność na poziomie 25 %), oblicza się metodą interpolacji logarytmiczno-liniowej za pomocą następującego równania:

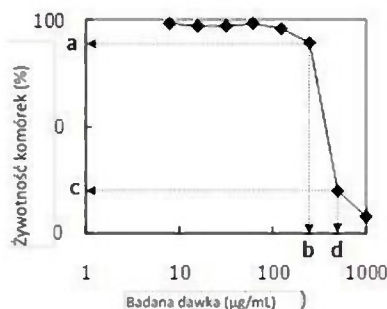
$$\text{Log CV75} = \frac{(75-c) \times \text{Log}(b) - (75-a) \times \text{Log}(d)}{a-c}$$

gdzie:

a oznacza minimalną wartość żywotności komórek powyżej 75 %;

c oznacza maksymalną wartość żywotności komórek poniżej 75 %;

b i d oznaczają stężenia, przy których wartość żywotności komórek wynosi odpowiednio a i c.



Do określania CV75 można stosować inne podejścia pod warunkiem wykazania braku wpływu na wyniki (np. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości).

Pomiar ekspresji CD86/CD54

Przygotowanie badanych substancji chemicznych i substancji kontrolnych

20. Odpowiedni rozpuszczalnik/nośnik (sól fizjologiczna, podłoże lub sulfotlenek dimetylu; zob. pkt 14) jest używany do rozpuszczania badanych substancji chemicznych lub tworzenia ich stabilnych zawiesin. Badane substancje chemiczne najpierw rozcieńcza się do stężenia odpowiadającego 100-krotności (w przypadku soli fizjologicznej lub podłoża) lub 500-krotności (w przypadku sulfotlenku dimetylu) $1,2 \times \text{CV75}$ określonego w *teście ustalającym dawkę* (zob. pkt 19). Jeżeli nie można określić wartości CV75 (tj. jeżeli w *teście ustalającym dawkę* nie można zaobserwować wystarczającej cytotoksyczności), jako stężenia początkowego należy użyć najwyższego rozpuszczalnego stężenia lub stężenia stabilnej zawiesiny badanej substancji chemicznej przygotowanej z użyciem każdego rozpuszczalnika/nośnika. Należy zwrócić uwagę, że końcowe stężenie na płytce nie powinno przekraczać 5 000 µg/ml (w przypadku soli fizjologicznej lub podłoża) lub 1 000 µg/ml (w przypadku sulfotlenku dimetylu). Następnie przy pomocy odpowiedniego rozpuszczalnika/nośnika sporządza się 1,2-krotne rozcieńczenia w postępie geometrycznym, aby uzyskać roztwory podstawowe (osiem stężeń wynoszących od $100 \times 1,2 \times \text{CV75}$ do $100 \times 0,335 \times \text{CV75}$ (w przypadku soli fizjologicznej lub podłoża) lub od $500 \times 1,2 \times \text{CV75}$ do $500 \times 0,335 \times \text{CV75}$ (w przypadku sulfotlenku dimetylu)), które zostaną poddane badaniu metodą h-CLAT (przykład schematu dawkowania można znaleźć w protokole DB-ALM nr 158). Następnie roztwory podstawowe rozcieńcza się 50-krotnie (w przypadku soli fizjologicznej lub podłoża) lub 250-krotnie (w przypadku sulfotlenku dimetylu) w podłożu (roztwory robocze). Te roztwory robocze ostatecznie wykorzystuje się do narażenia na działanie substancji chemicznej, stosując dodatkowy końcowy dwukrotny współczynnik rozcieńczenia na płytce. W przypadku gdy wyniki nie spełniają opisanych w pkt 29 i 30 kryteriów dopuszczalności dotyczących żywotności komórek,

można powtórzyć *test ustalający dawkę*, aby wyznaczyć dokładniejszą wartość CV75. Należy zauważyć, że do pomiaru ekspresji CD86/CD54 użyte mogą być jedynie płytki 24-dółkowe.

21. Kontrolę z rozpuszczalnikiem/nośnikiem przygotowuje się w sposób opisany w pkt 16. 2,4-dinitrochlorobenzen jest stosowany jako kontrola dodatnia w metodzie h-CLAT (zob. pkt 11), w której roztwory podstawowe przygotowuje się w sulfotlenku dimetylu i rozcieńcza w taki sposób, jak opisano w pkt 20 dla roztworów podstawowych. 2,4-dinitrochlorobenzen należy stosować jako kontrolę dodatnią do *pomiaru ekspresji CD86/CD54* w końcowym, pojedynczym stężeniu na płytce (zwykle 4,0 µg/ml). Aby uzyskać na płytce stężenie 2,4-dinitrochlorobenzenu wynoszące 4,0 µg/ml, przygotowuje się roztwór podstawowy 2,4-dinitrochlorobenzenu w sulfotlenku dimetylu o stężeniu 2 mg/ml, a następnie rozcieńcza się go 250-krotnie w podłożu do roztworu roboczego o stężeniu 8 µg/ml. Ewentualnie jako stężenie kontroli dodatniej można użyć CV75 2,4-dinitrochlorobenzenu, które jest określone w każdej placówce badawczej. Można stosować inne odpowiednie kontrole dodatnie, jeżeli dostępne są dane historyczne pozwalające na uzyskanie porównywalnych kryteriów dopuszczalności analizy. W przypadku kontroli dodatnich końcowe pojedyncze stężenie na płytce nie powinno przekraczać 5 000 µg/ml (w przypadku soli fizjologicznej lub podłoża) lub 1 000 µg/ml (w przypadku sulfotlenku dimetylu). Kryteria dopuszczalności analizy są takie same jak kryteria opisane w odniesieniu do badanej substancji chemicznej (zob. pkt 29) z wyjątkiem ostatniego kryterium dopuszczalności, ponieważ kontrolę dodatnią bada się przy pojedynczym stężeniu.

Podawanie badanych substancji chemicznych i substancji kontrolnych

22. W odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej i substancji kontrolnej należy przeprowadzić jedno doświadczenie, aby uzyskać prognozę. Każde doświadczenie składa się co najmniej z dwóch niezależnych analiz *pomiaru ekspresji CD86/CD54* (zob. pkt 26–28). Każdą z niezależnych analiz przeprowadza się innego dnia lub tego samego dnia, pod warunkiem że na potrzeby każdej analizy: a) przygotowuje się niezależne, świeże roztwory podstawowe i robocze badanej substancji chemicznej oraz roztwory przeciwciał, a także b) używa się niezależnie zebranych komórek (tj. komórki zbiera się z innych kolb z kulturami); komórki mogą jednak pochodzić z tego samego pasażu. Badana substancja chemiczna i substancje kontrolne przygotowane jako roztwory robocze (500 µl) miesza się z 500 µl zawiesiny komórkowej (1×10^6 komórek) w stosunku 1:1, a komórki inkubuje się przez $24 \pm 0,5$ godziny, jak opisano w pkt 20 i 21. W każdej analizie wystarczające będzie przeprowadzenie jednej kontrpróby w odniesieniu do każdego stężenia badanej substancji chemicznej i substancji kontrolnej, ponieważ prognozę uzyskuje się z co najmniej dwóch niezależnych analiz.

Wybarwianie komórek i analiza

23. Po upływie 24 godzin $\pm 0,5$ godziny narażenia komórki są przenoszone z płytki 24-dółkowej do probówek, zbierane poprzez odwirowanie, a następnie dwukrotnie przemywane w 1 ml roztworu buforowego do wybarwiania (w razie potrzeby można wykonać dodatkowe kroki związane z przemywaniem). Po przemyciu komórki blokuje się w 600 μ l roztworu blokującego (roztworu buforowego do wybarwiania zawierającego 0,01 % (w/v) globuliny (ludzka II, III frakcja Cohna; SIGMA, #G2388-10G lub równoważna)) i inkubuje w temperaturze 4 °C przez 15 minut. Po zablokowaniu komórki dzieli się na trzy podwielokrotności po 180 μ l i umieszcza się je w dołkach 96-dółkowej płytki okrągłodennej lub w probówce Eppendorfa.
24. Po odwirowaniu komórki wybarwia się za pomocą 50 μ l przeciwciał anti-CD86, anti-CD54 lub mysich przeciwciał IgG1 (izotyp) znakowanych FITC w temperaturze 4 °C przez 30 minut. Należy użyć przeciwciał opisanych w protokole nr 158 DB-ALM dotyczącym h-CLAT (18), rozcieńczając w stosunku objętościowym 3:25 (w przypadku CD86 (BD-PharMingen, #555657; klon: Fun-1)) lub w stosunku objętościowym 3:50 (w przypadku CD54 (DAKO, #F7143; klon: 6.5B5) i IgG1 (DAKO, #X0927)) w roztworze buforowym do wybarwiania. Naukowcy opracowujący opisywane badanie wskazali powyższe współczynniki rozcieńczenia przeciwciał jako dające najlepszy stosunek sygnału do szumu. Z doświadczenia naukowców opracowujących badanie wynika, że intensywność fluorescencji przeciwciał jest zwykle stała w różnych partiach. Użytkownicy mogą jednak rozważyć miareczkowanie przeciwciał w warunkach własnego laboratorium, aby określić stężenia, które są najbardziej stosowne dla danego zastosowania. Można wykorzystać inne przeciwciała anti-CD86 lub anti-CD54 znakowane fluorochromem, jeżeli można wykazać, że pozwalają one uzyskać wyniki podobne do wyników otrzymywanych w przypadku wykorzystania przeciwciał skoniugowanych z FITC, np. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości wymienionych w dodatku 1.2. Należy zaznaczyć, że zmiana klona lub dostawcy przeciwciał opisanych w protokole nr 158 DB-ALM dotyczącym h-CLAT (18) może wpłynąć na wyniki. Po co najmniej dwukrotnym przemyciu komórek w 150 μ l roztworu buforowego do wybarwiania zawiesza się je ponownie w roztworze buforowym do wybarwiania (np. w 400 μ l) i dodaje się roztwór jodku propidyny (np. 20 μ l, aby uzyskać stężenie końcowe wynoszące 0,625 μ g/ml) lub roztwór innego markera cytotoxyczności (zob. pkt 18). Poziomy ekspresji CD86 i CD54 oraz żywotność komórek analizuje się przy wykorzystaniu cytometrii przepływowej.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ**Ocena danych**

25. Ekspresję markerów CD86 i CD54 analizuje się za pomocą cytometrii przepływowej z kanałem pomiarowym FL-1. Na podstawie średniej geometrycznej intensywności fluorescencji (MFI) oblicza względną intensywność fluorescencji (RFI) CD86 i CD54 w odniesieniu do komórek kontroli dodatniej i komórek poddanych działaniu substancji chemicznej, korzystając z poniższego równania:

$$RFI = \frac{MFI \text{ komórki poddanej działaniu substancji chemicznej} - MFI \text{ komórek z kontroli izotypowych poddanych działaniu substancji chemicznej}}{MFI \text{ komórek kontrolnych poddanych działaniu rozpuszczalnika/nośnika} - MFI \text{ komórek z kontroli izotypowych poddanych działaniu rozpuszczalnika/nośnika}} \times 100$$

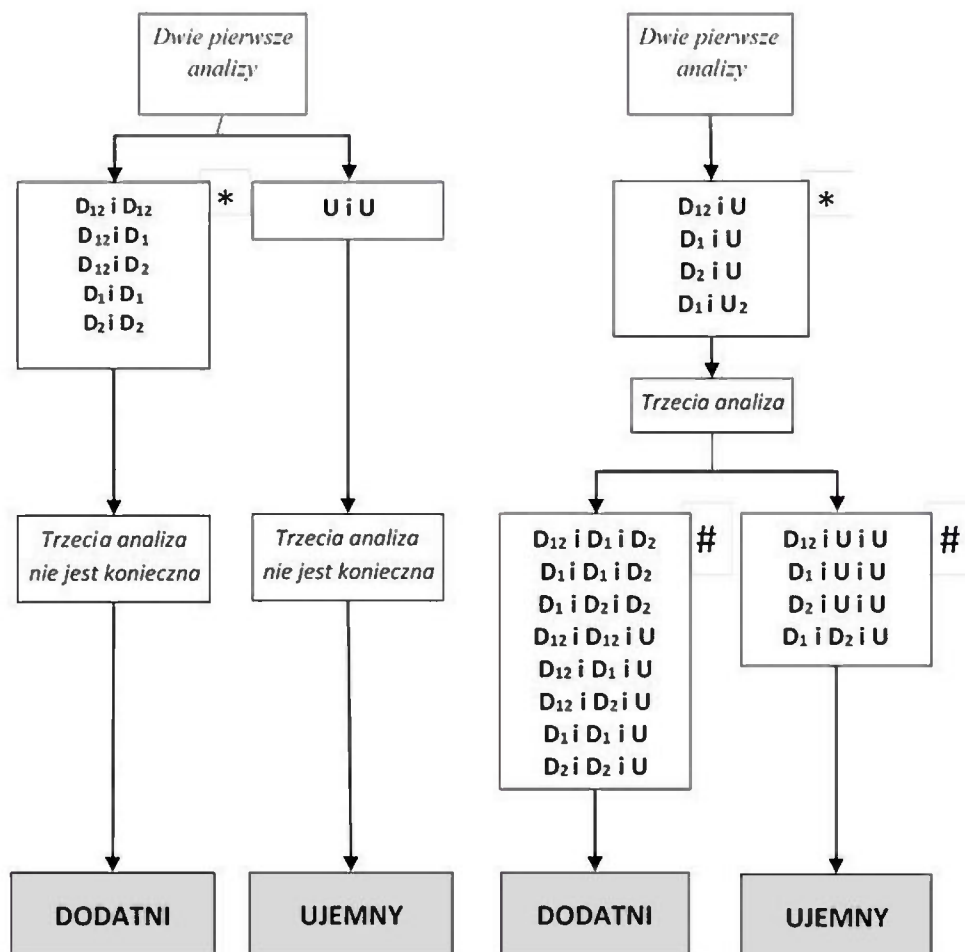
Żywotność komórek kontroli izotypowej (które barwi się mysimi przeciwciałami IgG1 (izotyp)) również oblicza się zgodnie z równaniem opisanym w pkt 19.

Model prognozowania

26. Na potrzeby pomiaru ekspresji *CD86/CD54* każdą badaną substancję chemiczną poddaje się badaniu w co najmniej dwóch niezależnych analizach, aby uzyskać pojedynczą prognozę (DODATNIA lub UJEMNA). Prognozę h-CLAT uznaje się za DODATNIA, jeżeli co najmniej jeden z przedstawionych poniżej warunków zostanie spełniony w dwóch niezależnych analizach na dwie lub w co najmniej dwóch niezależnych analizach na trzy – w przeciwnym wypadku prognozę h-CLAT uznaje się za UJEMNA (rys. 1):
- względna intensywność fluorescencji CD86 jest równa lub większa niż 150 % dla każdego badanego stężenia (dla którego żywotność komórek ≥ 50 %);
 - względna intensywność fluorescencji CD54 jest równa lub większa niż 200 % dla każdego badanego stężenia (dla którego żywotność komórek ≥ 50 %).
27. W związku z powyższym jeżeli obie pierwsze analizy dadzą wynik dodatni dla CD86 lub obie dadzą wynik dodatni dla CD54, prognozę h-CLAT uważa się za DODATNIA i nie trzeba przeprowadzać trzeciej analizy. Analogicznie – jeżeli pierwsze dwie analizy dadzą wynik ujemny dla obu markerów, prognozę h-CLAT uważa się za UJEMNA (przy należyтым uwzględnieniu przepisów pkt 30) bez konieczności przeprowadzania trzeciej analizy. Jeżeli jednak wyniki dwóch pierwszych analiz nie są zbieżne w odniesieniu do co najmniej jednego markera (CD54 lub CD86), należy przeprowadzić trzecią analizę, a prognoza końcowa będzie oparta na większości wyników z trzech osobnych analiz (tj. 2 z 3). W tym względzie należy zaznaczyć, że jeżeli przeprowadzono dwie niezależne analizy i jedna jest dodatnia tylko w odniesieniu do CD86 (zwana dalej D₁), a druga jest dodatnia tylko w odniesieniu do CD54 (zwana dalej D₂), konieczne jest przeprowadzenie trzeciej analizy. Jeżeli trzecia analiza jest ujemna w odniesieniu do obu markerów (zwana dalej U), prognozę h-CLAT uważa się za UJEMNA. Jeżeli jednak trzecia analiza jest dodatnia dla jednego z markerów (D₁ lub D₂) lub dla obu markerów (zwana dalej D₁₂), prognozę h-CLAT uważa się za DODATNIA.

Rys. 1: Model prognozowania wykorzystywany w metodzie h-CLAT. Prognozę h-CLAT należy

rozpatrywać w ramach IATA i zgodnie z przepisami pkt 7 i 8 wprowadzenia ogólnego.



D₁: analiza dodatnia tylko w odniesieniu do CD86; D₂: analiza dodatnia tylko w odniesieniu do CD54; D₁₂: analiza dodatnia w odniesieniu do CD86 i CD54; U: analiza niedodatnia ani w odniesieniu do CD86, ani w odniesieniu do CD54.

*W ramach przedstawiono odpowiednie kombinacje wyników dwóch pierwszych analiz niezależnie od kolejności, w jakiej można je uzyskać.

#W ramach przedstawiono odpowiednie kombinacje wyników trzech analiz, na podstawie wyników uzyskanych w dwóch pierwszych analizach, przedstawionych w ramce powyżej, nie odzwierciedlając jednak kolejności, w jakiej można je uzyskać.

28. W odniesieniu do badanych substancji chemicznych, w przypadku których przewiduje się wynik DODATNI względem h-CLAT, opcjonalnie można określić dwie wartości stężenia

efektywnego (EC), EC150 dla CD86 i EC200 dla CD54, tj. stężenia, przy którym badane substancje chemiczne indukują względną intensywność fluorescencji wynoszącą 150 lub 200. Te wartości stężenia efektywnego mogą potencjalnie wpłynąć na ocenę siły działania uczulającego (9), gdy stosuje się je w kontekście podejść zintegrowanych takich jak IATA (4)(5)(6)(7)(8). Można je obliczyć, korzystając z poniższych równań:

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

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

gdzie:

A_{conc} oznacza najniższe stężenie wyrażone w $\mu\text{g/ml}$ przy $\text{RFI} > 150$ (CD86) lub 200 (CD54),

B_{conc} oznacza najwyższe stężenie wyrażone w $\mu\text{g/ml}$ przy $\text{RFI} < 150$ (CD86) lub 200 (CD54),

A_{RFI} oznacza względną intensywność fluorescencji dla najniższego stężenia przy $\text{RFI} > 150$ (CD86) lub 200 (CD54),

B_{RFI} oznacza względną intensywność fluorescencji dla najwyższego stężenia przy $\text{RFI} < 150$ (CD86) lub 200 (CD54).

Aby uzyskać dokładniejsze wartości EC150 i EC200, konieczne może być przeprowadzenie trzech niezależnych analiz dotyczących *pomiaru ekspresji CD86/CD54*. Następnie ostateczne wartości EC150 oraz EC200 określa się jako wartość mediany EC wyliczanych na podstawie trzech niezależnych analiz. W przypadku gdy tylko dwie z trzech niezależnych analiz spełniają kryteria uznania za wyniki dodatnie (zob. pkt 26–27), przyjmuje się wyższą z wyliczonych wartości EC150 lub EC200.

Kryteria dopuszczalności

29. Podczas stosowania metody h-CLAT (22)(27) spełnione muszą zostać następujące kryteria dopuszczalności:

- żywotność komórek w podłożu oraz kontrolach z rozpuszczalnikiem/nośnikiem powinna być wyższa niż 90 %;
- w przypadku kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem wartości RFI zarówno w odniesieniu do CD86, jak i CD54 nie powinny przekraczać kryteriów uzyskania wyniku dodatniego (CD86 – $\text{RFI} \geq 150 \%$ i CD54 – $\text{RFI} \geq 200 \%$). Wartości RFI kontroli z nośnikiem/roztworem oblicza się, korzystając ze wzoru przedstawionego w pkt 25 („MFI substancji chemicznej” należy zastąpić „MFI nośnika/roztworu”, a „MFI nośnika/roztworu” należy zastąpić „MFI kontroli (podłoża)”);
- stosunek MFI zarówno CD86, jak i CD54 do kontroli izotypowej zarówno w podłożu, jak i w kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem powinien wynosić $> 105 \%$;

- w kontroli dodatniej (DNCB) wartości RFI zarówno CD86, jak i CD54 powinny spełniać kryteria uzyskania wyniku dodatniego (CD86 – RFI ≥ 150 % i CD54 – RFI ≥ 200), a żywotność komórek powinna być większa niż 50 %;
 - jeżeli chodzi o badaną substancję chemiczną, żywotność komórek powinna być wyższa niż 50 % w przypadku co najmniej czterech stężeń badanych w każdej analizie.
30. Wyniki ujemne dopuszcza się wyłącznie w przypadku badanych substancji chemicznych charakteryzujących się żywotnością komórek niższą niż 90 % przy najwyższym badanym stężeniu (tj. $1,2 \times CV75$ zgodnie ze schematem dotyczącym serii rozcieńczeń w postępie geometrycznym opisanym w pkt 20). Jeżeli żywotność komórek przy stężeniu $1,2 \times CV75$ równa się lub przekracza 90 %, wynik ujemny należy odrzucić. W takim przypadku zaleca się podjęcie próby udoskonalenia doboru dawki poprzez ponowne określenie wartości CV75. Należy zauważyć, że w przypadku stosowania jako maksymalnego stężenia badanej substancji chemicznej stężenia 5 000 $\mu\text{g/ml}$ w soli fizjologicznej (lub podłożu, lub innych rozpuszczalnikach/nośnikach), stężenia 1 000 $\mu\text{g/ml}$ w sulfotlenku dimetylu lub najwyższego stężenia rozpuszczalnego, wynik ujemny dopuszcza się nawet wówczas, gdy żywotność komórek przekracza 90 %.

Sprawozdanie z badania

31. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

Substancja jednoskładnikowa

- dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory;
- wygląd fizyczny, log K_{ow} , rozpuszczalność w wodzie, rozpuszczalność w sulfotlenku dimetylu, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie;
- czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;
- postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);
- badane stężenie(-a);
- warunki przechowywania i stabilność, w dostępnym zakresie;
- uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika/nośnika w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej.

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszanina

- opisana w miarę możliwości np. poprzez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), czystości, przedstawienie informacji dotyczących występowania ilościowego oraz wskazanie istotnych właściwości fizykochemicznych składników (zob. powyżej), w dostępnym zakresie;
- wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie, rozpuszczalność w sulfotlenku dimetylu i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie;
- masa cząsteczkowa lub pozorna masa cząsteczkowa w przypadku mieszanin lub polimerów o znanym składzie lub inne informacje istotne dla przebiegu badania;
- postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);
- badane stężenie(-a);
- warunki przechowywania i stabilność, w dostępnym zakresie;
- uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika/nośnika w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej.

Kontrola

Kontrola dodatnia

- dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory;
- wygląd fizyczny, log K_{ow} , rozpuszczalność w wodzie, rozpuszczalność w sulfotlenku dimetylu, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie i w stosownych przypadkach;
- czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;
- postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);
- badane stężenie(-a);
- warunki przechowywania i stabilność, w dostępnym zakresie;
- odniesienie do wyników historycznych kontroli dodatnich wykazujących odpowiednie kryteria dopuszczalności analizy, w stosownych przypadkach.

Kontrola ujemna oraz kontrola z rozpuszczalnikiem/nośnikiem

- dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory;
- czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;
- wygląd fizyczny, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne w przypadku stosowania innego rozpuszczalnika/nośnika kontrolnego niż te opisane w wytycznej dotyczącej badań, w dostępnym zakresie;
- warunki przechowywania i stabilność, w dostępnym zakresie;
- uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika/nośnika w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej.

Warunki badania

- nazwa i adres sponsora i placówki przeprowadzającej badanie oraz dane kierownika badań;
- opis zastosowanego badania;
- zastosowana linia komórkowa, warunki jej przechowywania oraz źródło (np. placówka, z której ją otrzymano);
- zastosowana cytometria przepływowa (np. model), w tym informacje na temat zastosowanych ustawień przyrządu, globuliny, przeciwciał i markera cytotoksyczności;
- procedura stosowana w celu wykazania biegłości laboratorium w zakresie przeprowadzania badania poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości lub procedura stosowana do wykazania odtwarzalności badania w czasie, np. dane historyczne dotyczące kontroli lub dane historyczne dotyczące kontroli reaktywności.

Kryteria dopuszczalności badania

- wartości dotyczące żywotności komórek, MFI oraz RFI uzyskane za pomocą kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem w porównaniu z zakresami dopuszczalności;
- wartości dotyczące żywotności komórek oraz RFI uzyskane za pomocą kontroli dodatkowo w porównaniu z zakresami dopuszczalności;
- żywotność komórek przy wszystkich badanych stężeniach badanej substancji chemicznej.

Procedura badawcza

- liczba zastosowanych analiz;
- stosowane stężenia badanej substancji chemicznej, procedura podawania badanej substancji chemicznej i czas narażenia (jeżeli są one inne niż zalecane);

- czas narażenia na działanie substancji chemicznej (jeżeli jest inny niż zalecany);
- opis zastosowanych kryteriów oceny i podejmowania decyzji;
- opis wszelkich modyfikacji procedury badawczej.

Wyniki

- tabelaryczne zestawienie danych, w tym wartości CV75 (w stosownych przypadkach), poszczególnych wartości geometrycznej MFI, RFI i żywotności komórek, wartości EC150/EC200 (w stosownych przypadkach), uzyskanych w odniesieniu do badanej substancji chemicznej oraz kontroli dodatniej w każdej analizie oraz wskazanie oceny badanej substancji chemicznej według modelu prognozowania;
- w stosownych przypadkach opis wszelkich innych istotnych obserwacji.

Omówienie wyników

- omówienie wyników uzyskanych za pomocą metody h-CLAT;
- uwzględnienie wyników zastosowania badania w kontekście IATA, jeżeli są dostępne inne odpowiednie informacje.

Wnioski

BIBLIOGRAFIA

- (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) EURL-ECVAM UE (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Dostępne na stronie internetowej: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J Appl Toxicol.* 35, 1318-1332.
- (5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. *J Appl Toxicol.* 35, 1333-1347.
- (6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potencies. *Regul Toxicol Pharmacol.* 63, 489-504.
- (7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 69, 371-379.
- (8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization

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

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

- (17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6th report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.
- (18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). „Protokół 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT)”, s. 23. Dostępne na stronie internetowej: <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. Seria dotycząca badań i oceny OECD. Francja, Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju, 96 s.
- (22) OECD (2012). *The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins*. Part 1: Scientific Evidence. Seria dotycząca badań i oceny nr 168. Dostępne na stronie internetowej: [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) Organizacja Narodów Zjednoczonych (ONZ) (2013). Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS). Wydanie piąte zmienione, Nowy Jork i Genewa: publikacje Organizacji Narodów Zjednoczonych. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostępne na stronie internetowej: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. Europejskie Centrum ds. Ekotoksykologii i Toksykologii Substancji Chemicznych (sprawozdanie techniczne nr 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.

Dodatek 1.1

DEFINICJE

Dokładność: stopień zgodności pomiędzy wynikami badania a przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności badania i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność” na oznaczenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy przeprowadzeniu badania (21).

Mechanizm wywoływania skutków szkodliwych: sekwencja zdarzeń, począwszy od struktury chemicznej docelowej substancji chemicznej lub grupy podobnych substancji chemicznych poprzez molekularne zdarzenie inicjujące aż do pożądanego wyniku *in vivo* (22).

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

CV75: szacowane stężenie, przy którym żywotność komórek wynosi 75 %.

EC150: stężenia, przy których wartości RFI w ekspresji CD86 wynoszą 150.

EC200: stężenia, przy których wartości RFI w ekspresji CD54 wynoszą 200.

Cytometria przepływowa: technika cytometryczna, w której komórki zawieszone w cieczy przepływają jedna po drugiej przez zogniskowaną wiązkę wzbudzającego światła, które rozprasza się według wzorców charakterystycznych dla komórek i ich składników; komórki często oznaczają się znacznikami fluorescencyjnymi, dzięki czemu światło jest najpierw absorbowane, a następnie emitowane w zmienionych częstotliwościach.

Zagrożenie: nieodłączna właściwość czynnika lub sytuacja, która może potencjalnie doprowadzić do niekorzystnych skutków w przypadku narażenia organizmu, systemu lub (sub)populacji na taki czynnik.

IATA (zintegrowane podejście do badań i oceny): usystematyzowane podejście stosowane w odniesieniu do identyfikacji zagrożeń (potencjał), charakterystyki zagrożeń (siła oddziaływania) lub oceny bezpieczeństwa (potencjał / siła oddziaływania oraz narażenie) substancji chemicznej lub grupy substancji chemicznych; w ramach tego podejścia w sposób strategiczny integruje się i waży wszystkie istotne dane, które mogą wpłynąć na podjęcie decyzji regulacyjnej dotyczącej potencjalnego zagrożenia, ryzyka lub konieczności podjęcia dalszych ukierunkowanych, a przez to minimalnych badań.

Kontrola podłoża: kontrpróba niepoddana działaniu badanej substancji chemicznej zawierająca wszystkie składniki układu badawczego. Próbką ta jest przetwarzana razem z próbkami poddanymi działaniu badanej substancji chemicznej oraz z innymi próbkami kontrolnymi w celu określenia, czy rozpuszczalnik/nośnik wchodzi w reakcję z układem badawczym.

Mieszanina: mieszanina lub roztwór, które składają się z co najmniej dwóch substancji.

Substancja jednoskładnikowa: substancja, zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której jeden główny składnik występuje w stężeniu co najmniej 80 % (w/w).

Substancja wieloskładnikowa: substancja, zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której więcej niż jeden główny składnik występuje w stężeniu ≥ 10 % (w/w) i < 80 % (w/w). Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku procesu wytwarzania. Różnica między mieszaniną a substancją wieloskładnikową polega na tym, że mieszaninę uzyskuje się poprzez zmieszanie przynajmniej dwóch substancji, między którymi nie zachodzi reakcja chemiczna. Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku reakcji chemicznej.

Kontrola dodatnia: kontrpróba zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, poddana działaniu substancji chemicznej, o której wiadomo, że wywołuje reakcję dodatnią. Aby zapewnić możliwość oceny zmienności reakcji w kontroli dodatniej w czasie, stopień reakcji dodatniej nie powinien być nadmierny.

Prehapteny: substancje chemiczne, które stają się czynnikami uczulającymi po transformacji abiotycznej.

Prohapteny: substancje chemiczne, które wymagają aktywacji enzymatycznej do uwolnienia swojego potencjalnego działania uczulającego na skórę.

Względna intensywność fluorescencji (RFI): wartości względne średniej geometrycznej intensywności fluorescencji (MFI) w komórkach poddanych działaniu substancji chemicznej w porównaniu z MFI w komórkach poddanych działaniu rozpuszczalnika/nośnika.

Istotność: opis powiązania badania z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest ono znaczące i użyteczne z punktu widzenia określonego celu. Jest to zakres, w jakim badanie pozwala prawidłowo zmierzyć lub przewidzieć biologiczny oczekiwany skutek. Istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) badania (21).

Wiarygodność: miary zakresu, w jakim badanie może zostać przeprowadzone w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jego przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją, obliczając odtwarzalność wewnątrz- i międzylaboratoryjną oraz powtarzalność wewnątrzlaboratoryjną (21).

Analiza: analiza obejmuje jednoczesne badanie jednej badanej substancji chemicznej lub większej liczby takich substancji w kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem i kontroli dodatniej.

Czułość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik dodatni / aktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą danego badania. Jest to

miara dokładności badania, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności badania (21).

Roztwór buforowy do wybarwiania: roztwór chlorku sodu buforowany fosforanami zawierający 0,1 % albuminy surowicy bydlęcej.

Kontrola z rozpuszczalnikiem/nośnikiem: próbka niepoddana działaniu badanej substancji, zawierająca wszystkie składniki układu badawczego z wyjątkiem badanej substancji chemicznej, ale z uwzględnieniem stosowanego rozpuszczalnika/nośnika. Wykorzystywana jest do określenia wyjściowej reakcji dla próbek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej rozpuszczonej lub stabilnie rozproszonej w tym samym rozpuszczalniku/nośniku. W przypadku badania z jednoczesną kontrolą podłoża próbka ta wykazuje również, czy rozpuszczalnik/nośnik wchodzi w reakcję z układem badawczym.

Swoistość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik ujemny / nieaktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą badania. Jest to miara dokładności badania, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności badania (21).

Substancja: pierwiastek chemiczny i jego związki w stanie naturalnym lub uzyskane w wyniku dowolnego procesu produkcyjnego, w tym wszelkie dodatki konieczne do zachowania jego trwałości i wszelkie zanieczyszczenia powstałe w wyniku zastosowanego procesu, z wyłączeniem ewentualnych rozpuszczalników, które można oddzielić bez wpływu na stabilność substancji i bez zmiany jej składu.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody.

Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (GHS ONZ): system, w ramach którego proponuje się klasyfikację substancji chemicznych (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz omawia się odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak: piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki substancji i produktów niebezpiecznych, aby przekazać informacje na temat ich szkodliwego działania w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) i środowiska (23).

UVCB: substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

Ważne badanie: badanie, które uznano za wystarczająco istotne i wiarygodne dla danego celu i które opiera się na uzasadnionych naukowo podstawach. Badanie nie może zostać uznane za ważne w sensie absolutnym, ale tylko w odniesieniu do określonego celu (21).

Dodatek 1.2**SUBSTANCJE SŁUŻĄCE DO WYKAZANIA BIEGŁOŚCI**

Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania badania opisanego w niniejszym dodatku do metody badawczej B.71 laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną, prawidłowo określając prognozę h-CLAT dla 10 substancji wskazanych w tabeli 1 oraz określając wartości CV75, EC150 i EC200, które mieszczą się w odpowiednim zakresie odniesienia, dla co najmniej 8 z 10 substancji służących do wykazania biegłości. Substancje służące do wykazania biegłości wybrano w taki sposób, aby odzwierciedlić zakres reakcji na zagrożenia związane z działaniem uczulającym na skórę. Przy wyborze substancji kierowano się również następującymi kryteriami: dostępnością handlową tych substancji, dostępnością wysokiej jakości danych referencyjnych z badań *in vivo* oraz dostępnością wysokiej jakości danych *in vitro* uzyskanych w wyniku zastosowania metody h-CLAT. W odniesieniu do metody h-CLAT można znaleźć również opublikowane dane referencyjne (3)(14).

Tabela 1: Substancje zalecane do wykazania biegłości technicznej w odniesieniu do metody h-CLAT

Substancje służące do wykazania biegłości	Numer CAS	Stan skupienia	Prognoza <i>in vivo</i> ¹	Zakres odniesienia CV75 w µg/ml ²	Wynik badania h-CLAT dla CD86 (Zakres odniesienia EC150 w µg/ml) ²	Wynik badania h-CLAT dla CD54 (Zakres odniesienia EC200 w µg/ml) ²
2,4-dinitrochlorobenzen	97-00-7	Stały	Czynnik uczulający (wyjątkowo silny)	2–12	Dodatni (0,5–10)	Dodatni (0,5–15)
4-fenylenodiamina	106-50-3	Stały	Czynnik uczulający (silny)	5–95	Dodatni (<40)	Ujemny (>1,5) ³
Siarczan niklu	10101-97-0	Stały	Czynnik uczulający (w stopniu umiarkowanym)	30–500	Dodatni (<100)	Dodatni (10–100)
2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	Stały	Czynnik uczulający (w stopniu umiarkowanym)	30–400	Ujemny (>10) ³	Dodatni (10–140)
R(+)-limonen	5989-27-5	Ciekły	Czynnik uczulający (słaby)	>20	Ujemny (>5) ³	Dodatni (<250)
Imidazolidynylomocznik	39236-46-9	Stały	Czynnik uczulający (słaby)	25–100	Dodatni (20–90)	Dodatni (20–75)
Izopropanol	67-63-0	Ciekły	Brak działania uczulającego	>5 000	Ujemny (>5 000)	Ujemny (>5 000)
Glicerol	56-81-5	Ciekły	Brak działania uczulającego	>5 000	Ujemny (>5 000)	Ujemny (>5 000)
Kwas mlekowy	50-21-5	Ciekły	Brak działania uczulającego	1 500–5 000	Ujemny (>5 000)	Ujemny (>5 000)
Kwas 4-aminobenzoowy	150-13-0	Stały	Brak działania uczulającego	>1 000	Ujemny (>1 000)	Ujemny (>1 000)

Skróty: Nr CAS = numer w rejestrze Chemical Abstracts Service.

- ¹ Prognoza zagrożenia (i siły działania) *in vivo* jest oparta na danych z badania LLNA (3)(14). Siłę działania *in vivo* określa się na podstawie kryteriów zaproponowanych przez ECETOC (24).
- ² Na podstawie historycznych wartości zaobserwowanych (13)(25).
- ³ Dotychczas większość wyników otrzymywanych dla tego markera była ujemna, dlatego w większości przypadków oczekuje się wyniku ujemnego. Przedstawiony zakres określono na podstawie kilku wyników dodatnich zaobserwowanych w przeszłości. W przypadku uzyskania wyniku dodatniego wartość EC powinna mieścić się w zgłaszanym zakresie odniesienia.

Dodatek 2

BADANIE DZIAŁANIA UCZULAJĄCEGO NA SKÓRĘ *IN VITRO*: BADANIE AKTYWACJI LINII KOMÓRKOWEJ U937 (U-SENS™)

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

1. Badanie U-SENS™ pozwala określić ilościowo zmianę ekspresji markera powierzchniowego komórek związanego z procesem aktywacji monocytów i komórek dendrytycznych (tj. CD86) w ludzkiej linii komórkowej chłoniaka histiocytarnego U937 po narażeniu na działanie czynników uczulających (1). Pomiary poziomów ekspresji markera powierzchniowego komórek CD86 w linii komórkowej U937 wykorzystuje się później do wsparcia rozróżnienia substancji działających uczulająco na skórę i substancji niewykazujących takiego działania.
2. Badanie U-SENS™ oceniono w ramach badania walidacyjnego (2) koordynowanego przez L'Oreal i późniejszej niezależnej wzajemnej oceny przeprowadzonej przez Naukowy Komitet Doradczy (ESAC) działający przy laboratorium referencyjnym Unii Europejskiej ds. metod alternatywnych wobec testów na zwierzętach (EURL ECVAM) (3). Uwzględniając wszystkie dostępne dowody i wkład ze strony organów regulacyjnych i zainteresowanych stron, EURL ECVAM (4) zaleciło stosowanie badania U-SENS™ w ramach IATA do wsparcia rozróżnienia substancji działających uczulająco i substancji niewykazujących takiego działania na potrzeby klasyfikacji i oznakowania pod względem zagrożeń. W swoich wytycznych dotyczących zgłaszania usystematyzowanych podejść do integracji danych oraz poszczególnych źródeł informacji na temat działania uczulającego na skórę wykorzystywanych w ramach IATA OECD omawia szereg studiów przypadku, opisując różne strategie badań oraz modele prognozowania. Jedno z wielu zdefiniowanych podejść opiera się na teście U-SENS (5). Przykłady wykorzystania danych z badania U-SENS™ w połączeniu z innymi informacjami, w tym z danymi historycznymi oraz istniejącymi ważnymi danymi dotyczącymi ludzi (6), są także zamieszczone w innych pozycjach literatury (4)(5)(7).
3. Udowodniono, że badanie U-SENS™ można przeprowadzać również w laboratoriach posiadających doświadczenie w zakresie kultury komórkowej i analizy przy użyciu cytometrii przepływowej. Poziom odtwarzalności prognoz, którego można oczekiwać od tego badania, ma wartość rzędu 90 % i 84 % odpowiednio wewnątrz laboratoriów i pomiędzy nimi (8). Wyniki uzyskane w badaniu walidacyjnym (8) i innych opublikowanych badaniach (1) ogólnie wskazują na to, że – w porównaniu z wynikami LLNA – dokładność rozróżniania substancji działających uczulająco na skórę (tj. należących do kategorii 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) i substancji

niewykazujących takiego działania wynosi 86 % (N = 166) przy czułości na poziomie 91 % (118/129) oraz swoistości na poziomie 65 % (24/37). W porównaniu z wynikami badań przeprowadzonych na ludziach dokładność rozróżniania substancji działających uczulająco na skórę (tj. należących do kategorii 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) i substancji niewykazujących takiego działania wynosi 77 % (N = 101) przy czułości na poziomie 100 % (58/58) oraz swoistości na poziomie 47 % (20/43). Prawdopodobieństwo wystąpienia prognoz fałszywie ujemnych przy zastosowaniu badania U-SENS™ (w porównaniu do LLNA) jest większe w przypadku substancji chemicznych wykazujących niską lub średnią siłę działania uczulającego na skórę (tj. należących do podkategorii 1B wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) niż w przypadku substancji wykazujących wysoką siłę działania uczulającego na skórę (tj. należących do podkategorii 1A wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) (1)(8)(9). Wszystkie te informacje łącznie wskazują na użyteczność badania U-SENS™ w identyfikowaniu zagrożeń związanych z działaniem uczulającym na skórę. Przedstawione tutaj wartości dokładności U-SENS™ jako samodzielnego badania są jednak wyłącznie orientacyjne, ponieważ badanie to należy rozpatrywać w połączeniu z innymi źródłami informacji w kontekście IATA i zgodnie z przepisami pkt 7 i 8 wprowadzenia ogólnego. Co więcej, przy ocenie metod niewymagających wykorzystania zwierząt pod kątem działania uczulającego na skórę należy pamiętać, że LLNA, jak również inne badania przeprowadzane na zwierzętach, mogą nie w pełni odzwierciedlać sytuację w odniesieniu do ludzi.

4. Na podstawie obecnie dostępnych danych wykazano, że badanie U-SENS™ ma zastosowanie do badanych substancji chemicznych (w tym do składników kosmetycznych, np. konserwantów, środków powierzchniowo czynnych, substancji czynnych, barwników) obejmujących szereg organicznych grup funkcyjnych, właściwości fizykochemicznych, sił działania uczulającego na skórę (jak określono w badaniach *in vivo*) oraz spektrum mechanizmów reagowania, o których wiadomo, że mają związek z działaniem uczulającym na skórę (np. akceptor Michaela, powstawanie zasady Schiffa, przenośnik grup acylowych, dwucząsteczkowa substytucja nukleofilowa [S_N2] lub aromatyczna substytucja nukleofilowa [S_NAr]) (1)(8)(9)(10). Badanie U-SENS™ ma zastosowanie do badanych substancji chemicznych, które są rozpuszczalne lub tworzą stabilną dyspersję (tj. koloid lub zawiesinę, w których badana substancja chemiczna nie osadza się ani nie oddziela od rozpuszczalnika/nośnika w różne fazy) w odpowiednim rozpuszczalniku/nośniku (zob. pkt 13). W badaniu U-SENS™ w sposób prawidłowy przewidziano substancje chemiczne zgłaszane w zbiorze danych jako prehapteny (tj. substancje aktywowane przez utlenianie) lub prohapteny (tj. substancje wymagające aktywacji enzymatycznej, np. przez enzymy P450) (1)(10). Stosowanie substancji powodujących przerwanie błony komórkowej może doprowadzić do uzyskania wyników fałszywie dodatnich z powodu niespecyficznego wzrostu ekspresji CD86 – 3 na 7 wyników fałszywie dodatnich względem klasyfikacji odniesienia *in vivo* spowodowane

było stosowaniem środków powierzchniowo czynnych (1). Do wyników dodatnich uzyskanych przy zastosowaniu środków powierzchniowo czynnych jako takich należy podchodzić z ostrożnością, natomiast wyniki ujemne uzyskane przy zastosowaniu środków powierzchniowo czynnych można dalej wykorzystywać do wsparcia identyfikacji badanej substancji chemicznej jako substancji niewykazującej działania uczulającego na skórę. Fluorescencyjne badane substancje chemiczne można ocenić za pomocą badania U-SENS™ (1), jednak badane substancje chemiczne o wysokiej fluorescencji emitujące fale tej samej długości co izotiocyjanian fluoresceiny (FITC) lub jodek propidyny będą zakłócać detekcję przy użyciu cytometrii przepływowej, co uniemożliwia ich prawidłową ocenę z wykorzystaniem przeciwciał skoniugowanych z FITC (potencjalny wynik fałszywie ujemny) lub jodku propidyny (brak możliwości pomiaru żywotności). W takim przypadku można użyć odpowiednio innych przeciwciał znakowanych fluorochromem lub innych markerów cytotoksyczności, o ile można wykazać, że pozwalają one uzyskać wyniki podobne do wyników otrzymywanych w przypadku przeciwciał znakowanych FITC lub jodku propidyny (zob. pkt 18), np. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości wymienionych w dodatku 2.2. W świetle powyższego wyniki dodatnie uzyskane przy zastosowaniu środków powierzchniowo czynnych oraz wyniki ujemne uzyskane przy zastosowaniu badanych substancji chemicznych o wysokiej fluorescencji należy interpretować w kontekście zdefiniowanych ograniczeń i w połączeniu z innymi źródłami informacji w ramach IATA. W przypadkach, w których można przedstawić dowody na brak możliwości zastosowania badania U-SENS™ w odniesieniu do innych konkretnych kategorii badanych substancji chemicznych, nie należy jej stosować w odniesieniu do tych konkretnych kategorii.

5. Jak opisano powyżej, badanie U-SENS™ wspiera rozróżnienie substancji działających uczulająco na skórę i substancji niewykazujących takiego działania. Może ono jednak również potencjalnie wpłynąć na ocenę siły działania uczulającego, gdy stosuje się je w ramach podejść zintegrowanych takich jak IATA. Wymagane jest jednak przeprowadzenie dalszych prac, najlepiej na podstawie danych dotyczących ludzi, aby ustalić, w jaki sposób wyniki badania U-SENS™ mogą potencjalnie wpłynąć na ocenę siły działania.
6. Definicje znajdują się w dodatku 2.1.

ZASADA BADANIA

7. Badanie U-SENS™ jest testem *in vitro*, który pozwala określić ilościowo zmiany ekspresji markera powierzchniowego komórki CD86 w ludzkiej linii komórkowej chłoniaka histiocytarnego, tj. komórkach U937, po 45 ± 3 godzinach narażenia na działanie badanej substancji chemicznej. Marker powierzchniowy CD86 jest jednym z typowych markerów aktywacji U937. Wiadomo, że CD86 jest cząsteczką kostymulującą, która może

naśladować aktywację monocytów, która odgrywa kluczową rolę w uczulaniu limfocytów T. Zmiany ekspresji markera powierzchniowego CD86 mierzy się za pomocą cytometrii przepływowej, zwykle korzystając z przeciwciał znakowanych izotiocyanianem fluoresceiny (FITC). Jednocześnie przeprowadza się również pomiar cytotoksyczności (np. z wykorzystaniem jodku propidyny), aby ocenić, czy podwyższona ekspresja markera powierzchniowego komórki CD86 zachodzi przy stężeniach niższych niż stężenia cytotoksyczne. Wskaźnik stymulacji (S.I.) markera powierzchniowego komórki CD86 w porównaniu z kontrolą z rozpuszczalnikiem/nośnikiem wylicza się i wykorzystuje w modelu prognozowania (zob. pkt 19), aby wesprzeć rozróżnienie substancji działających uczulająco i substancji niewykazujących takiego działania.

WYKAZANIE BIEGŁOŚCI

8. Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania badania opisanego w niniejszym dodatku do metody badawczej B.71 laboratorium powinny wykazać swoją biegłość techniczną z zastosowaniem dziesięciu substancji służących do wykazania biegłości wymienionych w dodatku 2.2 zgodnie z dobrymi praktykami w zakresie metody *in vitro* (11). Ponadto użytkownicy badania powinni prowadzić bazę danych historycznych wygenerowanych podczas kontroli reaktywności (zob. pkt 11) oraz kontroli dodatnich i kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem (zob. pkt 15–16), a także wykorzystywać te dane do potwierdzenia zachowania odtwarzalności badania w swoim laboratorium w miarę upływu czasu.

PROCEDURA

9. Podstawę niniejszego badania stanowi protokół nr 183 bazy danych na temat metod alternatywnych wobec testów na zwierzętach (DB-ALM) dotyczący U-SENS™ (12). Ze standardowych procedur operacyjnych należy korzystać przy wdrażaniu i wykonywaniu badania U-SENS™ w laboratorium. Badanie U-SENS™ można przeprowadzić, korzystając z zautomatyzowanego systemu, jeżeli można wykazać, że pozwala on uzyskać podobne wyniki, np. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości wymienionych w dodatku 2.2. Poniżej opisano główne elementy i procedury badania U-SENS™.

Przygotowanie komórek

10. Do badania U-SENS™ należy wykorzystać ludzką linię komórkową chłoniaka histiocytarnego – U937 (13). Komórki (klon CRL1593.2) należy pozyskać z banku komórek posiadającego niezbędne uprawnienia, takiego jak np. zbiór kultur typu amerykańskiego.

11. Komórki U937 hoduje się w temperaturze 37 °C, w obecności 5 % CO₂ i w wilgotnym środowisku, w podłożu RPMI-1640 z dodatkiem 10 % cielęcej surowicy płodowej, 2 mM L-glutaminy, 100 jednostek/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny (kompletne podłoże). Pasaż komórek U937 odbywa się regularnie co 2–3 dni w gęstości odpowiednio 1,5 lub 3×10^5 komórek/ml. Zagęszczenie komórek nie powinno przekraczać 2×10^6 komórek/ml, a żywotność komórek mierzona poprzez wykluczenie komórek wybarwionych błękitem trypanu powinna wynosić ≥ 90 % (metody tej nie należy stosować przy pierwszym pasażu następującym po rozmrożeniu). Przed wykorzystaniem komórek do badań każdą partię komórek, płodowej surowicy cielęcej lub przeciwciał należy zakwalifikować do badań, przeprowadzając kontrolę reaktywności. Kontrolę reaktywności komórek należy przeprowadzić, wykorzystując do tego celu kontrolę dodatnią, tj. kwas pikrylosulfonowy (kwas 2,4,6-trinitrobenzenosulfonowy, TNBS) (nr CAS 2508-19-2, ≥ 99 % czystości), oraz kontrolę ujemną, tj. kwas mlekowy (LA) (nr CAS 50-21-5, ≥ 85 % czystości), co najmniej tydzień po rozmrożeniu. Podczas kontroli reaktywności należy zbadać sześć stężeń końcowych w każdej z 2 kontroli (TNBS: 1; 12,5; 25; 50; 75; 100 µg/ml, oraz LA: 1; 10; 20; 50; 100; 200 µg/ml). Rozpuszczenie TNBS w kompletnym podłożu powinno wywołać reakcję dodatnią CD86, która powinna być powiązana ze stężeniem (np. gdy po uzyskaniu stężenia dodatniego (wskaźnik stymulacji CD86 ≥ 150) następuje stężenie charakteryzujące się wzrastającą wartością wskaźnika stymulacji CD86), a rozpuszczenie kwasu mlekowego w kompletnym podłożu powinno wywołać reakcję ujemną CD86 (zob. pkt 21). Do analizy należy wykorzystać jedynie partię komórek, która dwukrotnie przeszła kontrolę reaktywności. Komórki można rozmnażać do siedmiu tygodni po rozmrożeniu. Liczba pasaży nie powinna przekraczać 21. Kontrolę reaktywności należy przeprowadzić zgodnie z procedurami opisanymi w pkt 18–22.
12. Komórki U937 wysiewa się do badań w gęstości 3×10^5 komórek/ml albo 6×10^5 komórek/ml i dokonuje ich wstępnej hodowli w kolbach z kulturami odpowiednio przez 2 dni lub 1 dzień. Można zastosować inne warunki hodowli wstępnej niż warunki opisane powyżej, jeżeli przedstawione zostanie wystarczające uzasadnienie naukowe oraz jeżeli można wykazać, że pozwalają one uzyskać podobne wyniki, np. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości wymienionych w dodatku 2.2. W dniu badania komórki pobrane z kolby z kulturami zawiesza się ponownie w świeżym podłożu w gęstości 5×10^5 komórek/ml. Następnie komórki umieszcza się w dołkach 96-dołkowej płytki płaskodennej w objętości po 100 µl (końcowe zagęszczenie komórek – $0,5 \times 10^5$ komórek/dołek).

Przygotowanie badanych substancji chemicznych i substancji kontrolnych

13. Ocenę rozpuszczalności przeprowadza się przed badaniem. W tym celu badane substancje chemiczne są rozpuszczane lub tworzą stabilne dyspersje o stężeniu 50 mg/ml w kompletnym podłożu (pierwszy wariant rozpuszczalnika) lub w sulfotlenku dimetylu

(DMSO, czystość $\geq 99\%$) (drugi wariant rozpuszczalnika/nośnika), jeżeli badana substancja chemiczna nie rozpuszcza się w rozpuszczalniku/nośniku kompletnego podłoża. Na potrzeby badania badaną substancję chemiczną rozpuszcza się do uzyskania stężenia końcowego wynoszącego 0,4 mg/ml w kompletnym podłożu, jeżeli substancja chemiczna jest rozpuszczalna w danym rozpuszczalniku/nośniku. Jeżeli substancja chemiczna jest rozpuszczalna jedynie w sulfotlenku dimetylu, rozpuszcza się ją w stężeniu 50 mg/ml. Można użyć innych rozpuszczalników/nośników niż te opisane powyżej pod warunkiem przedstawienia wystarczającego uzasadnienia naukowego. Należy uwzględnić stabilność badanej substancji chemicznej w końcowym rozpuszczalniku/nośniku.

14. Badane substancje chemiczne oraz substancje kontrolne przygotowuje się w dniu badania. Z uwagi na nieprzeprowadzanie testu ustalającego dawkę na potrzeby pierwszej analizy należy przeprowadzić badania 6 stężeń końcowych (1, 10, 20, 50, 100 i 200 $\mu\text{g/ml}$) w odpowiednim rozpuszczalniku/nośniku albo w kompletnym podłożu, albo w 0,4 % sulfotlenku dimetylu w podłożu. Na potrzeby kolejnych analiz, przy użyciu odpowiedniego rozpuszczalnika/nośnika, przygotowuje się roztwory badanych substancji chemicznych – co najmniej 4 roztwory robocze (tj. w co najmniej 4 stężeniach), zaczynając od stężenia 0,4 mg/ml w kompletnym podłożu lub stężenia 50 mg/ml w sulfotlenku dimetylu. Roztwory robocze ostatecznie wykorzystuje się w celu poddania działaniu substancji chemicznej poprzez dodanie zawiesiny komórkowej linii U937 (zob. pkt 11 powyżej) w objętości równej objętości roztworu roboczego na płytce, aby osiągnąć dalsze dwukrotne rozcieńczenie (12). Doboru stężeń (co najmniej 4 stężeń), które mają zostać wykorzystane na potrzeby kolejnej analizy, dokonuje się w oparciu o poszczególne wyniki wszystkich poprzednich analiz (8). Użytkowe stężenia końcowe: 1; 2; 3; 4; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 60; 70; 80; 90; 100; 120; 140; 160; 180 i 200 $\mu\text{g/ml}$. Maksymalne stężenie końcowe wynosi 200 $\mu\text{g/ml}$. W przypadku zaobserwowania wartości dodatniej CD86 przy stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$ ocenie poddaje się stężenie 0,1 $\mu\text{g/ml}$, aby ustalić stężenie badanej substancji chemicznej, które nie wywołuje przekroczenia przez CD86 progu uzyskania wyniku dodatniego. Jeżeli zaobserwowano dodatnią zależność stężenie-odpowiedź w odniesieniu do CD86, na potrzeby każdej analizy wylicza się wartość EC150 (stężenie, przy którym substancja chemiczna osiąga próg uzyskania wyniku dodatniego dla CD86 wynoszący 150 %, zob. pkt 19). W przypadku gdy badana substancja chemiczna wywołuje reakcję dodatnią CD86 niepowiązaną ze stężeniem, obliczenie wartości EC150 może nie być istotne, jak opisano w protokole nr 183 DB-ALM dotyczącym U-SENSTM (12). Na potrzeby każdej analizy – gdy tylko jest to możliwe – wylicza się wartość CV70 (stężenie, przy którym substancja chemiczna osiąga próg cytotoksyczności wynoszący 70 %, zob. pkt 19) (12). Aby zbadać wpływ wzrostu ekspresji CD86 na zależność stężenie-odpowiedź, spośród stężeń użytkowych należy wybrać dowolne stężenia, których wartości są równomiernie rozłożone między EC150 (lub najwyższym ujemnym stężeniem

niecytotoksycznym CD86) a CV70 (lub najwyższym dopuszczalnym stężeniem, tj. 200 µg/ml). W każdej analizie należy zbadać co najmniej 4 stężenia, przy czym w celu zapewnienia porównywalności co najmniej 2 stężenia powinny być takie same jak w poprzedniej analizie / poprzednich analizach.

15. W ramach kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem w badaniu U-SENS™ stosuje się kompletne podłoże (w przypadku badanych substancji chemicznych rozpuszczonych lub tworzących stabilne dyspersje) (zob. pkt 4) lub sulfotlenek dimetylu w stężeniu 0,4 % w kompletnym podłożu (w przypadku badanych substancji chemicznych rozpuszczonych lub tworzących stabilne dyspersje w sulfotlenku dimetylu).
16. W ramach kontroli dodatkowo w badaniu U-SENS™ (zob. pkt 11) stosuje się TNBS, przygotowany w kompletnym podłożu. TNBS należy stosować jako kontrolę dodatnią na potrzeby pomiaru ekspresji CD86 w końcowym pojedynczym stężeniu na płytce (50 µg/ml) pozwalającym uzyskać żywotność komórek na poziomie > 70 %. W celu uzyskania na płytce stężenia TNBS wynoszącego 50 µg/ml przygotowuje się 1-molowy (tj. o stężeniu 293 mg/ml) roztwór podstawowy TNBS w kompletnym podłożu, który następnie rozcieńcza się 2 930-krotnie w kompletnym podłożu do uzyskania roztworu roboczego o stężeniu 100 µg/ml. Kwas mlekowy (LA, nr CAS 50-21-5) powinien być stosowany jako kontrola ujemna w stężeniu 200 µg/ml, rozpuszczony w kompletnym podłożu (z roztworu podstawowego o stężeniu 0,4 mg/ml). W każdej płytce z każdej analizy przygotowuje się po trzy kontrole: kontroli niepoddanej działaniu substancji chemicznej z kompletnym podłożem, kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem oraz kontroli ujemnej i dodatniej (12). Można stosować inne odpowiednie kontrole dodatnie, jeżeli dostępne są dane historyczne pozwalające na uzyskanie porównywalnych kryteriów dopuszczalności analizy. Kryteria dopuszczalności analizy są takie same jak kryteria opisane w odniesieniu do badanej substancji chemicznej (zob. pkt 12).

Podawanie badanych substancji chemicznych i substancji kontrolnych

17. Kontrolę z rozpuszczalnikiem/nośnikiem lub roztwory robocze opisane w pkt 14–16 miesza się w stosunku 1:1 (obj.) z zawiesinami komórkowymi przygotowanymi w dołkach 96-dołkowej płytki płaskodennej (zob. pkt 12). Następnie płytki poddane działaniu substancji inkubuje się przez 45 ± 3 godziny w temperaturze 37 °C w obecności 5 % CO₂. Przed inkubacją płytki uszczelnia się półprzepuszczalną membraną, aby nie dopuścić do odparowania lotnych badanych substancji chemicznych i aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu między komórkami poddanymi działaniu badanych substancji chemicznych (12).

Wybarwianie komórek

18. Po narażeniu na działanie substancji chemicznej przez 45 godzin $\pm$ 3 godziny komórki przenosi się na mikropłytkę z dnem w kształcie litery V i zbiera się przez odwirowanie. Interferencję rozpuszczalności definiuje się jako kryształ lub krople obserwowane pod mikroskopem w po upływie 45 $\pm$ 3 godzin po poddaniu działaniu substancji (przed wybarwieniem komórek). Supernatanty odrzuca się, a pozostałe komórki przemywa się raz w 100 μ l silnie schłodzonego roztworu chlorku sodu buforowanego fosforanami (PBS) zawierającego 5 % cielęcej surowicy płodowej (roztwór buforowy do wybarwiania). Po odwirowaniu komórki ponownie zawiesza się w 100 μ l roztworu buforowego do wybarwiania i wybarwia się za pomocą 5 μ l (np. 0,25 μ g) przeciwciał anti-CD86 lub mysich przeciwciał IgG1 (izotyp) znakowanych FITC w temperaturze 4 °C przez 30 minut, chronionych przed światłem. Należy wykorzystać przeciwciała opisane w protokole nr 183 DB-ALM dotyczącym U-SENSTM (12) (w odniesieniu do CD86: BD-PharMingen #555657 klon: Fun-1 lub Caltag/Invitrogen # MHCD8601 klon: BU63; oraz w odniesieniu do IgG1: BD-PharMingen #555748 lub Caltag/Invitrogen # GM4992). Z doświadczenia naukowców opracowujących badanie wynika, że intensywność fluorescencji przeciwciał jest zwykle stała w różnych partiach. Do testu można wykorzystać inne klony lub przeciwciała od innego dostawcy, które pomyślnie przeszły kontrolę reaktywności (zob. pkt 11). Użytkownicy mogą jednak rozważyć miareczkowanie przeciwciał w warunkach własnego laboratorium, aby określić stężenie, które jest najbardziej stosowne dla danego zastosowania. Można wykorzystać inny system detekcji, np. przeciwciała anti-CD86 znakowane fluorochromem, jeżeli można wykazać, że pozwala on uzyskać wyniki podobne do wyników otrzymywanych w przypadku wykorzystania przeciwciał skoniugowanych z FITC, np. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości wymienionych w dodatku 2.2. Po dwukrotnym przemyciu w 100 μ l roztworu buforowego do wybarwiania i jednokrotnym przemyciu w 100 μ l silnie schłodzonego PBS komórki zawiesza się ponownie w silnie schłodzonym PBS (np. w 125 μ l w przypadku próbek analizowanych ręcznie probówka po probówce lub w 50 μ l przy użyciu płytki do autosamplera) i dodaje się roztwór jodku propidyny (stężenie końcowe wynoszące 3 μ g/ml). Można wykorzystać inne markery cytotoksyczności, takie jak 7-aminoaktynomycyna D (7-AAD) lub błękit trypanu, jeżeli można wykazać, że alternatywne barwniki pozwalają uzyskać wyniki podobne do wyników otrzymywanych w przypadku wykorzystania jodku propidyny, np. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości wymienionych w dodatku 2.2.

Analiza przy użyciu cytometrii przepływowej

19. Poziom ekspresji CD86 i żywotność komórek analizuje się przy pomocy cytometrii przepływowej. Komórki przedstawia się na wykresie punktowym uwzględniającym parametry wielkości (FSC) i ziarnistości (SSC) w skali logarytmicznej, aby wyraźnie określić populację w pierwszej bramce R1 i wyeliminować pozostałości komórkowe. Na

każdy dołek w bramce R1 pozyskuje się docelowo łącznie 10 000 komórek. Komórki z tej samej bramki R1 przedstawia się na wykresie punktowym uwzględniającym parametry FL3 lub FL4 / SSC. Komórki żywotne wyznacza się poprzez umieszczenie drugiej bramki R2, która pozwala wyodrębnić populację komórek niewybarwionych jodkiem propidyny (kanał FL3 lub FL4). Żywotność komórek można obliczyć za pomocą poniższego równania, korzystając z programu do analizy cytometrycznej. Przy niskiej żywotności komórek można pozyskać do 20 000 komórek, wśród których znajdują się martwe komórki. Ewentualnie dane można pozyskać w ciągu jednej minuty od rozpoczęcia analizy.

$$\text{Żywotność komórek} = \frac{\text{liczba żywych komórek}}{\text{łączna liczba pozyskanych komórek}} \times 100$$

Następnie mierzy się odsetek tych żywych komórek FL1-dodatnich w bramce R2 (wewnątrz bramki R1). Ekspresję CD86 na powierzchni komórek analizuje się na wykresie punktowym w układzie współrzędnych FL1 / SSC w bramce zawierającej komórki żywotne (R2).

W przypadku dołków zawierających kompletne podłoże / IgG1 znacznik analizy ustawia się blisko głównej populacji, tak aby w kontrolach z kompletnym podłożem przeciwciała IgG1 znajdowały się w strefie docelowej wynoszącej 0,6–0,9 %.

Interferencję barw definiuje się jako przesunięcie wykresu punktowego IgG1 znakowanego FITC (średnia geometryczna wskaźnika symulacji IgG1 FL1 ≥ 150 %).

Indeks stymulacji (S.I.) CD86 komórek kontrolnych (niepoddanych działaniu substancji lub zawieszonych w sulfotlenku dimetylu o stężeniu 0,4 %) i komórek poddanych działaniu substancji chemicznej oblicza się według następującego równania:

$$S.I. = \frac{\% \text{ komórek } CD86^{+} \text{ poddanych działaniu substancji chemicznej} - \% \text{ komórek } IgG1^{+} \text{ poddanych działaniu substancji chemicznej}}{\% \text{ komórek } CD86^{+} \text{ w kontroli} - \% \text{ komórek } IgG1^{+} \text{ w kontroli}} \times 100$$

% komórek IgG1⁺ w kontroli niepoddanej działaniu substancji chemicznej: oznacza odsetek komórek IgG1 FL1-dodatnich wyznaczonych za pomocą znacznika analizy (dopuszczalny zakres: $\geq 0,6$ % i $< 1,5$ %, zob. pkt 22) w komórkach żywotnych niepoddanych działaniu substancji chemicznej.

% komórek IgG1⁺/CD86⁺ kontrolnych / poddanych działaniu substancji chemicznej: oznacza odsetek komórek IgG1/CD86 FL1-dodatnich, mierzony bez przesuwania znacznika analizy, w żywych komórkach kontrolnych / poddanych działaniu substancji chemicznej.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Ocena danych

20. W ramach badania U-SENS™ oblicza się następujące parametry: wartość CV70, tj. stężenie, przy którym przeżywalność komórek linii U937 wynosi 70 % (cytotoksyczność na poziomie 30 %), i wartość EC150, tj. stężenie, przy którym badane substancje chemiczne wywołały indeks stymulacji CD86 (S.I.) wynoszący 150 %.

Do obliczenia wartości CV70 stosuje się interpolację logarytmiczno-liniową według następującego równania:

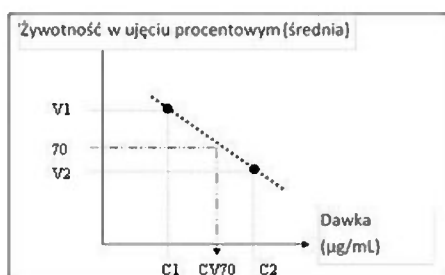
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

gdzie:

V1 oznacza minimalną wartość żywotności komórek powyżej 70 %;

V2 oznacza maksymalną wartość żywotności komórek powyżej 70 %;

C1 i C2 oznaczają stężenia wskazujące odpowiednio wartość żywotności komórek V1 i V2.



Można stosować inne podejścia do określania wartości CV70 pod warunkiem wykazania braku wpływu na wyniki (np. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości).

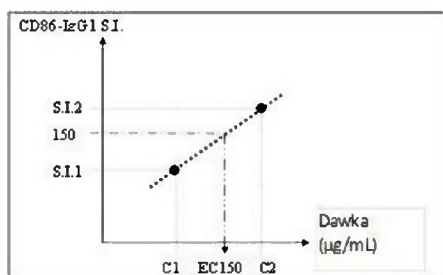
Do obliczenia wartości EC150 stosuje się interpolację logarytmiczno-liniową według następującego równania:

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

gdzie:

C1 oznacza najwyższe stężenie wyrażone w µg/ml przy wskaźniku stymulacji CD86 wynoszącym < 150 % (S.I. 1);

C2 oznacza najniższe stężenie wyrażone w µg/ml przy wskaźniku stymulacji CD86 wynoszącym ≥ 150 % (S.I. 2).



Wartości EC150 i CV70 oblicza się

- na potrzeby każdej analizy: poszczególne wartości EC150 i CV70 wykorzystuje się jako narzędzia do badania wpływu wzrostu ekspresji CD86 na zależność stężenie-odpowiedź (zob. pkt 14);
- na podstawie średniej żywotności określa się ogólną wartość CV70 (12);
- na podstawie średnich wartości wskaźnika stymulacji CD86 określa się ogólną wartość EC150 dla badanej substancji chemicznej, w odniesieniu do której przewiduje się uzyskanie wyniku DODATNIEGO w badaniu U-SENSTM (zob. pkt 21) (12).

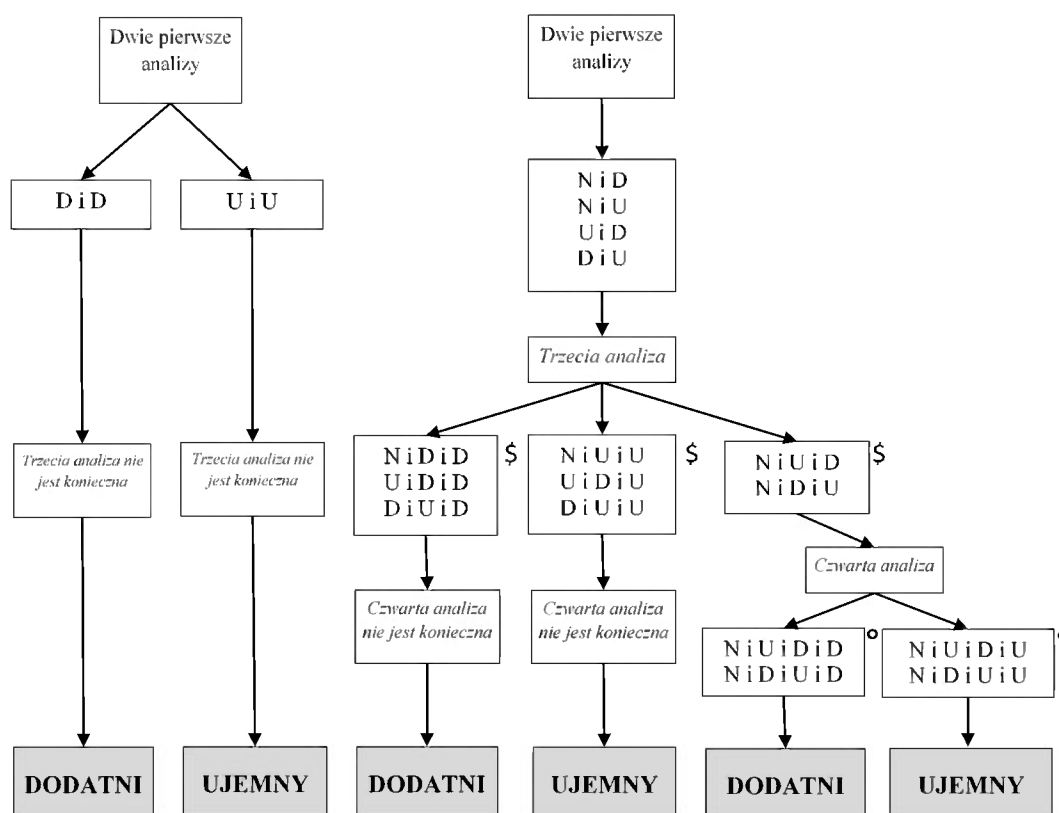
Model prognozowania

21. Na potrzeby pomiaru ekspresji CD86 każdą badaną substancję chemiczną bada się w co najmniej czterech stężeniach i w co najmniej dwóch niezależnych analizach (wykonanych innego dnia) w celu uzyskania pojedynczej prognozy (UJEMNEJ lub DODATNIEJ).

- Pojedynczy wynik analizy przeprowadzonej w ramach badania U-SENSTM uznaje się za ujemny (zwany dalej „U”), jeżeli wskaźnik stymulacji CD86 wynosi mniej niż 150 % we wszystkich stężeniach niecytotoksycznych (żywotność komórek $\geq 70\%$) i jeżeli nie zaobserwowano żadnych zakłóceń (cytotoksyczność, rozpuszczalność: zob. pkt 18 lub barwa: zob. pkt 19 niezależnie od wartości stężeń niecytotoksycznych, przy których wykryto zakłócenia). We wszystkich innych przypadkach: gdy zaobserwowano wskaźnik stymulacji CD86 większy lub równy 150 % lub zakłócenia, pojedynczy wynik analizy U-SENSTM uznaje się za dodatni (zwany dalej „D”).
- Prognozę badania U-SENSTM uważa się za UJEMNĄ, jeżeli wyniki co najmniej dwóch niezależnych analiz są ujemne (U) (rys.1). Jeżeli obie pierwsze analizy dały wyniki ujemne (U), prognozę badania U-SENSTM uznaje się za UJEMNĄ i nie ma potrzeby przeprowadzania trzeciej analizy.
- Prognozę U-SENSTM uważa się za DODATNIĄ, jeżeli wyniki co najmniej dwóch niezależnych analiz są dodatnie (D) (rys.1). Jeżeli obie pierwsze analizy dały wyniki dodatnie (D), prognozę badania U-SENSTM uznaje się za DODATNIĄ i nie ma potrzeby przeprowadzania trzeciej analizy.

- Z uwagi na nieprzeprowadzanie testu ustalającego dawkę wyjątek stanowi sytuacja, w której w pierwszej analizie wskaźnik stymulacji CD86 jest wyższy lub równy 150 % jedynie przy najwyższym stężeniu niecytotoksycznym. Analizę uznaje się wówczas za NIEJEDNOZNACZNĄ (N), a dodatkowe stężenia (pomiędzy najwyższym stężeniem niecytotoksycznym a najniższym stężeniem cytotoxycznym – zob. pkt 20) należy zbadać w ramach dodatkowych analiz. Jeżeli wynik analizy uznano za niejednoznaczny, należy przeprowadzić co najmniej 2 dodatkowe analizy, a czwartą analizę należy przeprowadzić w przypadku, gdy analizy druga i trzecia nie są ze sobą zbieżne (tj. gdy niezależnie uzyskano wyniki U lub D) (rys. 1). Wyniki dalszych analiz zostaną uznane za dodatnie nawet wówczas, gdy tylko jedno stężenie niecytotoksyczne CD86 pozwala uzyskać wynik równy lub wyższy niż 150 %, ponieważ ustalanie stężeń dostosowano do konkretnej badanej substancji chemicznej. O prognozie końcowej przesądzi większość wyników trzech lub czterech osobnych analiz (tj. dwie z trzech lub dwie z czterech) (rys. 1).

Rys. 1: Model prognozowania wykorzystywany w badaniu U-SENSTM. Prognozę U-SENSTM należy rozpatrywać w ramach IATA oraz zgodnie z przepisami pkt 4 i przepisami pkt 7, 8 i 9 wprowadzenia ogólnego.



U: analiza, w której nie zaobserwowano wyniku dodatniego w odniesieniu do CD86 ani żadnych zakłóceń;

D: analiza, w której zaobserwowano wynik dodatni w odniesieniu do CD86 lub zakłócenia;

N: wynik niejednoznaczny. Pierwsza analiza, której wynik uznano za niejednoznaczny, gdy w odniesieniu do CD86 zaobserwowano wynik dodatni przy najwyższym stężeniu niecytotoksycznym;

#: pojedynczy wynik niejednoznaczny (N) przypisany tylko do pierwszej analizy automatycznie pociąga za sobą konieczność przeprowadzenia trzeciej analizy, aby uzyskać większość wyników dodatnich (D) lub ujemnych (U) w co najmniej dwóch z trzech niezależnych analiz;

\$: w polach przedstawiono odpowiednie kombinacje wyników trzech analiz na podstawie wyników uzyskanych w dwóch pierwszych analizach przedstawionych w ramce powyżej;

°: w polach przedstawiono odpowiednie kombinacje wyników czterech analiz na podstawie wyników uzyskanych w trzech pierwszych analizach przedstawionych w ramce powyżej.

Kryteria dopuszczalności

22. Podczas wykonywania badania U-SENS™ spełnione muszą zostać następujące kryteria dopuszczalności (12):

- pod koniec 45 ± 3 -godzinnego okresu narażenia na działanie substancji chemicznej średnia żywotność komórek linii U937 niepoddanych działaniu substancji chemicznej w trzech kontrpróbach musiała wynosić $>90\%$ i nie dopuszcza się możliwości zaobserwowania zniesienia ekspresji CD86. Podstawowa ekspresja CD86 w komórkach linii U937 niepoddanych działaniu substancji chemicznej musiała zawierać się w zakresie od $\geq 2\%$ do $\leq 25\%$;
- w przypadku stosowania sulfotlenku dimetylu jako rozpuszczalnika zasadność przeprowadzenia kontroli z nośnikiem zawierającej sulfotlenek dimetylu ocenia się, obliczając wartość wskaźnika stymulacji sulfotlenku dimetylu w porównaniu z komórkami niepoddanymi działaniu substancji chemicznej, a średnia żywotność komórek w trzech kontrpróbach musi wynosić $>90\%$. kontrola z nośnikiem zawierająca sulfotlenek dimetylu jest właściwa, jeżeli średnia wartość wskaźnika stymulacji CD86 w trzech kontrpróbach tej kontroli była mniejsza niż 250 % średniej wartości wskaźnika stymulacji CD86 komórek linii U937 niepoddanych działaniu substancji chemicznej w trzech kontrpróbach;
- analizy uznaje się za ważne, jeżeli co najmniej dwie z trzech wartości IgG1 komórek linii U937 niepoddanych działaniu substancji chemicznej mieszczą się w przedziale od $\geq 0,6\%$ do $<1,5\%$;
- równolegle badaną kontrolę ujemną (kwas mlekowy) uważa się za ważną, jeżeli w co najmniej dwóch z trzech kontrprób uzyskano wyniki ujemne (wskaźnik stymulacji CD86 $<150\%$) i nie odnotowano cytotoksyczności (żywotność komórek $\geq 70\%$);
- kontrolę dodatnią (TNBS) uznano za ważną, jeżeli w co najmniej dwóch z trzech kontrprób uzyskano wyniki dodatnie (wskaźnik stymulacji CD86 $\geq 150\%$) i nie odnotowano cytotoksyczności (żywotność komórek $\geq 70\%$).

Sprawozdanie z badania

23. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

Substancja jednoskładnikowa

- dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory;
- wygląd fizyczny, rozpuszczalność w kompletnym podłożu, rozpuszczalność w sulfotlenku dimetylu, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie;
- czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;

- postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);
- badane stężenie(-a);
- warunki przechowywania i stabilność, w dostępnym zakresie;
- uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika/nośnika w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej.

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszanina:

- opisana w miarę możliwości np. poprzez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), czystości, przedstawienie informacji dotyczących występowania ilościowego oraz wskazanie istotnych właściwości fizykochemicznych składników (zob. powyżej), w dostępnym zakresie;
- wygląd fizyczny, rozpuszczalność w kompletnym podłożu, rozpuszczalność w sulfotlenku dimetylu i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie;
- masa cząsteczkowa lub pozorna masa cząsteczkowa w przypadku mieszanin lub polimerów o znanym składzie lub inne informacje istotne dla przebiegu badania;
- postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);
- badane stężenie(-a);
- warunki przechowywania i stabilność, w dostępnym zakresie;
- uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika/nośnika w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej.

Kontrole

Kontrola dodatnia

- dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory;
- wygląd fizyczny, rozpuszczalność w sulfotlenku dimetylu, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie i w stosownych przypadkach;
- czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;

- postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);
- badane stężenie(-a);
- warunki przechowywania i stabilność, w dostępnym zakresie;
- odniesienie do wyników historycznych kontroli dodatnich wykazujących odpowiednie kryteria dopuszczalności analizy, w stosownych przypadkach.

Kontrola ujemna oraz kontrola z rozpuszczalnikiem/nośnikiem

- dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory;
- czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;
- wygląd fizyczny, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne w przypadku stosowania innego rozpuszczalnika/nośnika kontrolnego niż te opisane w wytycznej dotyczącej badań, w dostępnym zakresie;
- warunki przechowywania i stabilność, w dostępnym zakresie;
- uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika/nośnika w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej.

Warunki badania

- nazwa i adres sponsora i placówki przeprowadzającej badanie oraz dane kierownika badań;
- opis zastosowanego badania;
- zastosowana linia komórkowa, warunki jej przechowywania oraz źródło (np. placówka, z której ją otrzymano);
- zastosowana cytometria przepływowa (np. model), w tym informacje na temat zastosowanych ustawień przyrządu, przeciwciał i markera cytotoksyczności;
- procedura stosowana w celu wykazania biegłości laboratorium w zakresie przeprowadzania badania poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości lub procedura stosowana do wykazania odtwarzalności badania w czasie, np. dane historyczne dotyczące kontroli lub dane historyczne dotyczące kontroli reaktywności.

Kryteria dopuszczalności badania

- wartości dotyczące żywotności komórek oraz wskaźnika stymulacji CD86 uzyskane za pomocą kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem w porównaniu z zakresami dopuszczalności;
- wartości dotyczące żywotności komórek oraz wskaźnika stymulacji uzyskane za pomocą kontroli dodatniej w porównaniu z zakresami dopuszczalności;
- żywotność komórek przy wszystkich badanych stężeniach badanej substancji chemicznej.

Procedura badawcza

- liczba zastosowanych analiz;
- stosowane stężenia badanej substancji chemicznej, procedura podawania badanej substancji chemicznej i czas narażenia (jeżeli są one inne niż zalecane);
- czas narażenia na działanie substancji chemicznej;
- opis zastosowanych kryteriów oceny i podejmowania decyzji;
- opis wszelkich modyfikacji procedury badawczej.

Wyniki

- tabelaryczne zestawienie danych, w tym wartości CV70 (w stosownych przypadkach), wskaźnika stymulacji, wartości żywotności komórek, wartości EC150 (w stosownych przypadkach), uzyskanych w odniesieniu do badanej substancji chemicznej oraz kontroli dodatniej w każdej analizie oraz wskazanie oceny badanej substancji chemicznej według modelu prognozowania;
- w stosownych przypadkach opis wszelkich innych istotnych obserwacji.

Omówienie wyników

- omówienie wyników uzyskanych za pomocą badania U-SENS™;
- uwzględnienie wyników zastosowania badania w kontekście IATA, jeżeli są dostępne inne odpowiednie informacje.

Wnioski

BIBLIOGRAFIA

- (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 UE (2017). Sprawozdanie z badania walidacyjnego metody badawczej U-SENS™. Dostępne na stronie internetowej: 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. Dostępne na stronie internetowej: [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. Dostępne na stronie internetowej: <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing>
- (5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014. *Cosmetics* 3, 14.
- (6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju. Dostępne na stronie internetowej: <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). Projekt wytycznych: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju. Dostępne na stronie internetowej: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD%20Final%20Draft%20GIVIMP.pdf)
- (12) DB-ALM (2016). (protokół nr 183) Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENSTM), 33pp. Dostępne na stronie internetowej: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].
- (13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565–577.
- (14) OECD (2005). Seria dotycząca badań i oceny nr 34. Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju. Dostępne na stronie internetowej: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>
- (15) Organizacja Narodów Zjednoczonych (ONZ) (2015). Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, wydanie szóste zmienione, Nowy Jork i Genewa: publikacje Organizacji Narodów Zjednoczonych. Dostępne na stronie internetowej: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf

- (16) OECD (2012). Seria dotycząca badań i oceny nr 168. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju. Dostępne na stronie internetowej: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>
- (17) ECETOC (2003). Sprawozdanie techniczne nr 87: Contact sensitization: Classification according to potency. Europejskie Centrum ds. Ekotoksykologii i Toksykologii Substancji Chemicznych, Bruksela. Dostępne na stronie internetowej: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf

Dodatek 2.1

DEFINICJE

Dokładność: stopień zgodności pomiędzy wynikami badania a przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności badania i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność” na oznaczenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy przeprowadzeniu badania (14).

Mechanizm wywoływania skutków szkodliwych: sekwencja zdarzeń, począwszy od struktury chemicznej docelowej substancji chemicznej lub grupy podobnych substancji chemicznych poprzez molekularne zdarzenie inicjujące aż do pożądanego wyniku *in vivo* (15).

Zależność stężenie-odpowiedź w odniesieniu do CD86: zależność od stężenia (lub zależność stężenie-odpowiedź) występuje wówczas, gdy po uzyskaniu stężenia dodatniego (wskaźnik stymulacji $CD86 \geq 150$) następuje stężenie charakteryzujące się wzrastającą wartością wskaźnika stymulacji CD86.

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

CV70: szacowane stężenie, przy którym żywotność komórek wynosi 70 %.

Zniesienie: zniesienie ma miejsce, gdy: (i) skorygowana wartość odsetka komórek $CD86^+$ w kontrpróbie stanowiącej próbę kontrolną niepoddawaną działaniu substancji nr 3 jest mniejsza niż 50 % średniej skorygowanej wartości odsetka komórek $CD86^+$ w kontrpróbach stanowiących próbę kontrolną niepoddawaną działaniu substancji nr 1 i 2; oraz (ii) skorygowana wartość odsetka komórek $CD86^+$ w kontrpróbie stanowiącej kontrolę ujemną nr 3 jest mniejsza niż 50 % średniej skorygowanej wartości odsetka komórek $CD86^+$ w kontrpróbach stanowiących kontrolę ujemną nr 1 i 2.

EC150: szacowane stężenia, przy których wskaźnik stymulacji ekspresji CD86 wynosi 150 %.

Cytometria przepływowa: technika cytometryczna, w której komórki zawieszone w cieczy przepływają jedna po drugiej przez zogniskowaną wiązkę wzbudzającego światła, które rozprasza się według wzorców charakterystycznych dla komórek i ich składników; komórki często oznaczają się znacznikami fluorescencyjnymi, dzięki czemu światło jest najpierw absorbowane, a następnie emitowane w zmienionych częstotliwościach.

Zagrożenie: nieodłączna właściwość czynnika lub sytuacja, która może potencjalnie doprowadzić do niekorzystnych skutków w przypadku narażenia organizmu, systemu lub (sub)populacji na taki czynnik.

IATA (zintegrowane podejście do badań i oceny): usystematyzowane podejście

stosowane w odniesieniu do identyfikacji zagrożeń (potencjał), charakterystyki zagrożeń (siła oddziaływania) lub oceny bezpieczeństwa (potencjał / siła oddziaływania oraz narażenie) substancji chemicznej lub grupy substancji chemicznych; w ramach tego podejścia w sposób strategiczny integruje się i waży wszystkie istotne dane, które mogą wpłynąć na podjęcie decyzji regulacyjnej dotyczącej potencjalnego zagrożenia, ryzyka lub konieczności podjęcia dalszych ukierunkowanych, a przez to minimalnych badań.

Mieszanina: mieszanina lub roztwór, które składają się z co najmniej dwóch substancji.

Substancja jednoskładnikowa: substancja, zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której jeden główny składnik występuje w stężeniu co najmniej 80 % (w/w).

Substancja wieloskładnikowa: substancja, zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której więcej niż jeden główny składnik występuje w stężeniu ≥ 10 % (w/w) i < 80 % (w/w). Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku procesu wytwarzania. Różnica między mieszaniną a substancją wieloskładnikową polega na tym, że mieszaninę uzyskuje się poprzez zmieszanie przynajmniej dwóch substancji, między którymi nie zachodzi reakcja chemiczna. Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku reakcji chemicznej.

Kontrola dodatnia: kontrpróba zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, poddana działaniu substancji chemicznej, o której wiadomo, że wywołuje reakcję dodatnią. Aby zapewnić możliwość oceny zmienności reakcji w kontroli dodatniej w czasie, stopień reakcji dodatniej nie powinien być nadmierny.

Prehapteny: substancje chemiczne, które stają się czynnikami uczulającymi po transformacji abiotycznej, np. poprzez utlenianie.

Prohapteny: substancje chemiczne, które wymagają aktywacji enzymatycznej do uwolnienia swojego potencjalnego działania uczulającego na skórę.

Istotność: opis powiązania badania z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest ono znaczące i użyteczne z punktu widzenia określonego celu. Jest to zakres, w jakim badanie pozwala prawidłowo zmierzyć lub przewidzieć biologiczny oczekiwany skutek. Istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) badania (14).

Wiarygodność: miary zakresu, w jakim badanie może zostać przeprowadzone w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jego przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją, obliczając odtwarzalność wewnątrz- i międzylaboratoryjną oraz powtarzalność wewnątrzlaboratoryjną (14).

Analiza: analiza obejmuje jednoczesne badanie jednej badanej substancji chemicznej lub większej liczby takich substancji w kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem i kontroli dodatniej.

Czułość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik dodatni / aktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą danego badania. Jest to miara dokładności badania, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności badania (14).

S.I.: wskaźnik stymulacji. Wartości względne średniej geometrycznej intensywności fluorescencji w komórkach poddanych działaniu substancji chemicznej w porównaniu z komórkami poddanymi działaniu rozpuszczalnika.

Kontrola z rozpuszczalnikiem/nośnikiem: próbka niepoddana działaniu badanej substancji, zawierająca wszystkie składniki układu badawczego z wyjątkiem badanej substancji chemicznej, ale z uwzględnieniem stosowanego rozpuszczalnika/nośnika. Wykorzystywana jest do określenia wyjściowej reakcji dla próbek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej rozpuszczonej lub stabilnie rozproszonej w tym samym rozpuszczalniku/nośniku. W przypadku badania z jednoczesną kontrolą podłoża próbka ta wykazuje również, czy rozpuszczalnik/nośnik wchodzi w reakcję z układem badawczym.

Swoistość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik ujemny / nieaktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą badania. Jest to miara dokładności badania, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności badania (14).

Roztwór buforowy do wybarwiania: roztwór chlorku sodu buforowany fosforanami zawierający 5 % cielęcej surowicy płodowej.

Substancja: pierwiastek chemiczny i jego związki w stanie naturalnym lub uzyskane w wyniku dowolnego procesu produkcyjnego, w tym wszelkie dodatki konieczne do zachowania jego trwałości i wszelkie zanieczyszczenia powstałe w wyniku zastosowanego procesu, z wyłączeniem ewentualnych rozpuszczalników, które można oddzielić bez wpływu na stabilność substancji i bez zmiany jej składu.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszego badania.

Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (GHS ONZ): system, w ramach którego proponuje się klasyfikację substancji chemicznych (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz omawia się odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak: piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki substancji i produktów niebezpiecznych, aby przekazać informacje na temat ich szkodliwego działania w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) i środowiska (16).

UVCB: substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

Ważne badanie: badanie, które uznano za wystarczająco istotne i wiarygodne dla danego celu i które opiera się na uzasadnionych naukowo podstawach. Badanie nie może zostać uznane za ważne w sensie absolutnym, ale tylko w odniesieniu do określonego celu (14).

Dodatek 2.2

SUBSTANCJE SŁUŻĄCE DO WYKAZANIA BIEGŁOŚCI

Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania badania opisanego w niniejszym dodatku do metody badawczej B.71 laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną, prawidłowo określając prognozę U-SENSTM dla 10 substancji wskazanych w tabeli 1 oraz określając wartości CV70 i EC150, które mieszczą się w odpowiednim zakresie odniesienia, dla co najmniej 8 z 10 substancji służących do wykazania biegłości. Substancje służące do wykazania biegłości wybrano w taki sposób, aby odzwierciedlić zakres reakcji na zagrożenia związane z działaniem uczulającym na skórę. Przy wyborze substancji kierowano się również następującymi kryteriami: dostępnością handlową tych substancji, dostępnością wysokiej jakości danych referencyjnych z badań *in vivo* oraz dostępnością wysokiej jakości danych *in vitro* uzyskanych w wyniku zastosowania badania U-SENSTM. W odniesieniu do badania U-SENSTM można znaleźć również opublikowane dane referencyjne (1)(8).

Tabela 1: Substancje zalecane do wykazania biegłości technicznej w odniesieniu do badania U-SENSTM

Substancje służące do wykazania biegłości	Numer CAS	Stan skupienia	Prognoza <i>in vivo</i> ¹	U-SENS TM Rozpuszczalnik/ nośnik	U-SENS TM Zakres odniesienia CV70 w µg/ml ²	U-SENS TM Zakres odniesienia EC150 w µg/ml ²
4-fenylenodiamina	106-50-3	Stały	Czynnik uczulający (silny)	Kompletne podłoże ³	<30	Dodatni (≤10)
Kwas pikrylosulfonowy	2508-19-2	Ciekły	Czynnik uczulający (silny)	Kompletne podłoże	>50	Dodatni (≤50)
Maleinian dietylu	141-05-9	Ciekły	Czynnik uczulający (w stopniu umiarkowanym)	sulfotlenek dimetylu	10–100	Dodatni (≤20)
Rezorcynol	108-46-3	Stały	Czynnik uczulający (w stopniu umiarkowanym)	Kompletne podłoże	>100	Dodatni (≤50)
Alkohol cynamonowy	104-54-1	Stały	Czynnik uczulający (słaby)	sulfotlenek dimetylu	>100	Dodatni (10–100)
4-allilamizol	140-67-0	Ciekły	Czynnik uczulający (słaby)	sulfotlenek dimetylu	>100	Dodatni (<200)
Sacharyna	81-07-2	Stały	Brak działania uczulającego	sulfotlenek dimetylu	>200	Ujemny (>200)

Glicerol	56-81-5	Ciekły	Brak działania uczulającego	Kompletne podłoże	>200	Ujemny (>200)
Kwas mlekowy	50-21-5	Ciekły	Brak działania uczulającego	Kompletne podłoże	>200	Ujemny (>200)
Kwas salicylowy	69-72-7	Stały	Brak działania uczulającego	sulfotlenek dimetylu	>200	Ujemny (>200)

Skróty: Nr CAS = numer w rejestrze Chemical Abstracts Service.

- ¹ Prognoza zagrożenia (i siły działania) *in vivo* jest oparta na danych z badania LLNA (1)(8). Siłę działania *in vivo* określa się na podstawie kryteriów zaproponowanych przez ECETOC (17).
- ² Na podstawie historycznych wartości zaobserwowanych (1)(8).
- ³ Kompletne podłoże: podłoże RPMI-1640 z dodatkiem 10 % cielęcej surowicy płodowej, 2 mM L-glutaminy, 100 jednostek/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny (8).

Dodatek 3

BADANIE DZIAŁANIA UCZULAJĄCEGO NA SKÓRĘ *IN VITRO*: TEST IL-8 LUC

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

1. W przeciwieństwie do analiz, które mają na celu zbadanie ekspresji markerów powierzchniowych komórki, test IL-8-Luc pozwala określić ilościowo zmiany ekspresji IL-8 – cytokiny związanej z aktywacją komórek dendrytycznych. Ekspresję IL-8 w linii komórek reporterowych IL-8 wywodzącej się z THP-1 (THP-G8, ustanowionej z ludzkiej linii komórkowej ostrej białaczki monocytarnej THP-1) mierzy się po narażeniu na działanie czynników uczulających (1). Następnie ekspresję lucyferazy wykorzystuje się do ułatwienia rozróżnienia substancji działających uczulająco na skórę i substancji niewykazujących takiego działania.
2. Test IL-8 Luc oceniono w ramach badania walidacyjnego (2) przeprowadzonego przez Japońskie Centrum Walidacji Metod Alternatywnych (JaCVAM), **Ministerstwo Gospodarki, Handlu i Przemysłu (METI)** i Japońskie Towarzystwo ds. **Metod Alternatywnych wobec Eksperymentów na Zwierzętach (JSAAE)**, a następnie poddano niezależnej wzajemnej ocenie (3) pod auspicjami JaCVAM i Ministerstwa Zdrowia, Pracy i Opieki Społecznej (MHLW) przy wsparciu **międzynarodowej współpracy w zakresie alternatywnych metod badań (ICATM)**. Biorąc pod uwagę wszystkie dostępne dowody oraz wkład ze strony organów regulacyjnych i zainteresowanych stron, można stwierdzić, że test IL-8 Luc jest przydatnym narzędziem w ramach IATA, pozwalającym rozróżnić substancje działające uczulająco na skórę i substancje niewykazujące takiego działania na potrzeby klasyfikacji i oznakowania pod względem zagrożeń. Przykłady wykorzystania danych z testu IL-8 Luc w połączeniu z innymi informacjami są opisane w literaturze (4)(5)(6).
3. Udowodniono, że test IL-8 Luc można przeprowadzać również w laboratoriach posiadających doświadczenie w zakresie kultury komórkowej i pomiaru lucyferazy. Odtwarzalność wyników w badaniu porównawczym wewnątrz- i międzylaboratoryjnym wynosiła odpowiednio 87,7 % i 87,5 % (2). Z danych uzyskanych w badaniu walidacyjnym (2) i innych opublikowanych pracach (1)(6) wynika, że – w porównaniu z LLNA – w teście IL-8 Luc wynik dodatni lub ujemny przypisano 118 spośród 143 substancji chemicznych, a 25 substancjom chemicznym przypisano wynik niejednoznaczny, przy czym dokładność testu IL-8 Luc w rozróżnianiu substancji działających uczulająco na skórę (należących do kategorii 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) i substancji niewykazujących takiego działania (należących do kategorii wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) wynosi 86 % (101/118) przy czułości na

poziomie 96 % (92/96) i swoistości na poziomie 41 % (9/22). Wyłączając substancje znajdujące się poza dziedziną zastosowania opisaną poniżej (pkt 5), w teście IL-8 Luc wynik dodatni lub ujemny przypisano 113 spośród 136 substancji chemicznych, a 23 substancjom chemicznym przypisano wynik niejednoznaczny, przy czym dokładność testu IL-8 Luc wynosi 89 % (101/113) przy czułości na poziomie 96 % (92/96) i swoistości na poziomie 53 % (9/17). Wykorzystując dane dotyczące ludzi przytoczone przez Urbisch *et al.* (7), w teście IL-8 Luc wynik dodatni lub ujemny przypisano 76 spośród 90 substancji chemicznych, a 14 substancjom chemicznym przypisano wynik niejednoznaczny, przy czym dokładność testu wynosi 80 % (61/76), czułość – 93 % (54/58), a swoistość – 39 % (7/18). Wyłączając substancje znajdujące się poza dziedziną zastosowania, w teście IL-8 Luc wynik dodatni lub ujemny przypisano 71 spośród 84 substancji chemicznych, a 13 substancjom chemicznym przypisano wynik niejednoznaczny, przy czym dokładność testu wynosi 86 % (61/71) przy czułości na poziomie 93 % (54/58) i swoistości na poziomie 54 % (7/13). Prawdopodobieństwo wystąpienia prognoz fałszywie ujemnych przy zastosowaniu testu IL-8 Luc jest większe w przypadku substancji chemicznych wykazujących niską/średnią siłę działania uczulającego na skórę (tj. należących do podkategorii 1B wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) niż w przypadku substancji wykazujących wysoką siłę działania uczulającego (tj. należących do podkategorii 1A wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) (6). Łącznie informacje te łącznie wspierają rolę, jaką test IL-8 Luc odgrywa w identyfikacji zagrożeń związanych z działaniem uczulającym na skórę. Dokładność testu IL-8 Luc podana jako dokładność samodzielnego badania ma wyłącznie charakter orientacyjny, ponieważ test należy rozpatrywać w połączeniu z innymi źródłami informacji w kontekście IATA oraz zgodnie z przepisami pkt 7 i 8 wprowadzenia ogólnego. Co więcej, przy ocenie badań niewymagających wykorzystania zwierząt pod kątem działania uczulającego na skórę należy pamiętać, że LLNA, jak również inne badania przeprowadzane na zwierzętach, mogą nie w pełni odzwierciedlać sytuację w odniesieniu do ludzi.

4. Na podstawie obecnie dostępnych danych wykazano, że test IL-8 Luc ma zastosowanie do badanych substancji chemicznych obejmujących szereg organicznych grup funkcyjnych, mechanizmów reagowania, sił działania uczulającego na skórę (jak określono w badaniach *in vivo*) oraz właściwości fizykochemicznych (2)(6).
5. Mimo że w teście IL-8 Luc jako rozpuszczalnik wykorzystuje się X-VIVOTM 15, przy użyciu tego testu poprawnie oceniono substancje chemiczne, których log K_{ow} wynosi $> 3,5$, oraz te, których rozpuszczalność w wodzie wynosi około 100 µg/ml, zgodnie z obliczeniami przy użyciu EPI SuiteTM, a jego skuteczność w wykrywaniu substancji działających uczulająco słabo rozpuszczalnych w wodzie jest lepsza niż w przypadku testu IL-8 Luc, w którym jako rozpuszczalnik wykorzystuje się sulfotlenek dimetylu (2). Wyniki ujemne uzyskane w odniesieniu do badanych substancji chemicznych, które nie

rozpuszczają się w stężeniu 20 mg/ml, mogą jednak dawać wyniki fałszywie ujemne, ponieważ substancje te nie rozpuszczają się w X-VIVO™ 15. Dlatego też nie należy brać pod uwagę wyników ujemnych uzyskanych w odniesieniu do tych substancji chemicznych. Wysoki odsetek wyników fałszywie ujemnych w przypadku bezwodników zaobserwowano w badaniu walidacyjnym. Ponadto z powodu ograniczonej wydolności metabolicznej linii komórkowej (8) i warunków doświadczalnych prohapteny (substancje wymagające aktywacji metabolicznej) i prehapteny (substancje aktywowane przez utlenianie przy użyciu powietrza) mogą dawać w przedmiotowym teście wyniki ujemne. Chociaż wyniki ujemne uzyskane w odniesieniu do substancji, które mogą być pre-/prohaptenami, należy jednak interpretować z pewną dozą ostrożności, w teście IL-8 Luc prawidłowo oceniono jednak 11 spośród 11 prehaptenów, 6/6 prohaptenów i 6/8 pre-/prohaptenów znajdujących się w zestawie danych testu IL-8 Luc (2). Na podstawie najnowszego kompleksowego przeglądu trzech badań niewymagających wykorzystania zwierząt (DPRA, KeratinoSens™ i h-CLAT) przeprowadzonych w celu wykrycia pre- i prohaptenów (9) oraz w oparciu o fakt, że komórki THP-G8 wykorzystywane w teście IL-8 Luc są linią komórkową wywodzącą się z THP-1, którą wykorzystuje się w badaniu h-CLAT, można stwierdzić, że test IL-8 Luc – w połączeniu z innymi badaniami – może również przyczynić się do zwiększenia czułości badań niewymagających wykorzystania zwierząt pod względem wykrywania pre- i prohaptenów. Dotychczas badane środki powierzchniowo czynne dały wyniki (fałszywie) dodatnie niezależnie od ich rodzaju (np. kationowe, anionowe lub niejonowe). Ponadto substancje chemiczne zakłócające działanie lucyferazy mogą zakłócać jej aktywność/pomiar, powodując inhibicję pozorną lub zwiększoną luminescencję (10). Na przykład z dostępnych informacji wynika, że stężenia fitoestrogenu wyższe niż 1 µM zakłócają sygnały luminescencyjne w innych badaniach genów reporterowych opartych na lucyferazie z powodu nadaktywacji lucyferazowego genu reporterowego. W rezultacie należy ostrożnie badać ekspresję lucyferazy uzyskaną przy wysokich stężeniach fitoestrogenów lub związków, co do których przypuszcza się, że wywołują one – podobnie jak fitoestrogeny – aktywację lucyferazowego genu reporterowego (11). W związku z powyższym środki powierzchniowo czynne, bezwodniki oraz substancje chemiczne zakłócające funkcjonowanie działania lucyferazy znajdują się poza dziedziną zastosowania niniejszego testu. W przypadkach, w których można przedstawić dowody na brak możliwości zastosowania testu IL-8 Luc w odniesieniu do innych konkretnych kategorii badanych substancji chemicznych, testu nie należy stosować w odniesieniu do tych konkretnych kategorii.

6. Jak opisano powyżej, test IL-8 Luc wspiera rozróżnienie substancji działających uczulająco na skórę i substancji niewykazujących takiego działania. Wymagane jest jednak przeprowadzenie dalszych prac, najlepiej na podstawie danych dotyczących ludzi, aby ustalić, w jaki sposób wyniki IL-8 Luc mogą potencjalnie wpłynąć na ocenę siły działania, jeżeli są rozpatrywane w połączeniu z innymi źródłami informacji.

7. Definicje znajdują się w dodatku 3.1.

ZASADA BADANIA

8. W teście IL-8 Luc wykorzystuje się ludzką linię komórkową białaczki monocytarnej THP-1, którą otrzymano ze zbioru kultur typu amerykańskiego (Manassas, Wirginia, Stany Zjednoczone). Wydział dermatologii szkoły medycznej Uniwersytetu Tokohu, wykorzystując tę linię komórkową, ustanowił linię komórek reporterowych IL-8 wywodzącą się z THP-1 – THP-G8, która zawiera geny stabilnej lucyferazy pomarańczowej (SLO) i stabilnej lucyferazy czerwonej (SLR), kontrolowane odpowiednio przez promotory IL-8 oraz dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) (1). Pozwala to na dokonanie ilościowego pomiaru indukcji genu lucyferazy przy wykryciu luminescencji z powszechnie stosowanych substratów lucyferazy generujących światło jako wskaźnika aktywności IL-8 i GAPDH w komórkach, które zostały narażone na działanie substancji działających uczulająco.
9. System testu uwzględniającego dwie barwy zawiera lucyferazę emitującą światło pomarańczowe (SLO; $\lambda_{maks.} = 580 \text{ nm}$) (12) na potrzeby ekspresji genów promotora IL-8, a także lucyferazę emitującą światło czerwone (SLR; $\lambda_{maks.} = 630 \text{ nm}$) (13) na potrzeby ekspresji genów promotora kontroli wewnętrznej – GAPDH. Te dwie lucyferazy emitują różne barwy w reakcji z d-lucyferyną świetlika, a ich luminescencję mierzy się jednocześnie w reakcji jednoetapowej, wykorzystując filtr optyczny do oddzielenia emisji od mieszaniny testowej (14) (dodatek 3.2).
10. Komórki THP-G8 poddaje się działaniu substancji chemicznej przez 16 godzin, po czym mierzy się aktywność lucyferazy SLO (SLO-LA) odzwierciedlającą aktywność promotora IL-8 oraz aktywność lucyferazy SLR (SLR-LA) odzwierciedlającą aktywność promotora GAPDH. Aby ułatwić zrozumienie skrótów, SLO-LA i SLR-LA wyznaczono odpowiednio jako IL8LA i GAPLA. W tabeli 1 przedstawiono opis pojęć związanych z aktywnością lucyferazy w teście IL-8 Luc. Zmierzone wartości wykorzystuje się do obliczenia: znormalizowanej IL8LA (nIL8LA), która jest stosunkiem IL8LA do GAPLA; indukcji nIL8LA (Ind-IL8LA), która jest stosunkiem średnich arytmetycznych czterokrotnie mierzonych wartości nIL8LA komórek THP-G8 poddanych działaniu substancji chemicznej oraz wartości nIL8LA komórek THP-G8 niepoddanych działaniu substancji chemicznej; oraz inhibicji GAPLA (Inh-GAPLA), która jest stosunkiem średnich arytmetycznych czterokrotnie mierzonych wartości GAPLA komórek THP-G8 poddanych działaniu substancji chemicznej i wartości GAPLA komórek THP-G8 niepoddanych działaniu substancji chemicznej, a także jako wskaźnik cytotoksyczności.

Tabela 1: Opis pojęć związanych z aktywnością lucyferazy w teście IL-8 Luc

Skrót	Definicja
GAPLA	Aktywność lucyferazy SLR odzwierciedlająca aktywność promotora GAPDH
IL8LA	Aktywność lucyferazy SLO odzwierciedlająca aktywność promotora IL-8
nIL8LA	IL8LA/GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA komórek THP-G8 poddanych działaniu substancji chemicznych / nIL8LA komórek niepoddanych działaniu substancji chemicznych
Inh-GAPLA	GAPLA komórek THP-G8 poddanych działaniu substancji chemicznych / GAPLA komórek niepoddanych działaniu substancji chemicznych
CV05	Najniższe stężenie substancji chemicznej, w którym Inh-GAPLA przyjmuje wartość <0,05.

11. Aby usprawnić proces walidacji zmienionych testów *in vitro* lucyferazy IL-8 podobnych do testu IL-8 Luc i aby umożliwić terminowe modyfikowanie wytycznej OECD nr 442E dotyczącej badań, można skorzystać z dostępnych standardów wykonywania badań (15). Wzajemne uznawanie danych OECD będzie możliwe wyłącznie w przypadku badań zweryfikowanych zgodnie ze standardem wykonywania badań, jeżeli badania te poddano przeglądowi i włączono do wytycznej OECD nr 442E dotyczącej badań (16).

WYKAZANIE BIEGŁOŚCI

12. Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania badania opisanego w niniejszym dodatku do metody badawczej B.71 laboratorium powinny wykazać swoją biegłość techniczną z zastosowaniem dziesięciu substancji służących do wykazania biegłości wymienionych w dodatku 3.3 zgodnie z dobrymi praktykami w zakresie metody *in vitro* (17). Ponadto użytkownicy badania powinni prowadzić bazę danych historycznych wygenerowanych podczas kontroli reaktywności (zob. pkt 15) oraz kontroli dodatnich i kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem (zob. pkt 21–24), a także wykorzystywać te dane do potwierdzenia zachowania odtwarzalności badania w swoim laboratorium w miarę upływu czasu.

PROCEDURA

13. Standardowa procedura operacyjna dotycząca testu IL-8 Luc jest dostępna i należy z niej korzystać podczas przeprowadzania badania (18). Laboratoria, które chcą przeprowadzić badanie, mogą otrzymać rekombinowaną linię komórkową THP-G8 w laboratorium GPC Co. Ltd. w Tottori w Japonii, podpisując, w zgodzie z warunkami wzoru OECD, porozumienie o transferze materiału. W poniższych punktach opisano najistotniejsze elementy i procedury związane z testem.

Przygotowanie komórek

14. Do przeprowadzenia testu IL-8 Luc (zob. pkt 8 i 13) należy wykorzystać linię komórkową THP-G8 pochodzącą z laboratorium GPC Co. Ltd. w Tottori w Japonii. Po odebraniu komórki rozmnaża się (2–4 pasaży) i przechowuje zamrożone jako jednorodny zbiór. Komórki pochodzące z tego zbioru można rozmnażać do osiągnięcia maksymalnie 12 pasaży lub przez maksimum 6 tygodni. RPMI-1640 jest podłożem wykorzystywanym do rozmnażania, zawierającym 10 % bydlęcej surowicy płodowej (FBS), roztwór antybiotyczny/przeciwgrzybiczy (100 U/ml penicyliny G, 100 µg/ml streptomycyny i 0,25 µg/ml amfoterycyny B w 0,85 % soli fizjologicznej) (np. GIBCO o numerze kat. 15240-062), 0,15 µg/ml puromycyny (np. nr CAS 58-58-2) oraz 300 µg/ml G418 (np. nr CAS 108321-42-2).
15. Przed wykorzystaniem komórek do badań należy je zakwalifikować, przeprowadzając kontrolę reaktywności. Kontrolę tę należy przeprowadzić w terminie 1–2 tygodni lub 2–4 pasaży po rozmrożeniu, stosując kontrolę dodatnią, tj. bromek 4-nitrobenzylu (4-NBB) (nr CAS 100-11-8, czystość $\geq 99\%$), oraz kontrolę ujemną, tj. kwas mlekowy (LA) (nr CAS 50-21-5, czystość $\geq 85\%$). Bromek 4-nitrobenzylu powinien wywołać reakcję dodatnią na Ind-IL8LA ($\geq 1,4$), natomiast kwas mlekowy powinien wywołać reakcję ujemną na Ind-IL8LA ($< 1,4$). W teście należy wykorzystać wyłącznie te komórki, które pomyślnie przeszły kontrolę reaktywności. Kontrolę reaktywności należy przeprowadzić zgodnie z procedurami opisanymi w pkt 22–24.
16. Komórki THP-G8 wysiewa się do badań w gęstości $2\text{--}5 \times 10^5$ komórek/ml i dokonuje ich wstępnej hodowli w kolbach z kulturami przez 48–96 godzin. W dniu badania komórki pobrane z kolb z kulturami przemywa się w podłożu RPMI-1640 zawierającym 10 % FBS bez antybiotyków, a następnie zawiesza się je ponownie w podłożu RPMI-1640 o zawartości 10 % FBS bez antybiotyków w gęstości 1×10^6 komórek/ml. Następnie komórki umieszcza się w dołkach 96-dołkowej czarnej płytki płaskodennej (np. Costar o numerze kat. 3603) w objętości po 50 µl (5×10^4 komórek/ml).

Przygotowanie badanej substancji chemicznej i substancji kontrolnych

17. Badaną substancję chemiczną oraz substancje kontrolne przygotowuje się w dniu badania. Na potrzeby testu IL-8 Luc badane substancje chemiczne rozpuszcza się w X-VIVO™ 15, dostępnym na rynku podłożu pozbawionym surowicy (Lonza, 04-418Q), do stężenia końcowego wynoszącego 20 mg/ml. W probówce do mikrowirówki do 20 mg badanej substancji chemicznej (bez względu na rozpuszczalność tej substancji chemicznej) dodaje się X-VIVO™ 15 aż do uzyskania objętości 1 ml, a następnie przez 30 min energicznie wiruje i wstrząsa na wirniku przy maksymalnej prędkości wynoszącej 8 obr./min w temperaturze otoczenia wynoszącej ok. 20 °C. W przypadku gdy stałe substancje chemiczne wciąż są nierozpuszczalne, probówkę dodatkowo poddaje się działaniu

ultradźwięków do momentu całkowitego rozpuszczenia substancji chemicznej lub utworzenia jej stabilnej dyspersji. W przypadku badanych substancji chemicznych rozpuszczalnych w X-VIVO™ 15 roztwór rozcieńcza się pięciokrotnie za pomocą X-VIVO™ 15 i wykorzystuje jako roztwór podstawowy X-VIVO™ 15 badanej substancji chemicznej (4 mg/ml). W przypadku badanych substancji chemicznych nierozpuszczalnych w X-VIVO™ 15 mieszaninę ponownie wiruje się przez co najmniej 30 minut, a następnie odwirowuje z prędkością 15 000 obr./min. ($\approx 20\,000\text{ g}$) przez 5 min; powstały supernatant wykorzystuje się jako roztwór podstawowy X-VIVO™ 15 badanej substancji chemicznej. W przypadku zastosowania innych rozpuszczalników, takich jak sulfotlenek dimetylu, woda lub podłoże, należy przedstawić uzasadnienie naukowe. W dodatku 3.5 szczegółowo opisano procedurę rozpuszczania substancji chemicznych. Roztwory X-VIVO™ 15 opisane w pkt 18–23 miesza się w stosunku 1:1 (obj.) z zawiesinami komórkowymi przygotowanymi w dołkach 96-dołkowej czarnej płytki płaskodennej (zob. pkt 16).

18. Celem pierwszej analizy testowej jest określenie stężenia cytotoksycznego oraz zbadanie potencjału działania uczulającego na skórę substancji chemicznych. Przy pomocy X-VIVO™ 15 tworzy się serię rozcieńczeń w postępie geometrycznym roztworów podstawowych X-VIVO™ 15 badanych substancji chemicznych, stosując współczynnik rozcieńczenia wynoszący 2 (zob. dodatek 3.5) i wykorzystując do tego celu blok 96-dołkowy (np. Costar o numerze kat. EW-01729-03). Następnie do 50 μl zawiesiny komórkowej znajdującej się w dołkach 96-dołkowej czarnej płytki płaskodennej dodaje się rozcieńczony roztwór w objętości 50 μl /dołek. Dlatego też w przypadku badanych substancji chemicznych rozpuszczalnych w X-VIVO™ 15 stężenia końcowe tych substancji wynoszą 0,002–2 mg/ml (dodatek 3.5). W przypadku badanych substancji chemicznych, które nie rozpuszczają się w X-VIVO™ 15 w stężeniu 20 mg/ml, określa się jedynie współczynniki rozcieńczenia wynoszące $2\text{--}2^{10}$, chociaż rzeczywiste stężenia końcowe badanych substancji chemicznych pozostają niepewne i zależą od stężenia roztworu nasyconego substancji chemicznych w roztworze podstawowym X-VIVO™ 15.
19. W kolejnych analizach testowych (tj. w drugiej, trzeciej i czwartej kontrpróbie) roztwór podstawowy X-VIVO™ 15 tworzy się w stężeniu czterokrotnie wyższym niż stężenie, przy którym żywotność komórek wynosi 05 (CV05; najniższe stężenie, przy którym Inh-GAPLA przyjmuje wartość $< 0,05$) w pierwszym doświadczeniu. Jeżeli najwyższe stężenie Inh-GAPLA nie spadnie poniżej 0,05 w pierwszej analizie, roztwór podstawowy X-VIVO™ 15 tworzy się w najwyższym stężeniu użytym w pierwszej analizie. Stężenie CV05 oblicza się, dzieląc stężenie roztworu podstawowego uzyskanego podczas pierwszej analizy przez współczynnik rozcieńczenia CV05 (X) (współczynnik rozcieńczenia CV05 (X); współczynnik rozcieńczenia wymagany do rozcieńczenia roztworu podstawowego do CV05) (zob. dodatek 3.5). W przypadku badanych substancji nierozpuszczalnych w X-

VIVO w stężeniu 20 mg/ml wartość CV05 określa się, mnożąc stężenie roztworu podstawowego przez 1/X. Jeżeli chodzi o analizy 2–4, przygotowuje się drugi roztwór podstawowy w postaci 4 x CV50 (dodatek 3.5).

20. Serie rozcieńczeń w postępie geometrycznym drugich roztworów podstawowych X-VIVO™ 15 tworzy się, stosując współczynnik rozcieńczenia wynoszący 1,5 i wykorzystując do tego celu blok 96-dołkowy. Następnie do 50 µl zawiesiny komórkowej znajdującej się w dołkach 96-dołkowej czarnej płytki płaskodennej dodaje się rozcieńczony roztwór w objętości 50 µl/dołek. Każde stężenie badanej substancji chemicznej należy badać w czterech dołkach. Próbkę miesza się wówczas za pomocą wytrząsarki do płytek i inkubuje przez 16 godzin w temperaturze 37 °C i w obecności 5 % CO₂, po czym mierzy się aktywność lucyferazy w sposób opisany poniżej.
21. Kontrola z rozpuszczalnikiem jest mieszaniną X-VIVO™ 15 w objętości 50 µl/dołek i zawiesiny komórkowej w RPMI-1640 zawierającej 10 % bydlęcej surowicy płodowej w objętości 50 µl/dołek.
22. Zalecaną kontrolą dodatnią jest bromek 4-nitrobenzylu. W 1,5-mililitrowej probówce do mikromiareczkowania przygotowuje się 20 mg bromku 4-nitrobenzylu, a następnie dodaje się X-VIVO™ 15 do uzyskania objętości 1 ml. Probówkę umieszcza się w wirniku, gdzie jej zawartość jest energicznie mieszana i wstrząsana z maksymalną prędkością 8 obr./min przez co najmniej 30 min. Po odwirowywaniu przy 20 000 g przez 5 minut supernatant rozcieńcza się czterokrotnie w X-VIVO™ 15, a następnie 500 µl rozcieńczonego supernatantu przenosi się do dołka bloku 96-dołkowego. Rozcieńczony supernatant rozcieńcza się dalej w X-VIVO™ 15, stosując współczynniki rozcieńczenia 2 i 4, po czym 50 µl tego roztworu dodaje się do 50 µl zawiesiny komórkowej THP-G8 znajdującej się w dołkach 96-dołkowej czarnej płytki płaskodennej (dodatek 3.6). Każde stężenie kontroli dodatniej należy badać w czterech dołkach. Płytkę wstrząsa się za pomocą wytrząsarki do płytek i inkubuje w inkubatorze CO₂ (37 °C, 5 % CO₂) przez 16 godzin, po czym mierzy się aktywność lucyferazy w sposób opisany w pkt 29.
23. Zaleca się stosowanie kwasu mlekowego jako kontroli ujemnej. W 1,5-mililitrowej probówce do mikromiareczkowania przygotowuje się 20 mg kwasu mlekowego, a następnie dodaje się X-VIVO™ 15 do uzyskania objętości 1 ml (20 mg/ml). Roztwór kwasu mlekowego o stężeniu 20 mg/ml rozcieńcza się pięciokrotnie w X-VIVO™ 15 (4 mg/ml); 500 µl tego roztworu kwasu mlekowego o stężeniu 4 mg/ml przenosi się do dołka bloku 96-dołkowego. Roztwór ten rozcieńcza się dwukrotnie w X-VIVO™ 15, a następnie ponownie rozcieńcza się dwukrotnie, by uzyskać roztwory o stężeniach 2 mg/ml oraz 1 mg/ml. 50 µl tych trzech roztworów oraz kontrolę z nośnikiem (X-VIVO™ 15) dodaje się do 50 µl zawiesiny komórkowej THP-G8 znajdującej się w dołkach 96-dołkowej czarnej płytki płaskodennej. Każde stężenie kontroli ujemnej bada się w czterech dołkach. Płytkę

wstrząsa się za pomocą wytrząsarki do płytek i inkubuje w inkubatorze CO₂ (37 °C, 5 % CO₂) przez 16 godzin, po czym mierzy się aktywność lucyferazy w sposób opisany w pkt 29.

24. Można stosować inne odpowiednie kontrole dodatnie lub ujemne, jeżeli dostępne są dane historyczne pozwalające na uzyskanie porównywalnych kryteriów dopuszczalności analizy.
25. Należy dołożyć starań, aby nie dopuścić do odparowania lotnych badanych substancji chemicznych i aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu między dołkami zawierającymi badane substancje chemiczne, np. szczelnie zaklejając płytkę przed rozpoczęciem inkubacji z wykorzystaniem badanych substancji chemicznych.
26. Uzyskanie prognozy dodatniej lub ujemnej w odniesieniu badanych substancji chemicznych oraz kontroli z rozpuszczalnikiem wymaga przeprowadzenia 2–4 analiz (zob. tabela 2). Każdą analizę przeprowadza się innego dnia, używając świeżego roztworu podstawowego X-VIVO™ 15 badanych substancji chemicznych oraz wykorzystując niezależnie pobrane komórki. Komórki mogą pochodzić z tego samego pasażu.

Pomiary aktywności lucyferazy

27. Luminescencję mierzy się przy zużyciu 96-dołkowego luminometru mikropłytkowego wyposażonego w filtry optyczne, np. Phelios (ATTO, Tokio, Japonia), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Niemcy) oraz seria ARVO (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Aby zapewnić odtwarzalność, luminometr musi być wykalibrowany na potrzeby każdego badania (19). Na potrzeby tej kalibracji dostępne są rekombinowane lucyferazy emitujące światło pomarańczowe i czerwone.
28. 100µl podgrzanego odczynnika do testu lucyferazy Tripluc® (Tripluc) przenosi się do każdego dołka na płytce, który zawiera zawiesinę komórkową poddaną działaniu substancji chemicznej lub niepoddaną takiemu działaniu. Płytkę wstrząsa się przez 10 minut w temperaturze otoczenia wynoszącej ok. 20 °C. Umieszcza się ją w luminetrze, by zmierzyć aktywność lucyferazy. Bioluminescencję mierzy się każdorazowo przez 3 sekundy zarówno z zastosowaniem filtra optycznego (F1), jak i bez niego (F0). W przypadku zastosowania innych ustawień, np. z uwagi na korzystanie z innego modelu luminometru, należy przedstawić stosowne uzasadnienie.
29. Parametry każdego stężenia obliczane są na podstawie zmierzonych wartości, np. IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, średniego odchylenia standardowego (±SD) IL8LA, średniego ±SD GAPLA, średniego ±SD nIL8LA, średniego ±SD Ind-IL8LA, średniego ±SD Inh-GAPLA oraz 95-procentowego przedziału ufności Ind-IL8LA.

Definicje parametrów użytych w niniejszym punkcie znajdują się odpowiednio w dodatkach I oraz IV.

30. Przed pomiarem rozróżnienie kolorystyczne w testach reporterowych, w których stosuje się kilka barw, uzyskuje się zazwyczaj przy użyciu detektorów (luminometru oraz czytnika płytek) wyposażonych w filtry optyczne, takie jak filtry typu *sharp-cut* (długoprzepustowe lub krótkoprzepustowe) lub filtry środkowoprzepustowe. Zgodnie z dodatkiem 3.2 współczynniki transmisji filtrów każdego koloru sygnału bioluminescencji należy wykalibrować przed badaniem.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Ocena danych

31. Zgodnie z kryteriami podejmowania decyzji stwierdzającej wynik dodatni/ujemny wymaga się, aby w każdej analizie:
- prognozę dotyczącą testu IL-8 Luc uznać za dodatnią, jeżeli Ind-IL8LA badanej substancji chemicznej wynosi $\geq 1,4$ oraz gdy dolna wartość graniczna 95-procentowego przedziału ufności Ind-IL8LA wynosi $\geq 1,0$;
 - prognozę dotyczącą testu IL-8 Luc uznać za ujemną, jeżeli Ind-IL8LA badanej substancji chemicznej wynosi $< 1,4$ lub gdy dolna wartość graniczna 95-procentowego przedziału ufności Ind-IL8LA wynosi $< 1,0$.

Model prognozowania

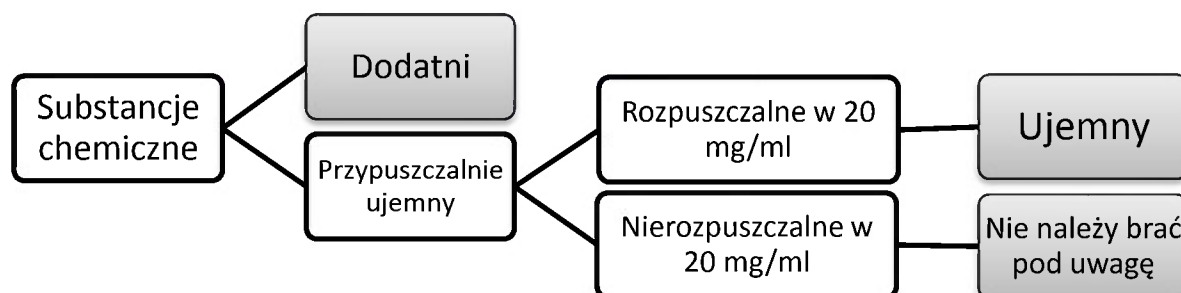
32. Uznaje się, że badane substancje chemiczne, w odniesieniu do których uzyskano wyniki dodatnie w dwóch analizach spośród analiz pierwszej, drugiej, trzeciej lub czwartej, uzyskują wynik dodatni, natomiast substancje, w odniesieniu do których uzyskano wyniki ujemne w trzech analizach spośród analiz pierwszej, drugiej, trzeciej lub czwartej, uzyskują wynik przypuszczalnie ujemny (tabela 2). Spośród substancji chemicznych, w odniesieniu do których przypuszcza się, że uzyskają wynik ujemny, substancjom chemicznym, które rozpuściły się w X-VOVO™ 15 w stężeniu 20 mg/ml, przyznaje się wynik ujemny, natomiast substancji chemicznych, które nie rozpuściły się w X-VOVO™ 15 w stężeniu 20 mg/ml, nie należy brać pod uwagę (rys. 1).

Tabela 2: Kryteria identyfikacji wyniku dodatniego i przypuszczalnie ujemnego

Analiza 1	Analiza 2	Analiza 3	Analiza 4	Prognoza końcowa
Dodatni	Dodatni	-	-	Dodatni
	Ujemny	Dodatni	-	Dodatni
		Ujemny	Dodatni	Dodatni

			Ujemny	Przypuszczalnie ujemny
Ujemny	Dodatni	Dodatni	-	Dodatni
		Ujemny	Dodatni	Dodatni
			Ujemny	Przypuszczalnie ujemny
	Ujemny	Dodatni	Dodatni	Dodatni
			Ujemny	Przypuszczalnie ujemny
		Ujemny	-	Przypuszczalnie ujemny

Rys. 1: Model prognozowania oceny końcowej



Kryteria dopuszczalności

33. Podczas wykonywania testu IL-8 Luc spełnione muszą zostać następujące kryteria dopuszczalności:

- w każdej analizie wartość Ind-IL8LA powinna wynosić powyżej 5,0 w co najmniej jednym stężeniu kontroli dodatniej, tj. bromku 4-nitrobenzylu;
- w każdej analizie wartość Ind-IL8LA powinna wynosić poniżej 1,4 w dowolnym stężeniu kontroli ujemnej, tj. kwasie mlekowym;
- należy odrzucić dane z płytek, w przypadku których wartość GAPLA dołków kontrolnych zawierających komórki i Tripluc, lecz niezawierających substancji chemicznych, jest mniejsza niż pięciokrotność wartości GAPLA dołków zawierających jedynie podłoże do badań (RPMI-1640 zawierające 10 % bydlęcej surowicy płodowej w objętości 50 µl/dołek i X-VIVO™ 15 w objętości 50 µl/dołek);

- należy odrzucić dane z płytek, w przypadku których wartość Inh-GAPLA wszystkich stężeń badanych lub kontrolnych substancji chemicznych jest mniejsza niż 0,05. W tym przypadku należy powtórzyć pierwsze badanie, tak aby najwyższe stężenie końcowe powtórzonego badania było najniższym stężeniem końcowym poprzedniego badania.

Sprawozdanie z badania

34. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badane substancje chemiczne

Substancja jednoskładnikowa:

- dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory;
- wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie;
- czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;
- postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);
- rozpuszczalność w X-VIVO™ 15. w przypadku substancji chemicznych nierozpuszczalnych w X-VIVO™ 15 – czy po odwirowaniu można zaobserwować strącanie lub flotację;
- badane stężenie(-a);
- warunki przechowywania i stabilność, w dostępnym zakresie;
- uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika/nośnika w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej, jeśli nie wykorzystano X-VIVO™ 15.

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszanina:

- opisana w miarę możliwości np. poprzez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), czystości, przedstawienie informacji dotyczących występowania ilościowego oraz wskazanie istotnych właściwości fizykochemicznych składników (zob. powyżej), w dostępnym zakresie;
- wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie;
- masa cząsteczkowa lub pozorna masa cząsteczkowa w przypadku mieszanin lub polimerów o znanym składzie lub inne informacje istotne dla przebiegu badania;

- postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);
- rozpuszczalność w X-VIVO™ 15. w przypadku substancji chemicznych nierozpuszczalnych w X-VIVO™ 15 – czy po odwirowaniu można zaobserwować strącanie lub flotację;
- badane stężenie(-a);
- warunki przechowywania i stabilność, w dostępnym zakresie;
- uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika/nośnika w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej, jeśli nie wykorzystano X-VIVO™ 15.

Kontrole

Kontrola dodatnia:

- dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory;
- wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie i w stosownych przypadkach;
- czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;
- postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);
- badane stężenie(-a);
- warunki przechowywania i stabilność, w dostępnym zakresie;
- odniesienie do wyników historycznych kontroli dodatnich wykazujących odpowiednie kryteria dopuszczalności, w stosownych przypadkach.

Kontrola ujemna:

- dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS lub inne identyfikatory;
- czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;
- wygląd fizyczny, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne w przypadku stosowania innych kontroli ujemnych niż te opisane w wytycznej dotyczącej badań, w dostępnym zakresie;

- warunki przechowywania i stabilność, w dostępnym zakresie;
- uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej.

Warunki badania

- nazwa i adres sponsora i placówki przeprowadzającej badanie oraz dane kierownika badań;
- opis zastosowanego badania;
- zastosowana linia komórkowa, warunki jej przechowywania oraz źródło (np. placówka, z której ją otrzymano);
- numer partii i pochodzenie bydlęcej surowicy płodowej, nazwa dostawcy, numer partii 96-dołkowej czarnej płytki płaskodennej oraz numer partii odczynnika Tripluc;
- liczba pasaży i gęstość komórek wykorzystanych do badań;
- metoda zliczania komórek zastosowana do posiewania przed badaniem i środki podjęte w celu zapewnienia jednorodnego rozmieszczenia liczby komórek;
- zastosowany luminometr (np. model), w tym ustawienia przyrządu, wykorzystany substrat lucyferazy oraz wykazanie odpowiednich pomiarów luminescencji w oparciu o badanie kontrolne opisane w dodatku 3.2;
- procedura stosowana w celu wykazania biegłości laboratorium w zakresie przeprowadzania badania (np. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości) lub do wykazania odtwarzalności badania w czasie.

Procedura badawcza

- liczba zastosowanych kontrprób i wykonanych analiz;
- stosowane stężenia badanej substancji chemicznej, procedura podawania badanej substancji chemicznej i czas narażenia (jeżeli są one inne niż zalecane);
- opis zastosowanych kryteriów oceny i podejmowania decyzji;
- opis zastosowanych kryteriów dopuszczalności badania;
- opis wszelkich modyfikacji procedury badawczej.

Wyniki

- pomiary wartości IL8LA i GAPLA;
- obliczenia dotyczące nIL8LA, Ind-IL8LA i Inh-GAPLA;
- 95-procentowy przedział ufności Ind-IL8LA;

- wykres przedstawiający krzywe dawka-efekt w odniesieniu do indukcji aktywności lucyferazy i żywotności;
- w stosownych przypadkach opis wszelkich innych istotnych obserwacji.

Omówienie wyników

- omówienie wyników uzyskanych za pomocą testu IL-8 Luc;
- uwzględnienie wyników testu w kontekście IATA, jeżeli są dostępne inne odpowiednie informacje.

Wniosek

BIBLIOGRAFIA

- (1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K i 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*. Seria dotycząca badań i oceny nr 267, ENV/JM/MONO(2017)19, Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju. Dostępne na stronie internetowej: <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. Seria dotycząca badań i oceny nr 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju. Dostępne na stronie internetowej: <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. Seria dotycząca badań i oceny nr 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju. Dostępne na stronie internetowej: <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 i 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 i 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 i 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 i 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 i Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646–57.
- (11) OECD (2016). Badanie nr 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, Paryż: OECD Publishing. Dostępne na stronie internetowej: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en>
- (12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M i 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 i 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 i 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). Przeznaczone do publikacji – Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny. Francja, Paryż: OECD.
- (16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 34. Francja, Paryż: OECD.
- (17) OECD (2018). Projekt wytycznych: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Paryż: Organizacja

Współpracy Gospodarczej i Rozwoju. Dostępne na stronie internetowej:
http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf

- (18) JaCVAM (2016). Protokół z testu IL-8 Luc, dostępny na stronie internetowej: http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html
- (19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR i 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. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 168. Francja, Paryż: OECD.
- (21) Organizacja Narodów Zjednoczonych (2015). Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS). wydanie szóste zmienione, Nowy Jork i Genewa: publikacje Organizacji Narodów Zjednoczonych. ISBN: 978-92-1-117006-1, 2015 Dostępne na stronie internetowej:
http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

Dodatek 3.1

DEFINICJE

Dokładność: stopień zgodności pomiędzy wynikami badania a przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności badania i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność” na oznaczenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy przeprowadzeniu badania (16).

Mechanizm wywoływania skutków szkodliwych: sekwencja zdarzeń, poczynając od struktury chemicznej docelowej substancji chemicznej lub grupy podobnych substancji chemicznych poprzez molekularne zdarzenie inicjujące aż do pożądanego wyniku *in vivo* (20).

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

CV05: żywotność komórek 05, tj. minimalne stężenie, przy którym substancje chemiczne wykazują wartość Inh-GAPLA poniżej 0,05.

FInSLO-LA: skrót stosowany w sprawozdaniu z walidacji i we wcześniejszych publikacjach dotyczących testu IL-8 Luc w odniesieniu do Ind-IL8LA. Definicja – zob. Ind-IL8LA.

GAPLA: aktywność stabilnej lucyferazy czerwonej (SLR) ($\lambda_{\text{maks.}} = 630 \text{ nm}$), regulowana przez promotor GAPDH oraz wykazująca żywotność komórek i liczbę komórek żywych.

Zagrożenie: nieodłączna właściwość czynnika lub sytuacja, która może potencjalnie doprowadzić do niekorzystnych skutków w przypadku narażenia organizmu, systemu lub (sub)populacji na taki czynnik.

IATA (zintegrowane podejście do badań i oceny): usystematyzowane podejście stosowane w odniesieniu do identyfikacji zagrożeń (potencjał), charakterystyki zagrożeń (siła oddziaływania) lub oceny bezpieczeństwa (potencjał / siła oddziaływania oraz narażenie) substancji chemicznej lub grupy substancji chemicznych; w ramach tego podejścia w sposób strategiczny integruje się i waży wszystkie istotne dane, które mogą wpłynąć na podjęcie decyzji regulacyjnej dotyczącej potencjalnego zagrożenia, ryzyka lub konieczności podjęcia dalszych ukierunkowanych, a przez to minimalnych badań.

II-SLR-LA: skrót stosowany w sprawozdaniu z walidacji i we wcześniejszych publikacjach dotyczących testu IL-8 Luc w odniesieniu do Inh-GAPLA. Definicja – zob. Inh-GAPLA.

IL-8 (Interleukina-8): cytokina pozyskana z komórek śródbłona, fibroblastów, keratynocytów, makrofagów i monocytów, która powoduje chemotaksję neutrofili i limfocytów T.

IL8LA: aktywność stabilnej lucyferazy pomarańczowej (SLO) ($\lambda_{\text{maks.}} = 580 \text{ nm}$),

regulowana przez promotor IL-8.

Ind-IL8LA: krotność indukcji IL8LA. Wartość tę uzyskuje się, dzieląc wartość nIL8LA komórek THP-G8 poddanych działaniu substancji chemicznych przez wartość nil8LA niestymulowanych komórek THP-G8; wartość Ind-IL8LA odzwierciedla indukcję aktywności promotora IL-8 przy pomocy substancji chemicznych.

Inh-GAPLA: inhibicja GAPLA. Wartość tę uzyskuje się, dzieląc wartość GAPLA komórek THP-G8 poddanych działaniu substancji chemicznych przez wartość GAPLA komórek THP-G8 niepoddanych działaniu substancji chemicznych; Inh-GAPLA odzwierciedla cytotoksyczność substancji chemicznych.

Minimalny próg indukcji: najniższe stężenie, przy którym substancja chemiczna spełnia kryteria uzyskania wyniku dodatniego.

Mieszanina: mieszanina lub roztwór, które składają się z co najmniej dwóch substancji.

Substancja jednoskładnikowa: substancja, zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której jeden główny składnik występuje w stężeniu co najmniej 80 % (w/w).

Substancja wieloskładnikowa: substancja, zdefiniowana za pomocą jej składu ilościowego, w której więcej niż jeden główny składnik występuje w stężeniu ≥ 10 % (w/w) i < 80 % (w/w). Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku procesu wytwarzania. Różnica między mieszaniną a substancją wieloskładnikową polega na tym, że mieszaninę uzyskuje się poprzez zmieszanie przynajmniej dwóch substancji, między którymi nie zachodzi reakcja chemiczna. Substancja wieloskładnikowa powstaje w wyniku reakcji chemicznej.

nIL8LA: aktywność lucyferazy SLO odzwierciedlająca aktywność promotora IL-8 (IL8LA), znormalizowana przez aktywność lucyferazy SLR odzwierciedlającą aktywność promotora GAPDH (GAPLA). Wartość nIL8LA odzwierciedla aktywność promotora IL-8 po uwzględnieniu żywotności komórek lub ich liczby.

nSLO-LA: skrót stosowany w sprawozdaniu z walidacji i we wcześniejszych publikacjach dotyczących testu IL-8 Luc w odniesieniu do nIL8LA. Definicja – zob. nIL8LA.

Kontrola dodatnia: kontrpróba zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, poddana działaniu substancji chemicznej, o której wiadomo, że wywołuje reakcję dodatnią. Aby zapewnić możliwość oceny zmienności reakcji w kontroli dodatniej w czasie, stopień reakcji dodatniej nie powinien być nadmierny.

Prehapteny: substancje chemiczne, które stają się czynnikami uczulającymi po transformacji abiotycznej.

Prohapteny: substancje chemiczne, które wymagają aktywacji enzymatycznej do uwolnienia swojego potencjalnego działania uczulającego na skórę.

Istotność: opis powiązania badania z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest ono znaczące i użyteczne z punktu widzenia określonego celu. Jest to zakres, w jakim badanie pozwala prawidłowo zmierzyć lub przewidzieć biologiczny oczekiwany skutek. istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) badania (16).

Wiarygodność: miary zakresu, w jakim badanie może zostać przeprowadzone w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jego przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją, obliczając odtwarzalność wewnątrz- i międzylaboratoryjną oraz powtarzalność wewnątrzlaboratoryjną (16).

Analiza: analiza obejmuje jednoczesne badanie jednej badanej substancji chemicznej lub większej liczby takich substancji w kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem i kontroli dodatniej.

Czułość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik dodatni / aktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą danego badania. Jest to miara dokładności badania, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności badania (16).

SLO-LA: skrót stosowany w sprawozdaniu z walidacji i we wcześniejszych publikacjach dotyczących testu IL-8 Luc w odniesieniu do IL8LA. Definicja – zob. IL8LA.

SLR-LA: skrót stosowany w sprawozdaniu z walidacji i we wcześniejszych publikacjach dotyczących testu IL-8 Luc w odniesieniu do GAPLA. Definicja – zob. GAPLA.

Kontrola z rozpuszczalnikiem/nośnikiem: próbka niepoddana działaniu badanej substancji, zawierająca wszystkie składniki układu badawczego z wyjątkiem badanej substancji chemicznej, ale z uwzględnieniem stosowanego rozpuszczalnika/nośnika. Wykorzystywana jest do określenia wyjściowej reakcji dla próbek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej rozpuszczonej lub stabilnie rozproszonej w tym samym rozpuszczalniku/nośniku. W przypadku badania z jednoczesną kontrolą podłoża próbka ta wykazuje również, czy rozpuszczalnik/nośnik wchodzi w reakcję z układem badawczym.

Swoistość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik ujemny / nieaktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą badania. Jest to miara dokładności badania, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności badania (16).

Substancja: pierwiastki chemiczne i ich związki w stanie naturalnym lub uzyskane w wyniku dowolnego procesu produkcyjnego, w tym wszelkie dodatki konieczne do zachowania trwałości produktu i wszelkie zanieczyszczenia powstałe w wyniku zastosowanego procesu, z wyłączeniem wszelkich rozpuszczalników, które można oddzielić bez wpływu na stabilność substancji i bez zmiany jej składu.

Środek powierzchniowo czynny: zwany także surfaktantem, jest to substancja, np.

detergent, która może zmniejszać napięcie powierzchniowe cieczy, umożliwiając tym samym jej pienienie lub przenikanie w ciała stałe; substancja ta jest także zwana środkiem zwilżającym. (TG437)

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody.

THP-G8: linia komórek reporterowych IL-8 wykorzystana w teście IL-8 Luc. Ludzką linię komórkową THP-1 typu makrofagowego poddano transfekcji przy użyciu genów lucyferazy SLO i SLR pod kontrolą odpowiednio promotorów IL-8 i GAPDH.

Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (GHS ONZ): system, w ramach którego proponuje się klasyfikację substancji chemicznych (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz omawia się odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak: piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki substancji i produktów niebezpiecznych, aby przekazać informacje na temat ich szkodliwego działania w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) i środowiska (21).

UVCB: substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

Ważna metoda badawcza: badanie, które uznano za wystarczająco istotne i wiarygodne dla danego celu i które opiera się na uzasadnionych naukowo podstawach. Badanie nie może zostać uznane za ważne w sensie absolutnym, ale tylko w odniesieniu do określonego celu.

Dodatek 3.2

ZASADA POMIARU AKTYWNOŚCI LUCYFERAZY I OKREŚLANIA WSPÓŁCZYNNIKÓW TRANSMISJI FILTRA OPTYCZNEGO W ODNIESIENIU DO SLO I SLR

Układ do testowania przy użyciu wielu reporterów – Tripluc – można stosować z luminometrem mikropłytkowym posiadającym system detekcji wielu barw, który można wyposażyć w filtr optyczny (np. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). Filtrami optycznymi stosowanymi w pomiarach jest filtr długo- lub krótkoprzepustowy przepuszczający częstotliwości 600–620 nm lub filtr środkowoprzepustowy przepuszczający częstotliwości 600–700 nm.

Pomiar lucyferaz emitujących dwie barwy za pomocą filtra optycznego

W niniejszym przykładzie zastosowano filtr Phelios AB-2350 (ATTO). Przedmiotowy luminometr wyposażony jest w filtr długoprzepustowy przepuszczający częstotliwość 600 nm (R60 HOYA Co.), zwany dalej „filtrem długoprzepustowym 600 nm” (filtr 1), do rozdzielania luminescencji SLO ($\lambda_{\text{maks.}} = 580 \text{ nm}$) i SLR ($\lambda_{\text{maks.}} = 630 \text{ nm}$).

Aby wyznaczyć współczynniki transmisji filtra długoprzepustowego 600 nm, najpierw – korzystając z oczyszczonych enzymów lucyferazy SLO i SLR – należy: (i) zmierzyć intensywność bioluminescencji SLO i SLR bez filtra (F0), (ii) zmierzyć intensywność bioluminescencji SLO i SLR, które przeszły przez filtr długoprzepustowy 600 nm (filtr 1), oraz (iii) obliczyć współczynniki transmisji filtra długoprzepustowego 600 nm w odniesieniu do SLO i SLR wymienionych poniżej.

Współczynniki transmisji		Skrót	Definicja
SLO	Współczynniki transmisji filtra 1	κ_{OR60}	Współczynnik transmisji filtra dla SLO
SLR	Współczynniki transmisji filtra 1	κ_{RR60}	Współczynnik transmisji filtra dla SLR

Jeżeli intensywność SLO i SLR w badanej próbce określono odpowiednio jako O i R, (i) intensywność światła bez filtra (tylko optycznego) F0 i (ii) intensywność światła przechodzącego przez filtr długoprzepustowy 600 nm (filtr 1) F1 opisuje się w sposób określony poniżej:

$$F0 = O + R$$

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

Wzory te można wyrazić następująco:

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

Wówczas za pomocą obliczonych czynników przepuszczalności (κO_{R60} i κR_{R60}) oraz zmierzonych wartości dla F0 i F1 można obliczyć wartości O i R w następujący sposób:

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

Materiały i metody wyznaczania czynnika przepuszczalności

1) Odczynniki

Pojedyncze oczyszczone enzymy lucyferazy:

lioofilizowany oczyszczony enzym SLO

lioofilizowany oczyszczony enzym SLR

(które dla celów walidacji pozyskano z GPC Lab. Co. Ltd. w Tottori w Japonii razem z linią komórkową THP-G8).

Odczynnik testowy:

odczynnik testowy lucyferazy Tripluc[®] (np. z TOYOBO Cat#MRA-301).

Podłoże: do testu lucyferazy (30 ml, przechowywane w temperaturze 2–8 °C).

Odczynnik	Stężenie	Stężenie końcowe w podłożu	Wymagana ilość
RPMI-1640	-	-	27 ml
Bydlęca surowica płodowa	-	10 %	3 ml

2) Przygotowanie roztworu enzymu

Liofilizowany oczyszczony enzym lucyferazy należy rozpuścić w probówce, dodając 200 µl Tris/HCl lub HEPES/HCl o stężeniu 10–100 mM (pH 7,5–8,0) zawierającego 10 % (w/v) glicerolu, podzielić roztwór enzymu na podwielokrotności 10 µl w jednorazowych probówkach o pojemności 1,5 ml i przechowywać je w zamrażarce w temperaturze -80 °C. Zamrożony roztwór enzymu nadaje się do użycia przez okres do 6 miesięcy. Podczas korzystania z roztworu należy dodać 1 ml podłoża do testu lucyferazy (RPMI-1640 zawierającego 10 % bydlęcej surowicy płodowej) do każdej próbki zawierającej roztwór enzymu (rozcieńczony roztwór enzymu), a próbki należy przechowywać na lodzie, by zapobiec dezaktywacji enzymów.

3) Pomiar bioluminescencji

Rozmrozić odczynnik do testu lucyferazy Tripluc® (Tripluc) i przechowywać w temperaturze pokojowej w łaźni wodnej albo w temperaturze otoczenia. Luminometr należy włączyć 30 minut przed rozpoczęciem pomiaru, aby umożliwić stabilizację fotopowielacza. 100 µl rozcieńczonego roztworu enzymu należy przenieść do dołków 96-dołkowej czarnej płytki (płaskodennej) (próbka referencyjna SLO do #B1, #B2, #B3, próbka referencyjna SLR do #D1, #D2, #D3). Następnie za pomocą pipety należy przenieść 100 µl podgrzanego odczynnika Tripluc do każdego dołka płytki zawierającego rozcieńczony roztwór enzymu. Płytkę należy wytrząsać przez 10 minut w temperaturze pokojowej (około 25 °C) w wytrząsarce do płytek. Jeżeli w dołkach pojawią się pęcherzyki powietrza, należy je usunąć. Płytkę należy umieścić w luminometrze, aby dokonać pomiaru aktywności lucyferazy. Bioluminescencję mierzy się każdorazowo przez 3 sekundy zarówno z zastosowaniem filtra optycznego (F1), jak i bez niego (F0).

Współczynnik transmisji filtra optycznego obliczono w następujący sposób:

współczynnik transmisji (SLO (κ_{OR60})) = (#B1 z F1 + #B2 z F1 + #B3 z F1) / (#B1 z F0 + #B2 z F0 + #B3 z F0)

Współczynnik transmisji (SLR (κ_{R60})) = (#D1 z F1 + #D2 z F1 + #D3 z F1) / (#D1 z F0 + #D2 z F0 + #D3 z F0)

Obliczone współczynniki przepuszczalności wykorzystuje się do wszystkich pomiarów wykonywanych przy pomocy tego samego luminometru.

Kontrola jakości sprzętu

Należy stosować procedury opisane w protokole IL-8 Luc (18).

Dodatek 3.3

SUBSTANCJE SŁUŻĄCE DO WYKAZANIA BIEGŁOŚCI

Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania badania opisanego w niniejszym dodatku do metody badawczej B.71 laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną, prawidłowo określając prognozę testu IL-8 Luc dla 10 substancji wskazanych w tabeli 1 oraz określając wartości, które mieszczą się w odpowiednim zakresie odniesienia, dla co najmniej 8 z 10 substancji służących do wykazania biegłości (wybranych w celu przedstawienia zakresu reakcji na zagrożenia związane z działaniem uczulającym na skórę). Przy wyborze substancji kierowano się również następującymi kryteriami: dostępnością handlową tych substancji, dostępnością wysokiej jakości danych referencyjnych z badań *in vivo* oraz dostępnością wysokiej jakości danych *in vitro* uzyskanych w wyniku zastosowania testu IL-8 Luc. W odniesieniu do testu IL-8 Luc można znaleźć również opublikowane dane referencyjne (6)(1).

Tabela 1: Substancje zalecane do wykazania biegłości technicznej w odniesieniu do testu IL-8 Luc

Substancje służące do wykazania biegłości	Nr CAS	Stan skupienia	Rozpuszczalność w X-VIVO15 przy stężeniu 20 mg/ml	Prognoza <i>in vivo</i> ¹	Prognoza dotycząca IL-8 Luc ²	Zakres odniesienia (µg/ml) ³	
						CV05 ⁴	Minimalny próg indukcji ⁵ IL-8 Luc
2,4-dinitrochlorobenzen	97-00-7	Stały	Nierozpuszczalny	Czynnik uczulający (wyjątkowo silny)	Dodatni	2,3–3,9	0,5–2,3
Formaldehyd	50-00-0	Ciekły	Rozpuszczalny	Czynnik uczulający (silny)	Dodatni	9–30	4–9
2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	Stały	Nierozpuszczalny	Czynnik uczulający (w stopniu umiarkowanym)	Dodatni	250–290	60–250
Etyleneodiamina	107-15-3	Ciekły	Rozpuszczalny	Czynnik uczulający (w stopniu umiarkowanym)	Dodatni	500–700	0,1–0,4
Dimetakrylan glikolu etylenowego	97-90-5	Ciekły	Nierozpuszczalny	Czynnik uczulający (słaby)	Dodatni	>2 000	0,04–0,1
4-allylamizol (Estragol)	140-67-0	Ciekły	Nierozpuszczalny	Czynnik uczulający (słaby)	Dodatni	>2 000	0,01–0,07
Siarczan streptomycyny	3810-74-0	Stały	Rozpuszczalny	Brak działania uczulającego	Ujemny	>2 000	>2 000

Glicerol	56-81-5	Ciekły	Rozpuszczalny	Brak działania uczulającego	Ujemny	>2 000	>2 000
Izopropanol	67-63-0	Ciekły	Rozpuszczalny	Brak działania uczulającego	Ujemny	>2 000	>2 000

Skróty: Nr CAS = numer w rejestrze Chemical Abstracts Service.

¹ Siłę działania *in vivo* określa się na podstawie kryteriów zaproponowanych przez ECETOC (19).

² Na podstawie historycznych wartości zaobserwowanych (1)(6).

³ Wartość CV05 i minimalny próg indukcji IL-8 Luc obliczono, wykorzystując wartość rozpuszczalności w wodzie określoną przy użyciu EPI SuiteTM.

⁴ CV05: minimalne stężenie, przy którym substancje chemiczne wykazują wartość Inh-GAPLA poniżej 0,05.

⁵ Minimalny próg indukcji: najniższe stężenie, przy którym substancja chemiczna spełnia kryteria uzyskania wyniku dodatniego.

Dodatek 3.4

WSKAŹNIKI I KRYTERIA OCENY

nIL8LA (nSLO-LA)

Dokonyuje się pomiaru określonego kolejnego powtórzenia j ($j = 1-4$) określonego kolejnego stężenia i ($i = 0-11$) odpowiednio dla IL8LA (SLO-LA) oraz GAPLA (SLR-LA). Znormalizowaną IL8LA, zwaną nIL8LA (nSLO-LA), określa się następująco:

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

Jest to podstawowa jednostka miary w niniejszym teście.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Podstawową miarę w niniejszym teście stanowi wzrost krotności uśrednionego nIL8LA (nSLO-LA) dla powtórzenia określonego kolejnego stężenia i w porównaniu z uśrednionym nIL8LA (nSLO-LA) przy stężeniu wynoszącym 0, Ind-IL8LA. Stosunek ten wyraża się za pomocą następującego wzoru:

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

Laboratorium wiodące zaproponowało, aby wartość 1,4 odpowiadała dodatniemu wynikowi badanej substancji chemicznej. Wartość tę określono przez zbadanie danych historycznych z laboratorium wiodącego. Następnie zespół ds. zarządzania danymi wykorzystywał tę wartość na wszystkich etapach badania walidacyjnego. Początkowy wynik, Ind-IL8LA, jest stosunkiem 2 średnich arytmetycznych, jak pokazano w równaniu.

95-procentowy przedział ufności (95 % CI)

Na podstawie tego wskaźnika można oszacować 95-procentowy przedział ufności (95 % CI), aby pokazać precyzję tego pomiaru początkowego wyniku. Dolna granica 95-procentowego przedziału ufności wynosząca ≥ 1 wskazuje na to, że wartość nIL8LA przy określonym kolejnym stężeniu i jest znacznie większa niż w kontroli z rozpuszczalnikiem. Istnieje kilka sposobów opracowania 95-procentowego przedziału ufności. W niniejszym badaniu wykorzystano metodę znaną jako twierdzenie Fiellera. 95-procentowy przedział ufności uzyskuje się, korzystając z następującego wzoru:

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

gdzie:

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}, \quad B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}, \quad C = \bar{y}_1^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_{y1}^2}{n_{y1}}, \quad n_0 = 4,$$

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

$$n_{y1} = 4, \quad \bar{y}_1 = (1/n_{y1}) \times \sum_j (nIL8LA_{1j}), \quad sd_{y1}^2 = \{1/(n_{y1} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{1j} - \bar{y}_1)^2.$$

$t_{0.975(v)}$ wynosi 97,5 percentyla centralnego rozkładu t przy stopniu swobody v , gdzie

$$v = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{y1}^2}{n_{y1}} \right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0} \right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{y1}^2}{n_{y1}} \right) / (n_{y1} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Inh-GAPLA jest stosunkiem uśrednionego GAPLA (SLR-LA) dla powtórzenia określonego kolejnego stężenia i do stężenia w kontroli z rozpuszczalnikiem, a wartość tę wyraża się jako:

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

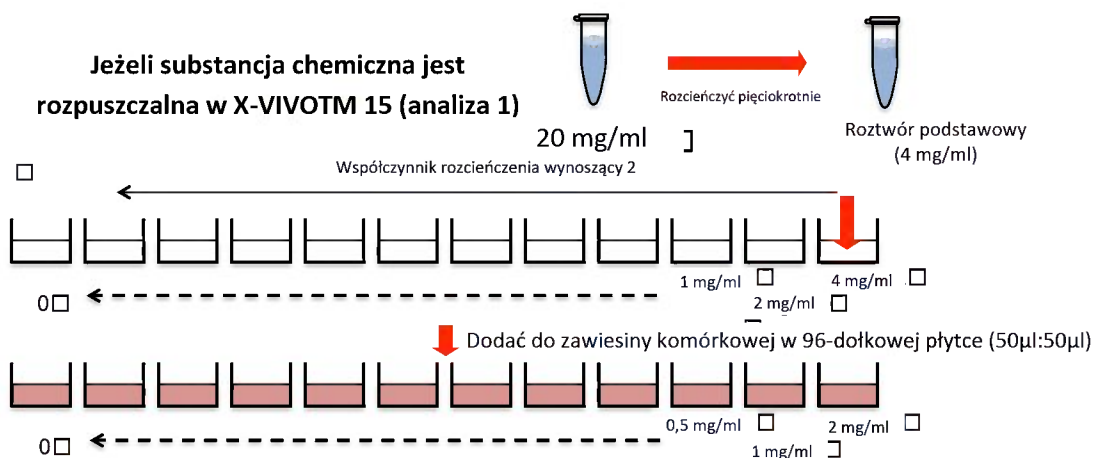
Ponieważ GAPLA jest mianownikiem nIL8LA, bardzo mała wartość powoduje duże zróżnicowanie nIL8LA. Dlatego też wartości Ind-IL8LA przy bardzo małych wartościach Inh-GAPLA (poniżej 0,05) można uznać za mało precyzyjne.

Dodatek 3.5

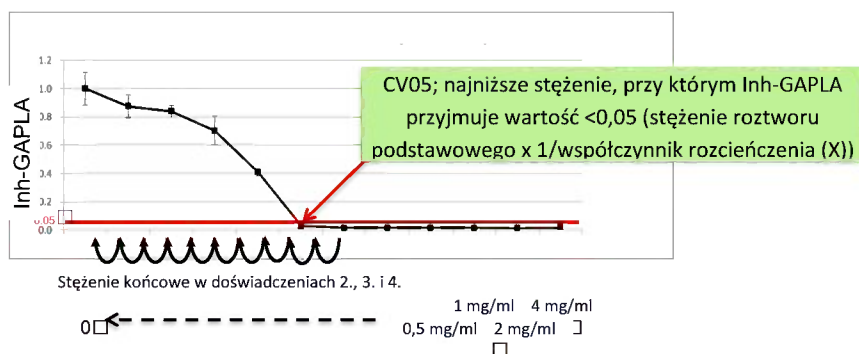
**SCHEMAT METOD ROZPUSZCZANIA SUBSTANCJI CHEMICZNYCH W TEŚCIE IL-8
LUC**

- a) W przypadku substancji chemicznych rozpuszczanych w X-VIVO™ 15 w stężeniu 20 mg/ml

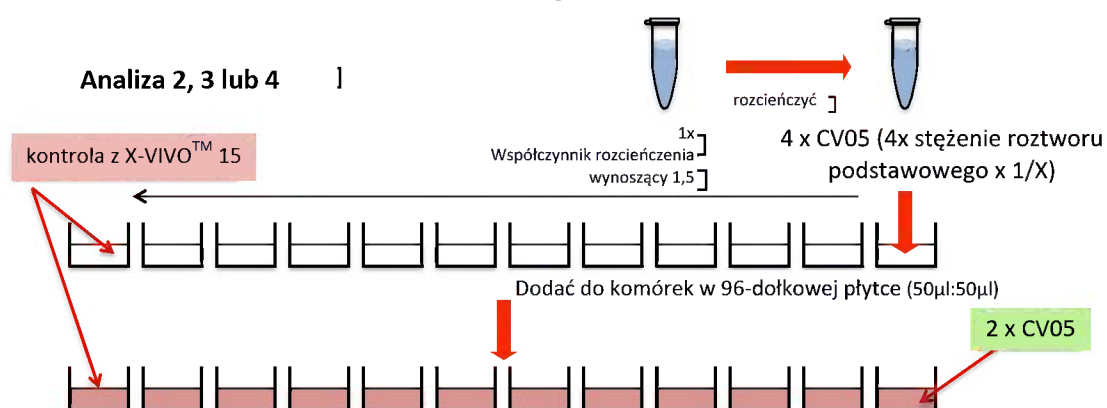
Jeżeli substancja chemiczna jest
rozpuszczalna w X-VIVOTM 15 (analiza 1)



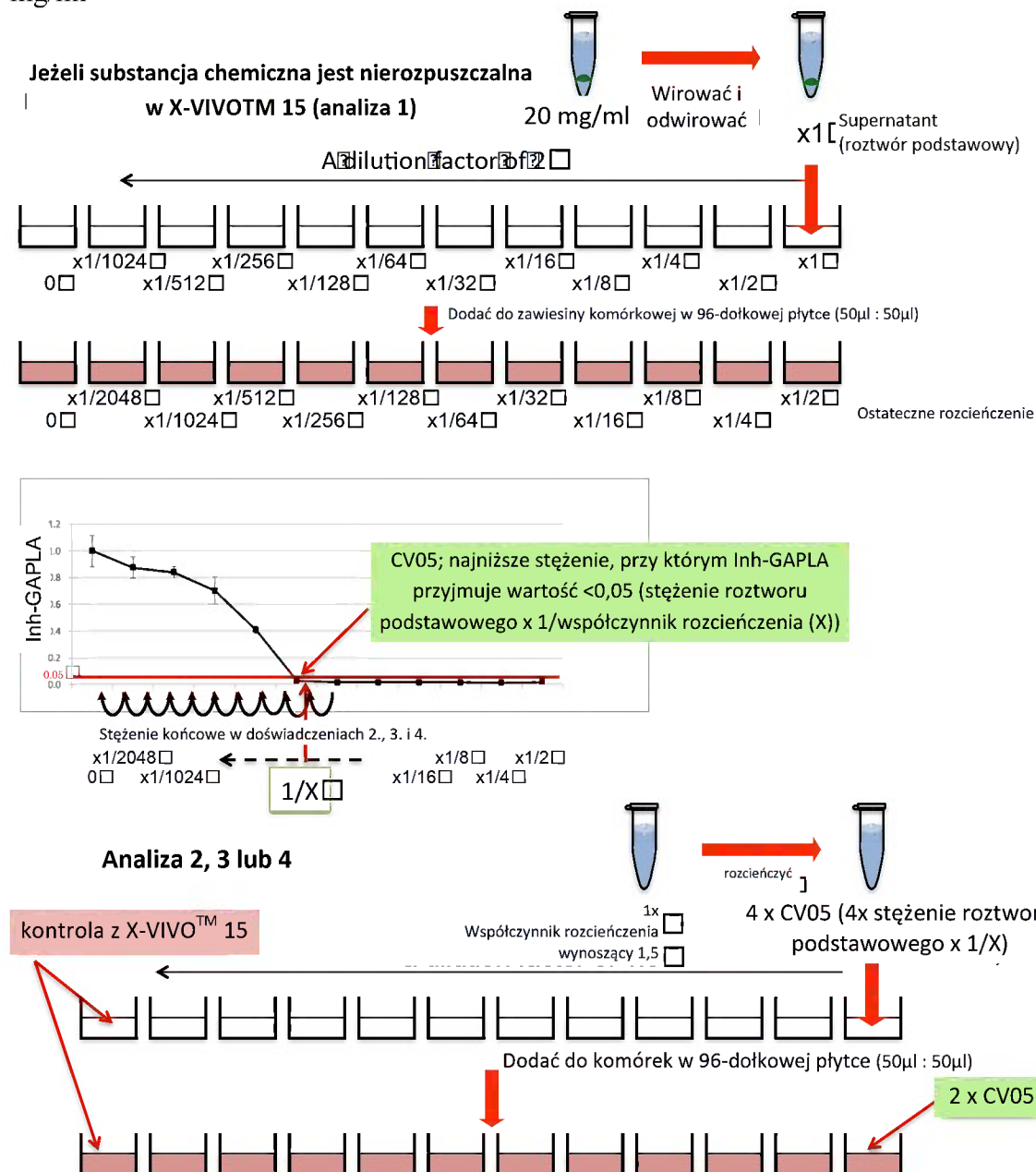
Ustalić najwyższe stężenie występujące w następujących doświadczeniach

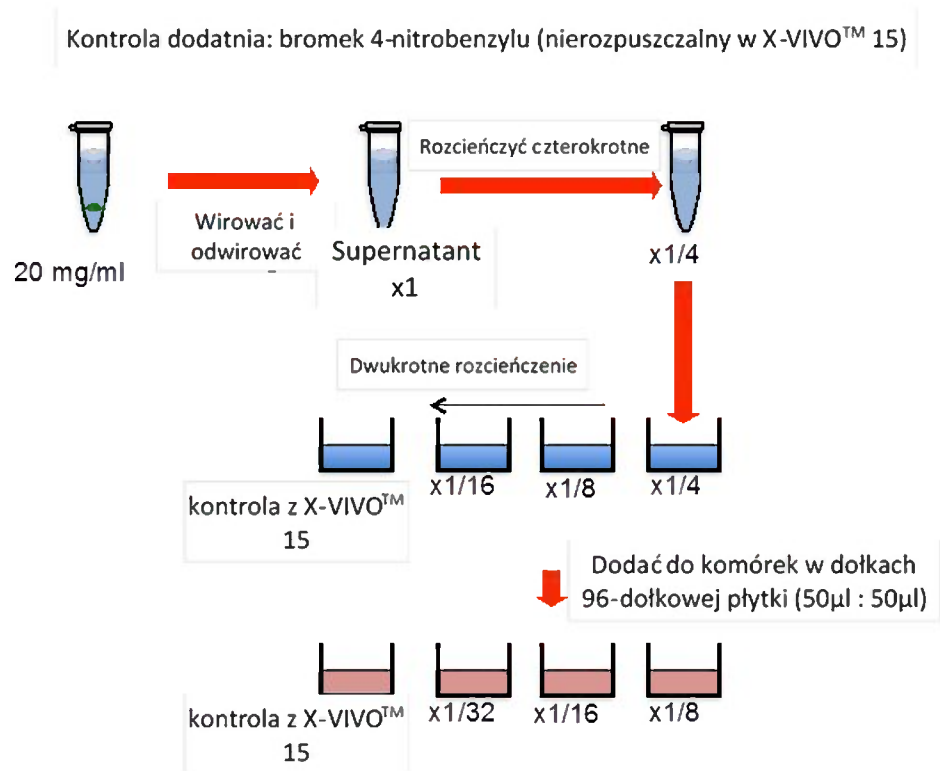


Analiza 2, 3 lub 4



b) W przypadku substancji chemicznych nierozpuszczalnych w X-VIVO™ 15 w stężeniu 20 mg/ml



Dodatek 3.6**SCHEMAT METOD ROZPUSZCZANIA BROMKU 4-NITROBENZYLU NA POTRZEBY KONTROLI DODATNIEJ W TEŚCIE IL-8 LUC**

”.

9) w części C dodaje się następujące rozdziały:

„C.52 ROZSZERZONE BADANIE ROZRODCZOŚCI JEDNEGO POKOLENIA RYŻANKI JAPONSKIEJ (MEOGRT)

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 240 (2015). Rozszerzone badanie jednego pokolenia ryżanki japońskiej (ang. *Medaka Extended One Generation Test, MEOGRT*) opisuje kompleksową metodę badawczą, która polega na poddawaniu ryb działaniu substancji chemicznych na przestrzeni kilku pokoleń celem uzyskania danych istotnych z punktu widzenia oceny zagrożenia ekologicznego oraz oceny ryzyka stwarzanego przez substancje chemiczne, w tym substancje chemiczne, co do których podejrzewa się, że mogą zaburzać funkcjonowanie układu hormonalnego (EDC). Narażenie w badaniu MEOGRT trwa do czasu wylęgu (który ma miejsce dwa tygodnie po zapłodnieniu) w drugim pokoleniu (F2). Aby uzasadnić przydatność przedłużenia pokolenia F2 poza fazę wylęgu, konieczne byłyby dodatkowe badania; w chwili obecnej nie ma wystarczających informacji, aby zapewnić odpowiednie warunki lub kryteria uzasadniające przedłużenie pokolenia F2. Niniejsza metoda badawcza może być jednak aktualizowana w miarę uwzględniania nowych informacji i danych. Na przykład wytyczne dotyczące przedłużenia pokolenia F2 poprzez rozmnażanie mogą być potencjalnie użyteczne w pewnych okolicznościach (np. w przypadku substancji chemicznych charakteryzujących się wysokim potencjałem biokoncentracji lub w odniesieniu do których istnieją wskazania dotyczące występowania skutków międzypokoleniowych w innych taksonach). Niniejszą metodę badawczą można stosować, aby ocenić potencjalny wpływ długoterminowy substancji chemicznych na ryby, w tym substancji chemicznych potencjalnie zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego. W metodzie tej główny nacisk kładzie się na potencjalne skutki istotne dla populacji (takie jak niekorzystny wpływ na przeżywalność, rozwój, wzrost i rozrodczość), aby obliczyć najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian, (NOEC) lub stężenie efektywne (EC_x), chociaż należy zauważyć, że metody obliczania EC_x rzadko są odpowiednie w przypadku dużych badań tego rodzaju, w których zwiększenie liczby badanych stężeń w celu umożliwienia określenia pożądanego EC_x może być niepraktyczne, co może również powodować poważne obawy związane z dobrostanem zwierząt ze względu na dużą liczbę wykorzystywanych zwierząt. W przypadku substancji chemicznych niewymagających oceny na przestrzeni wielu pokoleń lub substancji chemicznych, które nie są substancjami chemicznymi potencjalnie zaburzającymi funkcjonowanie układu hormonalnego, bardziej odpowiednie mogą być jednak inne metody badawcze (1). Ryżanka japońska jest odpowiednim gatunkiem do wykorzystania w niniejszej metodzie badawczej ze względu na jej krótki cykl życia i

możliwość określenia jej płci genetycznej (2), co stanowi bardzo istotny element w niniejszej metodzie badawczej. Konkretnie metody i punkty końcowe obserwacji wyszczególnione w niniejszej metodzie badawczej mają zastosowanie wyłącznie do ryżanki japońskiej. Inne gatunki małych ryb (jak np. danio pręgowany) można przystosować do podobnego protokołu badań.

2. Niniejsza metoda badawcza służy do pomiaru kilku biologicznych punktów końcowych. Główny nacisk kładzie się na potencjalny niekorzystny wpływ na parametry istotne dla populacji, w tym przeżywalność, rozwój makroskopowy, wzrost i rozrodczość. W następnej kolejności – w celu dostarczenia informacji mechanistycznych oraz przedstawienia powiązania między wynikami innych rodzajów badań terenowych i laboratoryjnych – w przypadku gdy istnieją dowody *a posteriori* na to, że substancja chemiczna może wykazywać działanie zaburzające funkcjonowanie układu hormonalnego (np. działanie androgenne lub estrogenne w innych badaniach i testach), uzyskuje się inne użyteczne informacje, dokonując pomiaru mRNA witellogeniny (vtg) (lub białka witellogeniny, VTG), fenotypowych drugorzędowych cech płciowych (SSC) w odniesieniu do płci genetycznej oraz przeprowadza się ocenę histopatologiczną. Należy zauważyć, że jeżeli w przypadku badanej substancji chemicznej lub jej metabolitów nie zachodzi podejrzenie działania zaburzającego funkcjonowanie układu hormonalnego, wówczas pomiar tych drugorzędowych punktów końcowych może nie być konieczny, a bardziej odpowiednie mogą okazać się badania, w których wykorzystuje się mniej zasobów i zwierząt (1). Definicje stosowane w niniejszej metodzie badawczej przedstawiono w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

3. Ze względu na ograniczoną liczbę badanych substancji chemicznych i laboratoriów zaangażowanych w walidację tego dość złożonego testu przewiduje się, że gdy dostępna liczba badań będzie wystarczająca do ustalenia wpływu tego nowego projektu badania, wówczas metoda badawcza zostanie poddana przeglądowi i w razie potrzeby zmieniona w świetle zdobytych doświadczeń. Dane te można wykorzystać na poziomie 5 ram koncepcyjnych OECD w zakresie badania i oceny substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego (3). Metoda badawcza rozpoczyna się od narażenia dorosłych ryb (pokolenie F0) na działanie badanej substancji chemicznej na etapie rozmnażania. Narażenie jest kontynuowane na etapach rozwoju i rozmnażania pokolenia F1 oraz wylęgu pokolenia F2; w ten sposób test pozwala na ocenę zarówno strukturalnych, jak i aktywacyjnych szlaków hormonalnych. Podczas interpretacji punktów końcowych związanych z układem hormonalnym można przyjąć podejście oparte na wadze dowodów.

4. W badaniu należy uwzględnić odpowiednią liczbę osobników, aby zapewnić wystarczającą podstawę do oceny punktów końcowych istotnych z perspektywy rozmnażania (zob. dodatek 3), przy jednoczesnym zapewnieniu, że liczba wykorzystywanych zwierząt stanowi minimum wymagane ze względów związanych z dobrostanem zwierząt. Ze względu na dużą liczbę zwierząt użytych do badania ważne jest, by starannie rozważyć potrzebę przeprowadzenia badania w odniesieniu do istniejących danych, które mogą już zawierać istotne informacje na temat wielu punktów końcowych w badaniu MEOGRT. Do pewnego stopnia pomocne w tym zakresie mogą być ramy OECD dotyczące badań toksyczności u ryb (1).
5. Przedmiotową metodę badawczą opracowano przede wszystkim w celu rozpoznania skutków działania pojedynczej substancji. Jeżeli jednak wymagane jest przeprowadzenie badania mieszaniny, wówczas należy rozważyć, czy przyniesie ono zadowalające wyniki w odniesieniu do zamierzonego celu regulacyjnego.
6. Ważne jest, aby przed rozpoczęciem badania posiadać informacje o właściwościach fizykochemicznych badanej substancji chemicznej, w szczególności aby możliwe było tworzenie stabilnych roztworów chemicznych. Należy również posiadać odpowiednio czułą metodę analityczną na potrzeby weryfikacji stężeń badanych substancji chemicznych.

ZASADA BADANIA

7. Badanie rozpoczyna się od narażenia dojrzałych płciowo samców i samic (co najmniej 12 tygodni po zapłodnieniu) w parach hodowlanych przez okres 3 tygodni, w którym to czasie badania substancja chemiczna jest rozprawdzana w organizmie pokolenia rodzicielskiego (F0) zgodnie z jego zachowaniem toksykokinetycznym. Jaja zbiera się w czasie możliwie najbliższym pierwszego dnia czwartego tygodnia na potrzeby rozpoczęcia hodowli pokolenia F1. Podczas hodowli pokolenia F1 (łącznie 15 tygodni) ocenia się jego wylęgowość i przeżywalność. Ponadto w 9–10 tygodniu po zapłodnieniu pobiera się próbki ryb na potrzeby określenia rozwojowych punktów końcowych, a tarło ocenia się przez trzy tygodnie w okresie od 12 do 14 tygodnia po zapłodnieniu. Hodowla pokolenia F2 rozpoczyna się po trzecim tygodniu od oceny rozmnażania i trwa aż do zakończenia wylęgu.

KRYTERIA WAŻNOŚCI BADANIA

8. Zastosowanie mają następujące kryteria ważności badania:
 - stężenie tlenu rozpuszczonego powinno wynosić ≥ 60 % wartości nasycenia powietrzem w trakcie badania;

- średnia temperatura wody w całym okresie trwania badania powinna wynosić 24–26 °C. Krótkotrwałe odchylenia temperatury poszczególnych akwariów od średniej nie powinny przekraczać 2 °C;
- średni potencjał reprodukcyjny prób kontrolnych w każdym pokoleniu (F0 i F1) powinien być większy niż 20 jaj na parę dziennie. Płodność wszystkich jaj złożonych podczas oceny powinna wynosić powyżej 80 %. Ponadto 16 spośród zalecanych 24 par hodowlanych w próbie kontrolnej (> 65 %) powinno składać więcej niż 20 jaj na parę dziennie;
- wylęgowość jaj w próbach kontrolnych (w każdej z pokolenia F1 i F2) powinna wynosić (średnio) ≥ 80 %;
- przeżywalność po wylęgu do 3 tygodni po zapłodnieniu i od 3 tygodni po zapłodnieniu do zakończenia badania w przypadku pokolenia F1 (tj. 15 tygodni po zapłodnieniu) w próbach kontrolnych (F1) powinna wynosić odpowiednio ≥ 80 % (średnio) i ≥ 90 % (średnio);
- powinny być dostępne dowody pozwalające wykazać, że stężenia badanej substancji chemicznej w roztworze utrzymać w granicach ± 20 % średnich wartości pomiarowych.

Jeżeli chodzi o temperaturę wody – mimo że nie stanowi ona kryterium ważności – kontrpróby użyte w ramach zabiegu, jak również grupy poddane zabiegowi w badaniu nie powinny statystycznie różnić się między sobą (pod względem codziennych pomiarów temperatury i z wyłączeniem krótkotrwałych odchyleń).

9. Choć w grupach o wyższym stopniu narażenia można zaobserwować spadek rozrodczości, rozrodczość w grupie co najmniej trzeciej pod względem stopnia narażenia i wszystkich grupach o niższym stopniu w pokoleniu F0 powinna być wystarczająca do wypełnienia inkubatorów wylęgowych. Ponadto przeżywalność embrionów w grupie trzeciej pod względem stopnia narażenia i w grupach o niższym stopniu narażenia w pokoleniu F1 powinna być wystarczająca do umożliwienia oceny punktu końcowego przy pobieraniu próbek osobników nie w pełni dojrzałych (zob. pkt 36 i 38 oraz dodatek 9). Co więcej, w grupie drugiej pod względem stopnia narażenia w pokoleniu F1 przeżywalność po wylęgu powinna być co najmniej na poziomie minimalnym (~20 %). Kryteria te jako takie nie stanowią kryteriów ważności, lecz są zaleceniami, które umożliwiają obliczenie wiarygodnej wartości NOEC.
10. W przypadku zaobserwowania odchylenia od kryteriów ważności badania skutki tych odchyleń należy przeanalizować w odniesieniu do wiarygodności wyników badania, a w sprawozdaniu z badania należy uwzględnić zarówno takie odchylenia, jak i dotyczące ich uwagi.

OPIS METODY

Aparatura

11. Zwykły sprzęt laboratoryjny, w szczególności:

- a) mierniki tlenu i pehametry;
- b) sprzęt do oznaczania twardości i zasadowości wody;
- c) odpowiednia aparatura do pomiaru temperatury, zalecane jest stałe monitorowanie;
- d) zbiorniki wykonane z chemicznie obojętnego materiału o odpowiedniej objętości w zależności od zalecanego obciążenia i obsady (zob. dodatek 3);
- e) waga o odpowiedniej dokładności (tj. dokładności do $\pm 0,5$ mg).

Woda

12. Jako wodę do badań można stosować każdą wodę, w której badane gatunki wykazują odpowiednią długoterminową przeżywalność i wzrost. Jej jakość w okresie trwania badania powinna być stała. Aby upewnić się, że woda rozcieńczająca nie będzie wpływała zbyt na wyniki badania (np. wchodząc w reakcję z badaną substancją chemiczną) lub nie będzie miała niekorzystnego wpływu na stado macierzyste, należy okresowo pobierać próbki wody do analizy. Jeżeli wiadomo, że woda rozcieńczająca ma względnie stałą jakość, należy oznaczać, np. co sześć miesięcy, zawartość metali ciężkich (np. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd i Ni), głównych anionów i kationów (np. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), pestycydów, zawartość całkowitego węgla organicznego i zawiesinę ogólną. Niektóre właściwości chemiczne dopuszczalnej wody rozcieńczającej wymieniono w dodatku 2. Wartość pH wody powinna mieścić się w zakresie 6,5–8,5, lecz w trakcie danego badania powinna mieścić się w zakresie $\pm 0,5$ jednostki pH.

Układ narażenia

13. Nie sprecyzowano projektu układu narażenia ani materiałów wykorzystywanych w tym układzie. Do konstrukcji układu badawczego należy użyć szkła, stali nierdzewnej lub innego chemicznie obojętnego materiału, który nie został zanieczyszczony podczas wcześniejszych badań. Na potrzeby niniejszego badania dobrze dopasowany układ narażenia może składać się z układu przepływowego (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13).

Roztwory do badań

14. Roztwór podstawowy badanej substancji chemicznej należy wprowadzić do układu narażenia, używając odpowiedniej pompy. Przed rozpoczęciem narażenia należy przeprowadzić kalibrację natężenia przepływu roztworu podstawowego zgodnie z analitycznym potwierdzeniem roztworów do badań, a podczas badania należy je okresowo sprawdzać objętościowo. Roztwór do badań w każdej komorze jest odpowiednio często wymieniany (np. minimalnie 5 wymian objętości na dzień do 16 wymian objętości na

dzień lub do natężenia przepływu wynoszącego 20 ml/min) w zależności od stabilności badanej substancji chemicznej i jakości wody.

15. Roztwory do badań o wybranych stężeniach przygotowuje się przez rozcieńczenie roztworu podstawowego. Zaleca się przygotowanie roztworu podstawowego przez zwykłe wymieszanie lub zbełtanie badanej substancji chemicznej w wodzie rozcieńczającej w sposób mechaniczny (np. za pomocą mieszadła lub ultradźwięków). Do uzyskania odpowiednio stężonego roztworu podstawowego można wykorzystać kolumny/układy nasyceniowe lub metody pasywnego dawkowania (14). Należy dołożyć wszelkich starań, aby uniknąć wykorzystania rozpuszczalników lub nośników, ponieważ: 1) niektóre rozpuszczalniki same mogą powodować toksyczność lub niepożądane albo nieoczekiwane reakcje, 2) badanie substancji chemicznych, których rozpuszczalność w wodzie zostaje przekroczona (co często ma miejsce w wyniku stosowania rozpuszczalników), może skutkować niedokładnym określeniem stężeń efektywnych, 3) stosowanie rozpuszczalników w przypadku badań długoterminowych może skutkować znacznym rozrostem biofilmu związanym z aktywnością mikroorganizmów, co może wpłynąć na warunki środowiskowe, a także na zdolność do utrzymania stężenia podczas narażenia oraz 4) w przypadku braku danych historycznych, które potwierdziłyby brak wpływu rozpuszczalnika na wynik badania, użycie rozpuszczalników wymaga przeprowadzenia zabiegu z próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem, co ma konsekwencje dla dobrostanu zwierząt, ponieważ przeprowadzenie badania wymaga użycia dodatkowych zwierząt. W przypadku substancji chemicznych, których badanie nastręcza trudności, rozpuszczalnik można zastosować tylko w ostateczności, a w celu wyboru najlepszej metody należy zapoznać się z wytyczną OECD nr 23 dotyczącą badania toksyczności wodnej trudnych substancji i mieszanin (Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures) (15). Wybór rozpuszczalnika będzie uwarunkowany właściwościami chemicznymi badanej substancji chemicznej i dostępnością danych historycznych dotyczących wykorzystania tego rozpuszczalnika. Jeżeli zastosowane zostaną nośniki rozpuszczalnikowe, oprócz prób kontrolnych bez rozpuszczalnika (ujemnych; z samą wodą rozcieńczającą) należy również ocenić odpowiednie próby kontrolne z rozpuszczalnikiem. W przypadku gdy nie można uniknąć użycia rozpuszczalnika, a występuje aktywność mikroorganizmów (biofilm), zaleca się rejestrowanie biofilmu na zbiornik (co najmniej raz w tygodniu) podczas całego badania. Najlepiej byłoby, gdyby stężenie rozpuszczalnika było utrzymywane na stałym poziomie w próbie kontrolnej z rozpuszczalnikiem i we wszystkich zabiegach. Jeżeli stężenie rozpuszczalnika nie jest utrzymywane na stałym poziomie, do próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem należy użyć jego najwyższego stężenia w próbie badanej poddanej działaniu substancji. W przypadkach gdy używane są nośniki rozpuszczalnikowe, maksymalne stężenia rozpuszczalnika nie powinny przekraczać 100 µl/l lub 100 mg/l (15), przy czym zaleca się, aby stężenie rozpuszczalnika pozostawało jak najniższe (np. < 20

µl/l), aby uniknąć potencjalnego wpływu rozpuszczalnika na mierzone punkty końcowe (16).

Zwierzęta użyte do badania

Wybór i utrzymywanie ryb

16. Badanym gatunkiem jest ryżanka japońska, *Oryzias latipes*, z powodu krótkiego cyklu rozwojowego i możliwości określenia płci genetycznej. Mimo że inne gatunki małych ryb można przystosować do podobnego protokołu badania, konkretne metody i punkty końcowe obserwacji wyszczególnione w niniejszej metodzie badawczej mają zastosowanie wyłącznie do ryżanki japońskiej (zob. pkt 1). Ryżanka japońska łatwo rozmnaża się w niewoli; dostępne są publikacje na temat jej hodowli (17)(18)(19) oraz dane z badań nad krótkoterminową upadkowością, wczesnym etapem życia i pełnym cyklem rozwojowym (5)(6)(8)(9)(20). Fotoperiod dla wszystkich ryb utrzymuje się w stosunku 16 godzin światła do 8 godzin bez dostępu światła. Ryby będą karmione żywymi larwami solowca, *Artemia* spp., które w razie potrzeby można uzupełniać dostępnym na rynku pokarmem w płatkach. Dostępny na rynku pokarm w płatkach należy regularnie analizować pod kątem obecności zanieczyszczeń.
17. O ile przestrzegane są praktyki gospodarskie, nie wymaga się konkretnego protokołu hodowlanego. Przykładowo ryżankę japońską można hodować w zbiornikach o pojemności 2 l po 240 ryb w fazie larwalnej do 4 tygodnia po zapłodnieniu, a następnie można ją hodować w zbiornikach o pojemności 2 l po 10 ryb do 8 tygodnia po zapłodnieniu, kiedy to ryby łączą się w pary hodowlane w zbiornikach o pojemności 2 l.

Aklimatyzacja i wybór ryb

18. Badane ryby należy wybrać z jednego laboratoryjnego stada, które przez co najmniej dwa tygodnie przed badaniem było aklimatyzowane w warunkach jakości wody i oświetlenia zbliżonych do stosowanych w badaniu (uwaga: ten okres aklimatyzacji nie jest okresem poprzedzającym narażenie *in situ*). Zaleca się pozyskiwanie ryb do badań z hodowli wewnątrzlaboratoryjnej, ponieważ wysyłka dorosłych ryb jest stresująca i może wpłynąć na wiarygodność tarła. Ryby należy karmić larwami solowca dwa razy dziennie przez cały okres utrzymywania i na etapie narażenia, w razie potrzeby dokarmiając je dostępnym na rynku pokarmem w płatkach. Uznaje się, że – aby zapewnić odpowiednie kontrpróby – do rozpoczęcia niniejszego badania niezbędne są co najmniej 42 pary hodowlane (54 pary hodowlane, jeżeli wymagane jest przeprowadzenie próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem, częściowo z powodu braku danych historycznych na poparcie użycia wyłącznie próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem). Ponadto należy sprawdzić, czy każda z par hodowlanych z pokolenia F0 posiada chromosomy XX-XY (tj. zwyczajny zestaw chromosomów płci w

przypadku każdej płci), aby uniknąć możliwości uwzględnienia protogynicznych samców z chromosomami XX (zob. pkt 39).

19. Na etapie aklimatyzacji należy odnotowywać śmiertelność ryb hodowlanych, a po 48-godzinnym okresie adaptacji stosuje się następujące kryteria:

- śmiertelność przekracza 10 % populacji hodowli w ciągu siedmiu dni poprzedzających przeniesienie do układu badawczego: należy odrzucić całą partię;
- śmiertelność na poziomie 5–10 % populacji hodowli w ciągu siedmiu dni poprzedzających przeniesienie do układu badawczego: aklimatyzacja przez siedem dodatkowych dni po 2-tygodniowym okresie aklimatyzacji; jeżeli śmiertelność przekroczy 5 % w ciągu tych siedmiu dni, należy odrzucić całą partię;
- śmiertelność poniżej 5 % populacji w ciągu siedmiu dni poprzedzających przeniesienie do układu badawczego: należy zaakceptować partię.

20. Ryb nie należy leczyć na żadną chorobę w 2-tygodniowym okresie aklimatyzacji poprzedzającym badanie ani w okresie narażenia i należy zupełnie unikać leczenia chorób, o ile jest to możliwe. Ryb przejawiających kliniczne objawy choroby nie należy wykorzystywać do badań. W okresie hodowlanym poprzedzającym badanie należy prowadzić rejestr obserwacji oraz zabiegów medycznych o charakterze prewencyjnym i postępowań terapeutycznych.

21. Etap narażenia rozpoczyna się z wykorzystaniem dorosłych ryb wykazujących dymorfizm płciowy z laboratoryjnego źródła zwierząt dojrzałych płciowo, u których rozpoznano płęć genetyczną, hodowanych w temperaturze $25 \pm 2^\circ\text{C}$. W tygodniu poprzedzającym narażenie ryby należy zidentyfikować jako potwierdzone samce i samice rozplodowe (tj. takie, które wydały żywe potomstwo). W odniesieniu do całej grupy ryb wykorzystanych w badaniu zakres poszczególnych mas z podziałem na płęć na początku badania należy utrzymać w zakresie $\pm 20\%$ średniej arytmetycznej masy dla tej samej płci. Przed rozpoczęciem badania należy zważyć podpróbkę ryb w celu oszacowania średniej masy. Wybrane ryby powinny być w wieku przynajmniej 12 tygodni po zapłodnieniu, co oznacza masę ≥ 300 mg w przypadku samic i ≥ 250 mg w przypadku samców.

PROJEKT BADANIA

Badane stężenia

22. Zaleca się wykorzystanie pięciu stężeń substancji chemicznej oraz próbę kontrolną (próby kontrolne). Przy wyborze zakresu badanych stężeń należy wziąć pod uwagę wszystkie źródła informacji, w tym ilościowe zależności struktura-aktywność (QSAR), podejścia przekrojowe z zastosowaniem analogicznych substancji, wyniki badań na rybach, takich

jak testy śmiertelności ostrej (zob. rozdział C.1 niniejszego załącznika), krótkoterminowy test rozrodczości ryb (zob. rozdział C.48 niniejszego załącznika) oraz inne metody badawcze, np. opisane w rozdziałach C.15, C.37, C.41, C.47 lub C.49 niniejszego załącznika (21)(22)(23)(24)(25)(26), o ile są dostępne, lub jeżeli to konieczne, informacje z badania ustalającego zakres stężeń, możliwie z uwzględnieniem etapu rozmnażania. W razie potrzeby badanie ustalające zakres stężeń można przeprowadzić w warunkach podobnych do tych, w których przeprowadza się badanie ostateczne (pod względem jakości wody, układu badawczego, wprowadzania zwierząt). W przypadku gdy konieczne jest użycie rozpuszczalnika i nie są dostępne żadne dane historyczne, można przeprowadzić badanie ustalające zakres stężeń w celu określenia stosowności rozpuszczalnika. Najwyższe badane stężenie nie powinno przekraczać rozpuszczalności w wodzie, 10 mg/l lub 1/10 LC₅₀ po upływie 96 godzin (27). Najniższe stężenie powinno być 10–100-krotnie niższe od najwyższego stężenia. Użycie pięciu stężeń w niniejszym badaniu umożliwia nie tylko pomiar zależności dawka-odpowiedź, ale również pozwala określić najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC) i najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC) – wartości te są niezbędne do oceny ryzyka w niektórych programach regulacyjnych lub jurysdykcjach. Co do zasady współczynnik rozstawienia stężeń nominalnych badanej substancji chemicznej pomiędzy sąsiadującymi poziomami zabiegów wynosi $\leq 3,2$.

Kontrpróby grup poddanych zabiegowi i prób kontrolnych

23. Należy użyć co najmniej sześciu komór badawczych stanowiących kontrpróby na każde badane stężenie (zob. dodatek 7). Na etapie rozmnażania (z wyjątkiem pokolenia F0) struktura kontrprób zostaje podwojona na potrzeby oceny potencjału reprodukcyjnego, a każda kontrpróba zawiera tylko jedną parę hodowlaną (zob. pkt 42).
24. Oprócz badanych stężeń należy również wykonać próbę kontrolną z wodą rozcieńczającą oraz – w razie potrzeby – próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem. W próbach kontrolnych należy użyć podwójnej liczby komór stanowiących kontrpróby, aby zapewnić odpowiednią moc statystyczną (tj. w próbach kontrolnych należy wykorzystać co najmniej dwanaście kontrprób). Na etapie rozmnażania liczbę kontrprób w próbach kontrolnych podwaja się (tj. wykorzystuje się minimalnie 24 kontrpróby, a każda z nich zawiera tylko jedną kojarzoną parę). Po rozmnażaniu kontrpróby kontrolne nie powinny zawierać więcej niż 20 zarodków (ryb).

PROCEDURA

Rozpoczęcie badania

25. Aktywne rozrodczo dorosłe ryby wykorzystywane do rozpoczęcia pokolenia F0 w badaniu wybiera się według dwóch kryteriów: wieku (zwykle powyżej 12 tygodni po zapłodnieniu,

ale zaleca się nie później niż 16 tygodni po zapłodnieniu) i masy (powinna wynosić ≥ 300 mg w przypadku samic i ≥ 250 mg w przypadku samców).

26. Na początku badania pary samica-samiec, które spełniają powyższe warunki, przenosi się jako pojedyncze pary do każdego ze zbiorników kontrpróby, tj. do dwunastu kontrprób w próbach kontrolnych i sześciu kontrprób w grupie poddanej działaniu substancji chemicznej. Zbiornikom tym losowo przypisuje się zabieg (np. T1–T5 i próba kontrolna) i kontrpróbę (np. A–L przypisuje się do prób kontrolnych, a A–F przypisuje się do zabiegu), a następnie umieszcza się je w układzie narażenia, zapewniając odpowiedni przepływ do każdego ze zbiorników.

Warunki narażenia na działanie substancji

27. Pełne streszczenie parametrów i warunków badań można znaleźć w dodatku 3. Stosowanie się do tych specyfikacji powinno pozwolić uzyskać ryby z próby kontrolnej, których wartości punktów końcowych są podobne do tych wymienionych w dodatku 4.
28. W trakcie badania należy dokonywać pomiarów rozpuszczonego tlenu, pH i temperatury w co najmniej jednym naczyniu do badania każdej grupy poddawanej działaniu substancji i w próbie kontrolnej. Z wyjątkiem temperatury, pomiarów tych należy dokonywać przynajmniej raz w tygodniu przez cały okres narażenia. Średnia temperatura wody powinna wynosić od 24–26 °C przez cały okres trwania badania. Temperaturę należy mierzyć codziennie przez cały okres narażenia. Wartość pH wody powinna mieścić się w zakresie 6,5–8,5, lecz w trakcie danego badania powinna mieścić się w zakresie $\pm 0,5$ jednostki pH. Kontrpróby użyte w ramach zabiegu, jak również grupy poddane zabiegowi w badaniu nie powinny statystycznie różnić się między sobą (pod względem codziennych pomiarów temperatury i z wyłączeniem krótkotrwałych odchyleń).

Czas narażenia

29. W ramach badania ryby zdolne do rozmnażania z pokolenia F0 naraża się na działanie substancji przez okres trzech tygodni. W 4 tygodniu, około 24. dnia badania, ustanawia się pokolenie F1, zaś pary hodowlane z pokolenia F0 uśmierca się w sposób humanitarny i odnotowuje się ich masę i długość (zob. pkt 34). Następnie pokolenie F1 naraża się na działanie substancji przez kolejne 14 tygodni (łącznie 15 tygodni w przypadku F1), a pokolenie F2 naraża się przez dwa tygodnie, do czasu wylęgu. Zasadniczo łączny czas trwania badania wynosi 19 tygodni (tj. do czasu wylęgu pokolenia F2). Harmonogramy badania przedstawiono w tabeli 2, a bardziej szczegółowe informacje na ten temat można znaleźć w dodatku 9.

Schemat żywienia

30. Ryby można bez ograniczeń karmić solowcami *Artemia* spp. (24-godzinnyimi larwami), dokarmiając w razie potrzeby dostępnym na rynku pokarmem w płatkach. Dostępny na rynku pokarm w płatkach należy regularnie oceniać pod kątem obecności zanieczyszczeń, takich jak pestycydy chloroorganiczne, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), polichlorowane bifenyle (PCB). Należy unikać pokarmów o podwyższonej zawartości związków endokrynnie czynnych (tj. fitoestrogenów), które mogłyby zakłócić reakcję w trakcie badania. Niezjedzony pokarm i odchody należy usuwać z naczyń badawczych według potrzeby, np. ostrożnie czyszcząc dno każdego zbiornika za pomocą syfonu. Ściany i dno każdego zbiornika należy również czyścić raz lub dwa razy w tygodniu (np. skrobiąc szpatułką). Przykładowy schemat żywienia można znaleźć w dodatku 5. Częstotliwość karmienia zależy od liczby ryb w każdej kontrpróbie. A zatem częstotliwość karmienia zmniejsza się, jeżeli w kontrpróbie występuje śmiertelność.

Oznaczenie i pomiary analityczne

31. Przed rozpoczęciem okresu narażenia należy upewnić się, że system podawania substancji chemicznej działa prawidłowo. Należy ustalić wszystkie potrzebne metody analityczne, w tym zgromadzić dostateczną wiedzę na temat stabilności substancji chemicznej w układzie badawczym. W trakcie badania stężenia badanej substancji chemicznej oznacza się w odpowiednich odstępach czasu, najlepiej co najmniej raz na tydzień w jednej kontrpróbie z każdej grupy poddanej zabiegowi, co tydzień zmieniając kontrpróby w ramach tej samej grupy poddanej zabiegowi.
32. W trakcie badania należy w odpowiednich odstępach czasu sprawdzać natężenie przepływów rozcieńczalnika i roztworu podstawowego (np. co najmniej trzy razy w tygodniu). Zaleca się, aby wyniki były oparte na mierzonych stężeniach. Jeżeli jednak stężenie badanej substancji chemicznej w roztworze można z powodzeniem utrzymywać w zakresie $\pm 20\%$ średnich zmierzonych wartości przez cały okres badania, wówczas wyniki mogą opierać się albo na wartościach nominalnych, albo na wartościach zmierzonych. W przypadku substancji chemicznych, które wyraźnie odkładają się w rybach, badane stężenia mogą maleć wraz ze wzrostem ryb. W takich przypadkach zaleca się dostosowanie tempa wymiany roztworu do badań w każdej komorze w taki sposób, aby badane stężenia pozostały możliwie jak najbardziej stałe.

Obserwacje i pomiar punktów końcowych

33. Pomiar punktów końcowych obejmuje potencjał reprodukcyjny, płodność, wylęg, wzrost i przeżywalność, które to wartości wykorzystuje się do oceny możliwych skutków na poziomie populacji. Należy również codziennie dokonywać obserwacji zachowania, a wszelkie nietypowe zachowania należy odnotowywać. Inne mechanistyczne punkty końcowe obejmują poziom mRNA *vtg* z wątroby lub poziom białka VTG według testu immunologicznego (28), fenotypowe markery płci, takie jak charakterystyczne brodawki

płetwy odbytovej samców, histologiczną ocenę płci gonadalnej i histopatologiczną ocenę nerki, wątroby i gonady (zob. wykaz punktów końcowych w tabeli 1). Wszystkie te konkretne punkty końcowe ocenia się w kontekście określania płci genetycznej jednostki na podstawie obecności lub braku genu *dmy*, determinującego płęć męską u ryżanki japońskiej (zob. pkt 41). Ponadto ocenia się również czas do tarła. Co więcej, wykorzystując liczbę brodawek płetwy odbytovej do określenia poszczególnych ryżanek japońskich jako fenotypowych samców albo samic, można obliczyć proste fenotypowe proporcje płci. Od niniejszej metody badawczej nie oczekuje się wykrycia niewielkich odchyłeń od przewidywanego stosunku płci, ponieważ względnie niewielka liczba ryb przypadająca na kontrpróbę nie będzie miała wystarczającej mocy statystycznej. Ponadto podczas oceny histopatologicznej bada się gonadę i przeprowadza się dużo bardziej zaawansowane analizy na potrzeby oceny fenotypu gonad w kontekście płci genetycznej.

34. Podstawowym celem niniejszej metody badawczej jest ocena istotnych dla populacji, potencjalnych skutków działania badanej substancji chemicznej. Mechanistyczne punkty końcowe (VTG, SSC i niektóre histopatologiczne efekty na gonadach) mogą również pomóc w określeniu, czy któryś ze skutków powstaje w wyniku zakłócenia funkcjonowania układu hormonalnego. Wpływ na powyższe mechanistyczne punkty końcowe mogą jednak mieć również toksyczność ogólnoustrojowa i inne toksyczności. W związku z tym szczegółowej ocenie można również poddać badanie histopatologiczne wątroby i nerek, aby lepiej zrozumieć reakcje w mechanistycznych punktach końcowych. Jeżeli jednak te szczegółowe oceny nie są przeprowadzane, należy mimo to odnotować i zgłosić poważne nieprawidłowości zaobserwowane przypadkowo podczas oceny histopatologicznej.

Humanitarne uśmiercanie ryb

35. Po zakończeniu narażenia pokolenia F0 i F1 na działanie substancji i przy pobieraniu podpróbek ryb nie w pełni dojrzałych ryby należy poddać eutanazji, podając im odpowiednie ilości roztworu środka znieczulającego (np. metanosulfonioanu trikainy, MS-222 (nr CAS 886-86-2), 100–500 mg/l) zbuforowanego 300 mg/l NaHCO₃ (wodorowęglan sodu, nr CAS 144-55-8) w celu zmniejszenia podrażnienia błony śluzowej. Jeżeli ryby wykazują oznaki znacznego cierpienia (bardzo poważnego, a ich śmierć można wiarygodnie przewidzieć) i uznaje się je za konające, zwierzęta należy znieczulić i poddać eutanazji oraz traktować jako przypadki śmiertelne do celów analizy danych. W przypadku poddania ryby eutanazji z powodu choroby należy to odnotować i zgłosić. W zależności od momentu badania, w którym rybę poddaje się eutanazji, zwierzę można zachować na potrzeby analizy histopatologicznej (utrwalając rybę na potrzeby ewentualnego badania histopatologicznego).

Postępowanie z jajami i rybami w fazie larwalnej

Pobieranie jaj od par hodowlanych w celu utworzenia następnego pokolenia

36. Pobieranie jaj ma miejsce pierwszego dnia (lub w ciągu pierwszych dwóch dni, jeśli to konieczne) 4 tygodnia badania, aby przejść z pokolenia F0 do pokolenia F1, oraz 18 tygodnia badania, aby przejść z pokolenia F1 do pokolenia F2. 18 tygodni badania odpowiada dorosłym rybam w pokoleniu F1, 15 tygodni po zapłodnieniu. Ważne jest usunięcie wszystkich jaj z każdego zbiornika na dzień przed rozpoczęciem pobierania, aby upewnić się, że wszystkie jaja pobrane od pary hodowlanej pochodzą z jednego tarła. Po tarle samice ryżanki japońskiej niekiedy transportują jaja przyczepione w pobliżu kloaki do czasu, gdy możliwe będzie złożenie ich na podłożu. Jeśli w zbiorniku nie ma podłoża, jaja można znaleźć na samicy albo na dnie zbiornika. W zależności od umiejscowienia jaj należy je ostrożnie zdjąć z samicy albo pobrać z dna zbiornika przy pomocy syfonu – w 4 tygodniu badania w przypadku pokolenia F0 i w 18 tygodniu badania w przypadku pokolenia F1. Przed rozmieszczeniem w komorach inkubacyjnych wszystkie jaja pobrane w ramach zabiegu należy umieścić razem.
37. Należy usunąć wstęgi otaczające złożone jaja, które spajają je ze sobą. Zapłodnione jaja (do 20) pobiera się od każdej pary hodowlanej (1 para na kontrpróbę), gromadzi się je według zabiegu i systematycznie rozmieszcza w odpowiednich komorach inkubacyjnych (dodatki 6 i 7). Za pomocą dobrej jakości mikroskopu stereoskopowego można dostrzec oznaki wczesnego zapłodnienia/rozwoju, takie jak podniesienie osłony jajowej (chorionu), trwający podział komórkowy czy tworzenie się blastuli. Komory inkubacyjne można umieścić w oddzielnych „akwariach inkubacyjnych” utworzonych na potrzeby każdego zabiegu (w którym to przypadku w akwariach tych należy mierzyć parametry jakości wody i stężenia badanych substancji chemicznych) lub w akwarium stanowiącym kontrpróbę, w którym będą znajdować się wyklute larwy (np. eleuteroembriony). W przypadku konieczności pobrania jaj kolejnego dnia (23. dzień badania) wszystkie jaja zebrane w ciągu dwóch dni należy umieścić razem, a następnie systematycznie rozmieścić w każdej z kontrprób poddawanych zabiegowi.

Hodowanie jaj do czasu wylęgu

38. Zapłodnione jaja są stale wstrząsane, np. w inkubatorze do jaj za pomocą pęcherzyków powietrza lub poprzez wprowadzanie inkubatora jaj w pionowy ruch wahadłowy. Śmiertelność zapłodnionych jaj (zarodków) sprawdza się i odnotowuje codziennie. Martwe jaja usuwa się z inkubatorów (dodatek 9). W siódmym dniu po zapłodnieniu wstrząsanie wstrzymuje się lub ogranicza, aby zapłodnione jaja osiadły na dnie inkubatora. Sprzyja to wylęganiu, które ma miejsce zazwyczaj następnego dnia lub w ciągu dwóch dni. W odniesieniu do każdego zabiegu i każdej próby kontrolnej należy zliczyć (w połączonych kontrpróbach) wylęg (młode larwy; eleuteroembriony). Zapłodnione jaja, z których młode nie wykluły się po upływie dwukrotności mediany dnia wylęgu w próbie kontrolnej (zazwyczaj 16 lub 18 dnia po zapłodnieniu), uznaje się za niezdolne do życia i odrzuca.

39. Dwanaście wylęgów przenosi się do każdego zbiornika z kontrpróbą. Wylęg z komór inkubacyjnych łączy się i systematycznie rozmieszcza w zbiornikach z kontrpróbą (dodatek 7). Można tego dokonać poprzez losowy dobór wylęgu z puli przeznaczonej do zabiegu i późniejsze losowe dodawanie wylęgu do akwarium z kontrpróbą. Każdy zbiornik powinien zawierać równą liczbę ($n = 12$) wyklutych larw (maksymalnie 20 larw na każdy zbiornik). Jeżeli liczba osobników w wylęgu nie jest wystarczająca, by wypełnić wszystkie kontrpróby poddawane zabiegowi, zaleca się, aby jak najwięcej kontrprób zawierało 12 osobników z wylęgu. Wylęg można bezpiecznie przenosić za pomocą szklanych pipet o dużych otworach. Wszelkie dodatkowe osobniki w wylęgu uśmierca się w sposób humanitarny, podając środek znieczulający. W ciągu kilku tygodni poprzedzających ustanowienie par hodowlanych należy odnotować dzień, w którym zaobserwowano pierwsze tarło w każdej kontrpróbce.

Ustanawianie par hodowlanych

Znakowanie przez obcinanie płetw i określenie płci genetycznej

40. Określenie płci genetycznej za pomocą znakowania poprzez obcinanie płetw wykonuje się w 9–10 tygodniu po zapłodnieniu (tj. 12–13 tydzień badania w przypadku pokolenia F1). Wszystkie ryby w zbiorniku znieczula się (korzystając z zatwierdzonych metod, np. IACUC) i z końca płetwy ogonowej po stronie grzbietowej albo brzusznej od każdej ryby pobiera się niewielką próbkę tkanki w celu określenia płci genetycznej osobnika (29). Ryby z kontrpróby można trzymać w małych sadzach, w miarę możliwości po jednej na sadzę, w zbiorniku z kontrpróbą. Ewentualnie w każdej sadzy można trzymać dwie ryby, jeżeli można je od siebie odróżnić. Jedną z metod rozróżnienia jest przecięcie płetwy ogonowej (np. na brzegu po stronie grzbietowej lub brzusznej) podczas pobierania próbki tkanki.
41. Płeć genetyczną ryżanki japońskiej określa się za pomocą zidentyfikowanego i zsekwencjonowanego genu (*dmy*), który znajduje się na chromosomie Y. Obecność genu *dmy* wskazuje, że osobnik posiada chromosomy XY niezależnie od fenotypu, natomiast brak genu *dmy* wskazuje, że osobnik posiada chromosomy XX niezależnie od fenotypu (30); (31). Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA) pobierany jest z każdego odciętego fragmentu płetwy, a obecność genu *dmy* lub jego brak można, korzystając z metod łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) (zob. dodatek 9 do rozdziału C.41 niniejszego załącznika lub dodatki 3 i 4 w (29).

Ustanawianie par hodowlanych

42. Informacje na temat płci genetycznej wykorzystuje się do ustalenia par hodowlanych posiadających chromosomy XX–XY niezależnie od fenotypu zewnętrznego, który może zmienić się w wyniku narażenia na działanie badanej substancji chemicznej. W dniu

następującym po określeniu płci genetycznej każdej ryby z każdej kontrpróby losowo wybiera się dwie ryby posiadające chromosomy XX i dwie ryby posiadające chromosomy XY i ustanawia się dwie pary hodowlane posiadające chromosomy XX–XY. Jeżeli kontrpróba nie zawiera dwóch ryb posiadających chromosomy XX albo XY, należy pozyskać odpowiednią rybę z innych kontrprób w ramach zabiegu. Priorytetem jest, aby w każdym zabiegu i w każdej próbie kontrolnej (24) znajdowała się zalecana liczba kontrprób zawierających pary hodowlane (12). Przy ustanawianiu par hodowlanych wyklucza się ryby posiadające oczywiste nieprawidłowości (problemy z pęcherzem pławnym, deformacje kręgosłupa, ekstremalnie różniące się pod względem rozmiaru itp.). Na etapie rozmnażania pokolenia F1 każdy zbiornik z kontrpróbą powinien zawierać tylko jedną parę hodowlaną.

Pobieranie próbek od osobników nie w pełni dojrzałych i ocena punktów końcowych

Pobieranie próbek od ryb niebędących parami hodowlanymi

43. Po ustanowieniu par hodowlanych ryby niewybrane do dalszej hodowli uśmierca się w sposób humanitarny w 12–13 tygodniu badania (pokolenie F1) w celu pomiaru punktów końcowych osobników nie w pełni dojrzałych. Niezwykle ważne jest przenoszenie ryb w taki sposób, aby nadal można było określić płć genetyczną każdej ryby wybranej do pary hodowlanej. Wszystkie zebrane dane analizuje się w kontekście płci genetycznej danej ryby. Każdą rybę wykorzystuje się do pomiaru różnych punktów końcowych, w tym: do określenia wskaźników przeżywalności ryb młodych / nie w pełni dojrzałych (7–12/13 tydzień badania (pokolenie F1)), wzrostu długości (jeżeli płetwę ogonową skrócono w związku z pobieraniem próbek na potrzeby analizy płci genetycznej, można zmierzyć długość standardową. Długość całkowitą można zmierzyć, jeżeli jako próbki pobrano tylko część płetwy ogonowej, po stronie grzbietowej lub brzusznej, na potrzeby określenia obecności genu *dmy*) i masy ciała (tj. mokrej masy, osuszone na bibule), *vtg* mRNA wątroby (lub VTG) i brodawek płetwy odbytowej (zob. tabele 1 i 2). Należy pamiętać, że wartości mas i długości par hodowlanych są również potrzebne do obliczenia średniego wzrostu w grupie poddanej zabiegowi.

Pobieranie próbek tkanek i pomiar witellogeniny

44. Wątrobę wycina się i należy ją przechowywać w temperaturze ≤ -70 °C do czasu wykonania pomiarów *vtg* mRNA (lub VTG). Ogon ryby, w tym płetwę odbytową, przechowuje się w odpowiednim utrwalaczu (np. Davidsona) lub fotografuje w taki sposób, aby później można było policzyć brodawki płetwy odbytowej. W razie potrzeby w tym czasie można pobierać i przechowywać próbki innych tkanek (np. gonad). Stężenie VTG w wątrobie należy oznaczyć ilościowo za pomocą homologicznej metody ELISA (zob. procedury zalecane w odniesieniu do ryżanki japońskiej – w dodatek 6 do rozdziału C.48 w niniejszym załączniku). Ewentualnie można skorzystać z metod oznaczania

ilościowego mRNA vtg, tj. ekstrakcji mRNA genu *vtg I* z próbki wątroby oraz oznaczenia ilościowego liczby kopii genu *vtg I* (przypadających na nanogram całkowitego mRNA) metodą ilościowego PCR (29), określonych przez Agencję Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych. Zamiast określania liczby kopii genu *vtg* w grupie kontrolnej i grupie poddanej zabiegowi można zastosować metodę bardziej korzystną pod względem zasobów i mniej trudną z technicznego punktu widzenia, jaką jest określenie względnej (wielokrotności) zmiany ekspresji genu *vtg I* w grupie kontrolnej i grupie poddanej zabiegowi.

Drugorzędowe cechy płciowe

45. W normalnych warunkach jedynie dojrzałe płciowo samce ryżanki japońskiej mają brodawki, które rozwijają się jako drugorzędowa cecha płciowa na płytkach łączących niektóre promienie płetwy odbytowej, stanowiąc potencjalny biomarker zaburzeń funkcjonowania układu hormonalnego. Metodę liczenia brodawek płetwy odbytowej (liczby płytek łączących posiadających brodawki) przedstawiono w dodatku 8. Liczbę brodawek płetwy odbytowej przypadających na osobnika wykorzystuje się również do klasyfikacji tego osobnika jako samca lub samicy pod względem fenotypowych cech zewnętrznych do celów obliczenia prostych proporcji płci w kontrpróbie. Ryżankę japońską posiadającą dowolną liczbę brodawek większą niż 0 określa się jako samca; ryżankę japońską pozbawioną brodawek płetwy odbytowej określa się jako samicę.

Ocena potencjału reprodukcyjnego i płodności

46. Potencjał reprodukcyjny i płodność ocenia się w okresie od 1. do 3. tygodnia badania w pokoleniu F0 oraz w okresie od 15. do 17. tygodnia badania w pokoleniu F1. Jaja pobiera się od każdej pary hodowlanej każdego dnia przez 21 następujących po sobie dni. Każdego ranka jaja delikatnie zdejmuje się ze złapanych samic lub pobiera się przy pomocy syfonu z dna akwarium. W odniesieniu do każdej pary hodowlanej w kontrpróbie codziennie odnotowuje się zarówno potencjał reprodukcyjny, jak i płodność. Potencjał reprodukcyjny określa się jako liczbę złożonych jaj, natomiast płodność funkcjonalnie określa się jako liczbę jaj zapłodnionych i zdolnych do przeżycia w momencie liczenia. Liczenie należy przeprowadzić jak najszybciej po zebraniu jaj.
47. Codziennie odnotowuje się potencjał reprodukcyjny kontrpróby, który rozumie się jako liczbę jaj przypadających na parę hodowlaną i który analizuje się za pomocą zalecanych procedur statystycznych z wykorzystaniem średnich kontrprób. Płodność kontrpróby to suma liczby zapłodnionych jaj złożonych przez parę hodowlaną podzielona przez sumę liczby jaj złożonych przez tę parę. Statystycznie płodność analizuje się jako stosunek przypadający na każdą kontrpróbę. Wylęgowość kontrpróby to liczba osobników w wylęgu podzielona przez liczbę badanych zarodków (zazwyczaj 20). Statystycznie wylęgowość analizuje się jako stosunek przypadający na każdą kontrpróbę.

Pobieranie próbek od osobników dorosłych i ocena punktów końcowych

Pobieranie próbek od par hodowlanych ryb

48. Po upływie 17. tygodnia badania (tj. po pomyślnym utworzeniu pokolenia F2) osobniki dorosłe z pokolenia F1 uśmierca się w sposób humanitarny i ocenia się różne punkty końcowe (zob. tabele 1 i 2). Na potrzeby oceny brodawek płetwy odbytowej tworzy się obraz płetwy odbytowej (zob. dodatek 8) lub na potrzeby późniejszego liczenia brodawek ogon odcina się tuż za kloaką i utrzuca się go. W razie potrzeby w tym czasie można pobrać próbki z części płetwy ogonowej i zachować je do celów weryfikacji płci genetycznej (*dmy*). W razie potrzeby można pobrać próbkę tkanki na potrzeby powtórzenia badania na obecność genu *dmy*, aby zweryfikować płęć genetyczną konkretnych ryb. Przed zanurzeniem całego ciała w utrwalaczu należy otworzyć jamę ciała, aby umożliwić perfuzję odpowiednich utrwalaczy (np. Davidsona). Jeżeli natomiast przed utrwaleniem wykonano odpowiednie działania mające zapewnić przenikalność, nie ma potrzeby otwierania jamy ciała.

Histopatologia

49. Każdą rybę poddaje się ocenie histologicznej pod kątem występowania zmian patologicznych w tkance gonad (30); (29). Jak wspomniano w pkt 33, toksyczność ogólnoustrojowa i inne toksyczności mogą wywierać wpływ na inne mechanistyczne punkty końcowe oceniane w niniejszym teście (tj. VTG, SSC i niektóre histopatologiczne efekty w obrębie gonad). W związku z tym szczegółowej ocenie można również poddać badanie histopatologiczne wątroby i nerek, aby lepiej zrozumieć reakcje w mechanistycznych punktach końcowych. Jeżeli jednak te szczegółowe oceny nie są przeprowadzane, należy mimo to odnotować i zgłosić poważne nieprawidłowości zaobserwowane przypadkowo podczas oceny histopatologicznej. Można rozważyć odczytywanie wyników w kolejności od najwyższego do najniższego, tj. zaczynając od grupy poddanej zabiegowi, w której zaobserwowano największy wpływ (w porównaniu z próbą kontrolną), a kończąc na grupie poddanej zabiegowi, w której nie odnotowano żadnego wpływu, choć zaleca się zapoznanie z wytycznymi w zakresie histopatologii (29). Zwykle wszystkie próbki najpierw poddaje się obróbce/dzieli na skrawki, a następnie odczytuje je patolog. W przypadku stosowania podejścia opartego na odczytywaniu wyników w kolejności od najwyższego do najniższego należy zauważyć, że w procedurze RSCABS (ang. *Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices*) wykorzystuje się założenie, że wraz ze wzrostem poziomów dawek zwiększy się również wpływ biologiczny (patologia). A zatem w przypadku analizy wyłącznie jednej wysokiej dawki bez żadnych dawek pośrednich straci ona swoją moc. Podejście to może być dopuszczalne w przypadku, gdy analiza statystyczna nie jest konieczna do ustalenia, że wysoka dawka nie wywiera żadnego wpływu. Badanie to pozwala również określić fenotyp gonad.

Pozostałe obserwacje

50. Badanie MEOGRT pozwala uzyskać dane, które można wykorzystać (np. podejście oparte na wadze dowodów) do jednoczesnej oceny co najmniej dwóch ogólnych rodzajów mechanizmów wywoływania skutków szkodliwych (AOP) prowadzących do upośledzenia funkcji rozrodczych: a) mechanizmy o podłożu endokrynnym obejmujące zakłócenie funkcjonowania osi hormonalnej podwzgórze–przysadka–gonady (HPG); oraz b) mechanizmy, które powodują obniżenie przeżywalności, wzrostu (długości i masy) oraz rozrodczości poprzez toksyczność o podłożu innym niż endokrynnie. Badanie to obejmuje również punkty końcowe, które zwykle mierzy się w badaniach przewlekłej toksyczności, jak np. badanie pełnego cyklu życia i badanie wczesnego etapu życia, które to punkty można wykorzystać do oceny zagrożeń stwarzanych zarówno przez toksyczne sposoby działania o podłożu endokrynnym, jak i przez mechanizmy toksyczności o podłożu innym niż endokrynnie. Podczas badania należy codziennie obserwować zachowanie i odnotowywać wszelkie nietypowe zachowania. Ponadto należy odnotować każdy przypadek śmiertelny i obliczyć przeżywalność ryb do momentu eliminacji (6/7 tydzień badania), przeżywalność po eliminacji na potrzeby pobierania próbek od osobników nie w pełni dojrzałych (w 9–10 tygodniu po zapłodnieniu) oraz przeżywalność od momentu sparowania do momentu pobrania próbek od dorosłych ryb.

Tabela 1: Przegląd punktów końcowych badania MEOGRT*

Etap życia	Punkt końcowy	Pokolenie
Zarodek (2 tygodnie po zapłodnieniu)	Wylęg (odsetek i czas do wylęgu)	F1, F2
Osobnik młody (4 tygodnie po zapłodnieniu)	Przeżywalność	F1
Osobnik nie w pełni dojrzały (9 lub 10 tygodni po zapłodnieniu)	Przeżywalność	F1
	Wzrost (długość i masa)	
	Witellogenina (mRNA lub białko)	
	Drugorzędowe cechy płciowe (brodawki płetwy odbytowej)	
	Proporcje płci w ujęciu zewnętrznym	
	Czas do pierwszego tarła	
Osobnik dorosły	Rozrodczość	F0, F1

(12–14 tygodni po zapłodnieniu)	(potencjał reprodukcyjny i płodność)	
Osobnik dorosły (15 tygodni po zapłodnieniu)	Przeżywalność	F1
	Wzrost (długość i masa)	
	Drugorzędowe cechy płciowe (brodawki płetwy odbytovej)	
	Histopatologia (gonady, wątroba, nerki)	

* Te punkty końcowe należy poddać analizie statystycznej.

HARMONOGRAM

51. Badanie przedstawiono w harmonogramie badania MEOGRT w tabeli 2. Badanie MEOGRT obejmuje 4 tygodnie narażenia osobników dorosłych z pokolenia F0 i 15 tygodni narażenia pokolenia F1, jak również okres narażenia drugiego pokolenia (F2) aż do wylęgu (2 tygodnie po zapłodnieniu). Czynności podejmowane w ramach badania MEOGRT podsumowano w dodatku 9.

Tabela 2: Harmonogramy narażenia i pomiaru punktów końcowych w badaniu MEOGRT

Harmonogram narażenia i punktów końcowych w badaniu MEOGRT																				
Pokolenie F0	1	2	3	4																
Pokolenie F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
Pokolenie F2																		1	2	
Tydzień	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
Etap życia Legenda				Zarodek				Larwa				Osobnik młody				Osobnik nie w pełni dojrzały		Osobnik dorosły		
Punkty końcowe																				
Potencjał reprodukcyjny	F ₀														F ₁					- Schemat doświadczalny składa się z 7 grup kontrprób: 5 wykorzystuje się w ramach zabiegów z użyciem badanej substancji chemicznej 2 wykorzystuje się w próbie kontrolnej poddanej zabiegowi (4, jeżeli stosuje się rozpuszczalnik) - Schemat w ramach grupy 12 kontrprób wykorzystuje się do rozmnażania, patologii osobnika dorosłego i SSC (10–18 tydz.) 6 kontrprób wykorzystuje się do badania wylęgu, przeżywalności, Vtg; oraz – SSC i wzrostu osobników nie w pełni dojrzałych (1–9 tydz.) SSC: drugorzędowe cechy płciowe; Tydz.: tygodnie; Vtg: witellogenina
Płodność	F ₀														F ₁					
Wylęg					F ₁													F ₂		
Przeżywalność						F ₁							F ₁					F ₁		
Wzrost					F ₀								F ₁					F ₁		
Witellogenina													F ₁							
Drugorzędowe cechy płciowe													F ₁					F ₁		
Histopatologia																		F ₁		
Tydzień badania	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	

RAPORTOWANIE DANYCH

Analiza statystyczna

52. Ponieważ płeć genetyczną określa się w odniesieniu do wszystkich badanych ryb, dane należy analizować oddzielnie dla każdej płci genetycznej (tj. w odniesieniu do samców posiadających chromosomy XY i samic posiadających chromosomy XX). Niezastosowanie się do tych zasad znacznie zmniejszy moc statystyczną każdej analizy. Statystyczne analizy danych najlepiej jest wykonywać zgodnie z procedurami opisanymi w dokumencie OECD „Aktualne podejście do statystycznej analizy danych ekotoksyczności: wytyczne stosowania” (Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application) (32). Dodatek 10 zawiera dalsze wytyczne dotyczące analizy statystycznej.

53. W przypadku gdy należy zarejestrować NOEC, projekt badania i wybrany test statystyczny powinny zapewnić moc wystarczającą do wykrycia zmian o znaczeniu biologicznym w punktach końcowych (32). Zgłoszenie odpowiednich stężeń i parametrów efektywnych może zależeć od ram regulacyjnych. Należy wskazać procentową zmianę w każdym punkcie końcowym, który jest ważny pod względem wykrycia lub oszacowania. Schemat doświadczalny należy dostosować w taki sposób, aby było to możliwe. Istnieje małe prawdopodobieństwo, aby do wszystkich punktów końcowych miała zastosowanie taka sama zmiana procentowa, i równie mało prawdopodobne jest, aby można było zaplanować wykonalne doświadczenie spełniające te kryteria dla wszystkich punktów końcowych, w związku z tym należy skupić się na tych punktach końcowych, które są istotne dla danego doświadczenia, planując doświadczenie w odpowiedni sposób. W dodatku 10 dostępne są schematy statystyczne i wytyczne stanowiące pomoc w opracowywaniu danych oraz wyborze najodpowiedniejszego badania statystycznego lub modelu do wykorzystania. Można również zastosować inne podejścia statystyczne, pod warunkiem że są one uzasadnione z naukowego punktu widzenia.
54. Konieczna będzie analiza zmian w obrębie każdego zbioru kontrprób z zastosowaniem analizy wariancji lub procedur tablicy wielodzielczej oraz wystarczających, odpowiednich metod analizy statystycznej opartych na tej analizie. W odniesieniu do reakcji ciągłych, aby wielokrotnie porównać wyniki uzyskane przy poszczególnych stężeniach z wynikami prób kontrolnych, zaleca się stosowanie procedury regresyjnej (np. testu Jonckheere’a-Terpstry). Test Dunnetta lub Dunna należy stosować tam, gdzie dane nie są spójne z monotoniczną zależnością stężenie-odpowieź (w razie potrzeby po odpowiedniej transformacji danych).
55. W kontekście potencjału reprodukcyjnego zliczenie jaj odbywa się codziennie, jednak można je analizować jako całkowite zliczenie jaj lub jako powtarzany pomiar. Informacje szczegółowe dotyczące analizy tego punktu końcowego znajdują się w dodatku 10. W odniesieniu do danych histopatologicznych przedstawionych w formie stopni nasilenia opracowano nowy test statystyczny o nazwie *Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS)* (33).
56. Należy zgłosić wszelkie punkty końcowe zaobserwowane w zabiegach poddawania działaniu substancji chemicznych, które znacznie różnią się od właściwych prób kontrolnych.

Warunki analizy danych

Wykorzystanie zakłóconych poziomów zabiegu

57. Przy ustalaniu, czy kontrpróba lub cały zabieg wykazują wyraźną toksyczność i powinny zostać usunięte z analizy, należy uwzględnić kilka czynników. Widoczną toksyczność definiuje się jako śmiertelność wynoszącą >4 w dowolnej kontrpróbie między 3 a 9 tygodniem po zapłodnieniu, której nie można wytłumaczyć błędem technicznym. Inne oznaki wyraźnej toksyczności to krwotoki, nietypowe zachowania, nietypowe wzorce pływania, brak łaknienia i wszelkie inne kliniczne objawy choroby. W przypadku subletalnych objawów toksyczności niezbędne mogą być oceny jakościowe, które należy przeprowadzać zawsze w odniesieniu do grupy kontrolnej z wodą rozcieńczającą (należy stosować wyłącznie czystą wodę). Jeżeli widoczna toksyczność jest ewidentna w najwyższym zabiegu lub zabiegach, zaleca się odcięcie ich od analizy.

Kontrole z rozpuszczalnikiem

58. Użycie rozpuszczalnika należy brać pod uwagę tylko w ostateczności, po uwzględnieniu wszystkich innych opcji wprowadzenia substancji chemicznej. W przypadku zastosowania rozpuszczalnika należy jednocześnie wykonać próbę kontrolną z wodą rozcieńczającą. Na zakończenie badania należy przeprowadzić ocenę potencjalnego wpływu rozpuszczalnika. Dokonuje się tego, porównując statystycznie grupę kontrolną z rozpuszczalnikiem i grupę kontrolną z wodą rozcieńczającą. Najbardziej właściwe punkty końcowe, które należy uwzględnić w niniejszej analizie, to wyznaczniki wzrostu (masa), ponieważ mogą na nie wpłynąć toksyczności ogólne. Jeżeli w tych punktach końcowych wykryte zostaną statystycznie istotne różnice między grupą kontrolną z wodą rozcieńczającą a grupami kontrolnymi z rozpuszczalnikiem, należy odwołać się do swojej najlepszej wiedzy fachowej, aby ustalić, czy stanowią one zagrożenie dla ważności badania. Jeżeli dwie próby kontrolne różnią się od siebie, próby poddawane działaniu substancji chemicznej należy porównać z próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem, chyba że wiadomo, że najlepiej jest przeprowadzić porównanie z próbą kontrolną z wodą rozcieńczającą. Jeżeli między dwiema grupami kontrolnymi nie występuje statystycznie istotna różnica, zaleca się porównanie zabiegów, w ramach których zwierzęta poddaje się działaniu substancji chemicznej, z pulą zabiegową (grupami kontrolnymi z rozpuszczalnikiem i z wodą rozcieńczającą), chyba że wiadomo, że najlepiej jest dokonać porównania z próbą kontrolną z wodą rozcieńczającą albo z rozpuszczalnikiem.

Sprawozdanie z badania

59. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna: właściwości fizyczne i – w stosownych przypadkach – właściwości fizykochemiczne;

- dane identyfikacyjne substancji chemicznej.

Substancja jednoskładnikowa:

- wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;
- dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp. (w tym, w stosownych przypadkach, zawartość węgla organicznego).

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:

- opisane w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), występowania ilościowego oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

Badany gatunek:

- nazwa systematyczna, szczep (jeżeli jest dostępny), źródło i metoda pobierania zapłodnionych jaj i dalsze postępowanie.

Warunki badania:

- fotoperiod(-y);
- projekt badania (np. rozmiar komory, objętość materiału i wody, liczba komór badawczych oraz kontrprób, liczba osobników w wylęgu na kontrpróbę);
- metoda przygotowania roztworów podstawowych i częstotliwość wymiany (jeżeli zastosowany został środek rozpuszczający, należy podać jego stężenie);
- metoda dawkowania badanej substancji chemicznej (np. pompy, układy rozcieńczające);
- wydajność odzyskowa metody i badane stężenia nominalne, granica oznaczalności, średnie wartości pomiarowych oraz ich odchylenia standardowe w naczyniach badawczych, a także metoda uzyskania takich wartości oraz dowody świadczące o tym, że pomiary odnoszą się do stężeń badanej substancji chemicznej w rzeczywistym roztworze;
- charakterystyka wody rozcieńczającej: pH, twardość, temperatura, stężenie rozpuszczonego tlenu, poziom chloru resztkowego (jeśli dokonano pomiaru), całkowity węgiel organiczny (jeśli dokonano pomiaru), zawiesina (jeśli dokonano pomiaru), zasolenie środowiska badania (jeśli dokonano pomiaru) oraz wszelkie inne wykonane pomiary;
- badane stężenia nominalne, średnie wartości pomiarowych oraz ich odchylenia standardowe;
- jakość wody w naczyniach badawczych, pH, temperatura (codziennie) i stężenie rozpuszczonego tlenu;

- szczegółowe informacje dotyczące karmienia (np. rodzaj pokarmu, jego źródło, podawana ilość i częstotliwość podawania).

Wyniki:

- dowody świadczące o tym, że próby kontrolne spełniają ogólne kryteria ważności;
 - dane dotyczące próby kontrolnej (oraz próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem, jeżeli jest stosowana) oraz grup poddanych zabiegowi, takie jak: wylęg (wylęgowość oraz czasu wylęgu) w pokoleniach F1 i F2, przeżywalność po wylęgu w pokoleniu F1, wzrost (długość i masa ciała) w pokoleniu F1, płęć genetyczna oraz zróżnicowanie płci (np. drugorzędowe cechy płciowe na podstawie brodawek płetwy odbytowej i histologii gonad) w pokoleniu F1, płęć fenotypowa w pokoleniu F1, drugorzędowe cechy płciowe (brodawki płetwy odbytowej) w pokoleniu F1, mRNA *vtg* (lub białko VTG) w pokoleniu F1, ocena histopatologiczna (gonady, wątroba i nerki) w pokoleniu F1 oraz rozrodczość (potencjał reprodukcyjny i płodność) w pokoleniach F0 i F1; (zob. tabele 1 i 2);
 - metoda analizy statystycznej (analiza regresji lub analiza wariancji) oraz przetwarzania danych (zastosowane badania lub modele statystyczne);
 - stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC) w odniesieniu do każdej ocenionej reakcji;
 - najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC), w odniesieniu do każdej ocenionej reakcji (przy $p = 0,05$); EC_x w odniesieniu do każdej ocenianej reakcji, jeżeli dotyczy, i przedziały ufności (np. 90 % lub 95 %) oraz wykres dopasowanego modelu wykorzystanego do obliczeń, nachylenie krzywej zależności stężenie-odpowieć, wzór modelu regresji, szacowane parametry modelu i ich błędy standardowe;
 - wszelkie odchylenia od niniejszej metody badawczej oraz odchylenia od kryteriów dopuszczalności, a także rozważania dotyczące potencjalnych konsekwencji wyniku badania.
60. W odniesieniu do wyników pomiarów punktów końcowych należy przedstawić średnie wartości oraz ich odchylenia standardowe (w miarę możliwości zarówno na podstawie kontrprób, jak i stężeń).

BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (2012a). *Fish Toxicity Testing Framework*. Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 171, Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (1) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K i Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. *Current Protocols in Toxicology* 39: 1-36.
- (2) OECD (2012b). *Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters*. Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 150, Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (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 i 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 i 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 i 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 i 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 i 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 i Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 β -Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. *Aquatic Toxicology* 77: 78-86.
- (11) Nakamaura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T i 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) Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Dostępne na stronie internetowej: <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html>
- (13) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P i 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. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 23, Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (15) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ i 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 i Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.
- (17) Koger CS, Teh SJ i 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 i Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.
- (19) Gormley K i 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) Rozdział C.15 niniejszego załącznika, Ryby, krótkoterminowe badanie toksyczności na embrionie i narybku.

- (21) Rozdział C.37 niniejszego załącznika, 21-dniowe badanie ryb: krótkoterminowe badanie przesiewowe aktywności estrogennej i androgennej oraz zahamowanie aromatazy.
- (22) Rozdział C.41 niniejszego załącznika, Badanie rozwoju płciowego ryb.
- (23) Rozdział C.48 niniejszego załącznika, Krótkoterminowe badanie rozrodczości ryb.
- (24) Rozdział C.47 niniejszego załącznika, Badanie toksyczności na wczesnych etapach życia ryb.
- (25) Rozdział C.49 niniejszego załącznika, Badanie toksyczności ostrej na rybach embrionach (FET).
- (26) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L i 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 i 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, Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 227. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (29) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M i 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 i 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 (załączniki do tej publikacji stanowią osobny dokument). Paryż: OECD Publishing.
- (32) Green JW, Springer TA, Saulnier AN i Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1108-1116.

Dodatek 1

DEFINICJE

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

ELISA: test immunoenzymatyczny.

Potencjał reprodukcyjny = liczba jaj.

Płodność = liczba żywotnych jaj / potencjał reprodukcyjny.

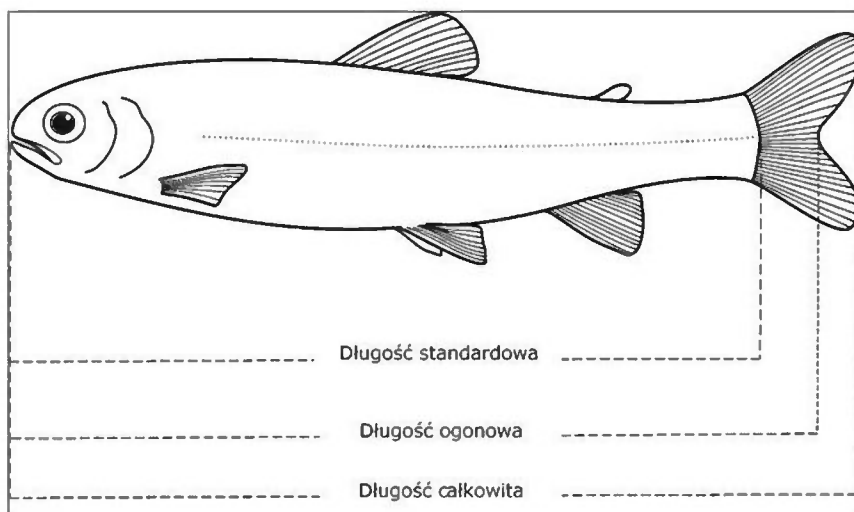
Długość ogonowa (FL) oznacza długość od czubka otworu gębowego do końca środkowego promienia płetwy ogonowej – parametr ten wykorzystuje się w odniesieniu do ryb, u których trudno jest wskazać miejsce, w którym kończy się kręgosłup (www.fishbase.org).

Wylęgowość = wylęgi / liczba zarodków załadowanych do inkubatora.

IACUC: Komitet Instytucjonalny ds. Opieki i Wykorzystania Zwierząt (ang. Institutional Animal Care and Use Committee).

Długość standardowa (SL) oznacza długość ryby mierzoną od czubka otworu gębowego do tylnej krawędzi ostatniego kręgu lub do tylnej krawędzi środkowobocznej części urostylu. Innymi słowy, w ramach tego pomiaru nie bierze się pod uwagę długości płetwy ogonowej (www.fishbase.org).

Długość całkowita (TL) oznacza długość mierzoną od czubka otworu gębowego do czubka dłuższego płata płetwy ogonowej, zazwyczaj mierzonego po zgięciu płatów do linii środkowej. Pomiar zdejmuje się wzdłuż linii prostej, nie wzdłuż krzywizny ciała ryby (www.fishbase.org).



Rys. 1: Opis różnych stosowanych długości

EC_x: (stężenie efektywne x %) jest stężeniem mającym x % wpływ na organizmy użyte do badań w danym okresie narażenia w porównaniu z próbą kontrolną. Na przykład EC₅₀ jest stężeniem, które według szacunków ma wpływ na punkt końcowy badania w 50 % narażonej populacji w określonym okresie narażenia.

Badanie przepływowe to badanie, w którym podczas narażenia trwa ciągły przepływ roztworów do badań przez układ badawczy.

Oś HPG: oś podwzgórze–przysadka–gonady.

IUPAC: Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej.

Wskaźnik obciążenia: mokra masa ryb na objętość wody.

Najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC): najmniejsze badane stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym obserwuje się znaczące działanie toksyczne (przy $p < 0,05$) w porównaniu z próbą kontrolną. Wszystkie badane stężenia powyżej LOEC powinny jednak wywierać szkodliwy skutek równy skutkom, które zaobserwowano przy LOEC, lub od nich większy. W przypadku gdy oba warunki nie mogą być spełnione, należy szczegółowo wyjaśnić, w jaki sposób wybrano LOEC (a następnie NOEC). W dodatkach 5 i 6 przedstawiono wytyczne w tym zakresie.

Mediana stężenia śmiertelnego (LC₅₀): stężenie badanej substancji chemicznej szacowane jako stężenie śmiertelne dla 50 % organizmów użytych do badań podczas trwania badania.

Stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC): badane stężenie bezpośrednio poniżej LOEC, które nie wywiera statystycznie istotnego wpływu ($p < 0,05$) w ustalonym okresie narażenia w porównaniu z próbą kontrolną.

SMILES (ang. *Simplified Molecular Input Line Entry Specification*): uproszczony sposób zapisu struktury chemicznej w liniowej formie tekstowej.

Obsada: liczba ryb na objętość wody.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

UVCB: substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne.

VTG: witellogenina to fosfolipidoglikoproteinowy prekursor białek żółtka jajka występujący zwykle u aktywnych płciowo samic wszystkich gatunków jajorodnych.

TPZ: tygodnie po zapłodnieniu.

Dodatek 2**NIEKTÓRE WŁAŚCIWOŚCI CHEMICZNE DOPUSZCZALNEJ WODY ROZCIEŃCZAJĄCEJ**

Substancja	Stężenie graniczne
Cząstki stałe	5 mg/l
Całkowity węgiel organiczny	2 mg/l
Amoniak niejonizowany	1 µg/l
Chlor resztkowy	10 µg/l
Całkowita zawartość pestycydów fosforoorganicznych	50 ng/l
Całkowita zawartość pestycydów chloroorganicznych oraz polichlorowanych bifenyli	50 ng/l
Całkowity chlor organiczny	25 ng/l
Glin	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Chrom	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Miedź	1 µg/l
Żelazo	1 µg/l
Ołów	1 µg/l
Nikiel	1 µg/l
Cynk	1 µg/l
Kadm	100 ng/l
Rtęć	100 ng/l
Srebro	100 ng/l

Dodatek 3**WARUNKI BADANIA WŁAŚCIWE DLA BADANIA MEOGRT**

- | | |
|---|---|
| 1. Zalecany gatunek | Ryżanka japońska (<i>Oryzias latipes</i>) |
| 2. Rodzaj badania | W warunkach ciągłego przepływu |
| 3. Temperatura wody | Nominalna temperatura badania wynosi 25 °C. Średnia temperatura w trakcie badania w każdym zbiorniku wynosi 24–26 °C. |
| 4. Jakość oświetlenia | Fluorescencyjne żarówki (szerokie spektrum oraz o mocy ~150 lumenów/m ²) (~150 luksów).

16 godzin światła, 8 godzin ciemności. |
| 6. Wskaźnik obciążenia | Pokolenie F0: 2 osobniki dorosłe na kontrpróbę; pokolenie F1: początkowo przy wykorzystaniu maksymalnie 20 jaj (zarodków) na kontrpróbę, przy wylęgu zmniejszenie do 12 zarodków na kontrpróbę, a następnie w 9–10 tygodniu po zapłodnieniu 2 osobniki dorosłe (para hodowlana o zestawie chromosomów XX–XY) na potrzeby etapu rozmnażania. |
| 7. Minimalna objętość użytkowa komory badawczej | 1,8 l (np. wielkość komory badawczej: 18 x 9 x 15 cm). |
| 8. Wymiana objętości roztworów do badań | Minimum 5 wymian objętości dziennie do 16 wymian objętości dziennie (lub przy natężeniu przepływu wynoszącym 20 ml/min). |
| 9. Początkowy wiek organizmów użytych do badań | Pokolenie F0: >12 tygodni po zapłodnieniu, zaleca się jednak nie przekraczać 16 tygodnia po zapłodnieniu. |
| 10. Liczba organizmów na kontrpróbę | Pokolenie F0: 2 ryby (para samiec – samica) pokolenie F1: maksymalnie 20 ryb (jaj) na kontrpróbę (pochodzących od par hodowlanych z pokoleń F0 oraz F1). |
| 11. Liczba zabiegów | 5 zabiegów z użyciem badanej substancji chemicznej oraz odpowiednie próby kontrolne. |
| 12. Liczba kontrprób na zabieg | Minimum 6 kontrprób na zabieg w odniesieniu do badanej substancji chemicznej oraz minimum 12 kontrprób w odniesieniu do próby kontrolnej i próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem (liczbę kontrprób podwaja się na etapie rozmnażania w pokoleniu F1), jeżeli je zastosowano. |
| 13. Liczba organizmów na badanie | Minimum 84 ryby w przypadku pokolenia F0 i 504 ryby w przypadku pokolenia F1. (Jeżeli zastosowano próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem – minimum 108 ryb w przypadku pokolenia F0 i 648 ryb w przypadku |

- pokolenia F1). Liczoną jednostką są osobniki, które zakończyły stadium rozwoju na etapie eleuteroembrionu.
14. Schemat żywienia Ryby karmi się bez ograniczeń solowcami z gatunku *Artemia* spp., (24-godzinnymi larwami), dokarmiając w razie potrzeby dostępnym na rynku pokarmem w płatkach (w dodatku 6 można znaleźć przykładowy schemat żywienia zapewniający odpowiedni wzrost i rozwój wspomagające wysoką rozrodczość).
15. Napowietrzanie Bez napowietrzania, dopóki zawartość tlenu rozpuszczonego nie zbliża się do < 60 % wartości nasycenia powietrzem.
16. Woda rozcieńczająca Czysta woda powierzchniowa, woda ze studni lub regenerowana, lub odchlorowana woda wodociągowa.
17. Okres narażenia Zasadniczo 19 tygodni (od pokolenia F0 do wylęgu pokolenia F2).
18. Biologiczne punkty końcowe (pierwotne) Wylęgowość (pokolenia F1 i F2); przeżywalność (pokolenie F1, od wylęgu do 4 tygodnia po zapłodnieniu (koniec stadium larwalnego / początek stadium młodocianego), od 4 do 9 (lub 10) tygodnia po zapłodnieniu (początek stadium młodocianego do stadium niepełnej dojrzałości) oraz od 9 do 15 tygodnia po zapłodnieniu (od stadium niepełnej dojrzałości do eutanazji osobników dorosłych)); wzrost (pokolenie F1, długość i masa w 9 i 15 tygodniu po zapłodnieniu); drugorzędowe cechy płciowe (pokolenie F1, brodawki płetwy odbytovej w 9 i 15 tygodniu po zapłodnieniu); witellogenina (pokolenie F1, mRNA *vtg* lub białko VTG w 15 tygodniu po zapłodnieniu); płęć fenotypowa (pokolenie F1, poprzez histologię gonady w 15 tygodniu po zapłodnieniu); rozrodczość (pokolenia F0 i F1, potencjał reprodukcyjny i płodność przez 21 dni); czas do tarła (pokolenie F1); oraz histopatologia (pokolenie F1, gonada, wątroba i nerka w 15 tygodniu po zapłodnieniu).
19. Kryteria ważności badania Rozpuszczony tlen zapewniający wartość nasycenia powietrzem wynoszącą ≥ 60 %; średnia temperatura wody w trakcie badania: 24–26 °C; pomyślne rozmnożenie ≥ 65 % samiec w próbach kontrolnych; średni dzienny potencjał reprodukcyjny ≥ 20 jaj w próbach kontrolnych; wylęgowość jaj powinna wynosić (średnio) ≥ 80 % w próbach kontrolnych (w każdej z pokolenia F1 i F2); przeżywalność po wylęgu do 3 tygodni po zapłodnieniu na poziomie (średnio) ≥ 80 % i od 3 tygodni po zapłodnieniu do uśmiercenia (średnio) ≥ 90 % w odniesieniu do pokolenia w próbach kontrolnych (pokolenie F1) – stężenia badanej substancji chemicznej w roztworze powinny być utrzymywane w sposób zadowalający w zakresie ± 20 % średnich zmierzonych wartości.

Dodatek 4

WYTYCZNE DOTYCZĄCE TYPOWYCH WARTOŚCI KONTROLNYCH

Należy zauważyć, że niniejsze wartości kontrolne opierają się na ograniczonej liczbie badań walidacyjnych i mogą ulec zmianie w świetle dalszych doświadczeń.

Wzrost

Pomiary masy i długości pobierane są dla wszystkich ryb, z których pobrano próbki między 9. (lub 10.) a 15. tygodniem po zapłodnieniu. Zgodnie z tą procedurą spodziewana mokra masa w 9. tygodniu po zapłodnieniu w przypadku samców wyniesie 85–145 mg, a w przypadku samic – 95–150 mg. W 15. tygodniu po zapłodnieniu spodziewane masy to 250–330 mg w przypadku samców oraz 280–350 mg w przypadku samic. Choć w przypadku poszczególnych ryb mogą zaistnieć znaczne odchylenia od tych zakresów, średnie masy w próbie kontrolnej znacznie wychodzą poza te wartości, zwłaszcza jeżeli są od nich niższe, mogą wskazywać na problemy z żywieniem, kontrolą temperatury, jakością wody, chorobę lub dowolną kombinację niniejszych czynników.

Wylęg

Skuteczność wylęgu w próbach kontrolnych zazwyczaj oscyluje w granicach 90 %, jednak niskie wartości na poziomie 80 % nie są rzadkością. Skuteczność wylęgu poniżej 75 % może wskazywać na niewystarczające wymieszanie rozwijających się jaj lub niedostateczną ostrożność w obchodzeniu się z nimi, np. nieterminowe usuwanie martwych jaj prowadzące do zakażenia grzybiczego.

Przeżywalność

Wskaźniki przeżycia do 3. tygodnia po zapłodnieniu od wylęgu oraz po 3 tygodniach po zapłodnieniu zazwyczaj wynoszą przynajmniej 90 % w odniesieniu do prób kontrolnych, niskie wskaźniki przeżywalności na poziomie 80 % we wczesnym stadium rozwoju w odniesieniu do prób kontrolnych nie są jednak niepokojące. Wskaźniki przeżywalności w próbach kontrolnych poniżej 80 % mogłyby być powodem do obaw i wskazywać na niedostateczną dbałość o czystość akwariów, mogącą prowadzić do utraty ryb w fazie larwalnej w wyniku choroby lub uduszenia z powodu niskiego poziomu stężenia rozpuszczonego tlenu. Śmiertelność może być także wynikiem uszkodzenia w trakcie czyszczenia zbiornika oraz utraty ryb w fazie larwalnej w systemie odprowadzania wody ze zbiornika.

Gen witellogeniny

Choć bezwzględne poziomy genu witellogeniny (*vlg*), wyrażone w kopiach/ng całkowitego mRNA, mogą znacznie różnić się między laboratoriami z powodu stosowanych procedur lub oprzyrządowania, stosunek *vlg* samic w próbie kontrolnej do samców w próbie kontrolnej powinien być około 200 razy większy. Nie jest rzadkością, że dany stosunek

osiąga wartość nawet od 1 000 do 2 000, jednak stosunki poniżej 200 są podejrzane i mogą wskazywać na problemy z zanieczyszczeniem próbki lub problemy dotyczące procedury lub zastosowanych odczynników.

Drugorzędowe cechy płciowe

Jeżeli chodzi o samców, zwyczajowy zakres drugorzędowych cech płciowych, który określany jest jako całkowita liczba segmentów w promieniach brodawki płetwy odbytovej, wynosi 40–80 segmentów w 9.–10. tygodniu po zapłodnieniu. Do 15. tygodnia po zapłodnieniu, zakres dotyczący samców w próbie kontrolnej powinien oscylować w granicach 80–120, a w przypadku samic w próbie kontrolnej wartość powinna wynosić około 0. W rzadkich przypadkach, z niewyjaśnionych powodów niektóre samce w 9. tygodniu po zapłodnieniu mogą mieć niewykształcone brodawki, ale ponieważ rozwój brodawek u wszystkich samców w próbie kontrolnej następuje do 15. tygodnia po zapłodnieniu, jest to najprawdopodobniej spowodowane opóźnionym rozwojem. Obecność brodawek u samic w próbie kontrolnej wskazuje na obecność samców XX w populacji.

Samce XX

Zwykle podstawowa częstość występowania samców XX w hodowli w temperaturze 25 °C wydaje się wynosić około 4 % lub mniej, a częstość występowania zwiększa się wraz z temperaturą. Należy podjąć działania mające na celu zminimalizowanie odsetka samców XX w populacji. Ponieważ częstość występowania samców XX wydaje się posiadać element genetyczny i w związku z tym jest dziedziczna, monitorowanie kultury wyjściowej oraz zapewnianie, aby samce XX nie były wykorzystywane do jej rozmnażania, jest skutecznym sposobem ograniczania częstości występowania samców XX w populacji.

Aktywność tarła

Aktywność tarła w kontrpróbach kontrolnych należy monitorować codziennie przed przeprowadzeniem oceny potencjału reprodukcyjnego. Pary w próbie kontrolnej można poddać ocenie jakościowej w sposób wizualny pod względem dowodów na aktywność tarła. Większość par w próbie kontrolnej powinna składać jaja między 12. a 14. tygodniem po zapłodnieniu. Niska liczba par składających jaja do tego czasu wskazuje na potencjalne problemy ze zdrowiem, dojrzałością lub dobrostanem ryb.

Potencjał reprodukcyjny

Zdrowa i dobrze odżywiana przez 12–14 tygodni po zapłodnieniu ryżanka japońska zazwyczaj składa jaja codziennie, wytwarzając w ciągu dnia 15–50 jaj. Wytwarzanie jaj w przypadku 16 z zalecanych 24 par hodowlanych w próbie kontrolnej (>65 %) powinno dawać więcej niż 20 jaj na parę dziennie i może sięgać nawet około 40 jaj dziennie. Wartość niższa niż ta może wskazywać na niedojrzałe, niedożywione lub niezdrowe pary tarłowe.

Płodność

Odsetek płodnych jaj w odniesieniu do par tarłowych w próbie kontrolnej mieści się zazwyczaj w zakresie 90 %, przy czym wartości w okolicach 95 % i wyższe nie są rzadkością. Współczynniki płodności wynoszące poniżej 80 % w odniesieniu do jaj w próbie kontrolnej są podejrzane i mogą wskazywać albo na niezdrowe osobniki, albo na warunki hodowli gorsze od idealnych.

Dodatek 5

PRZYKŁADOWY SCHEMAT ŻYWIENIA

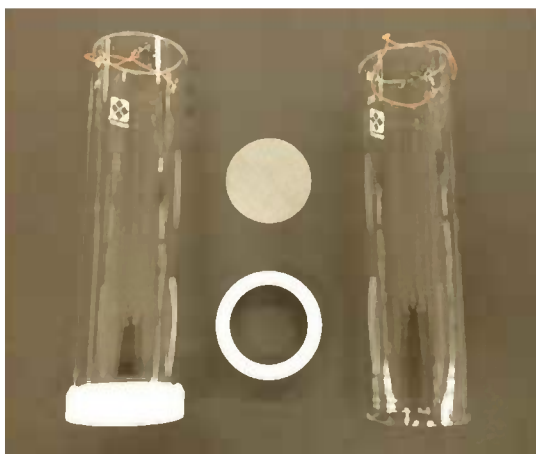
W tabeli 1 przedstawiono przykładowy schemat żywienia zapewniający odpowiedni wzrost i rozwój w celu wsparcia intensywnego rozmnażania. Odchylenia od tego schematu żywienia są dopuszczalne, jednak zaleca się zbadanie ich w celu sprawdzenia, czy można zaobserwować akceptowalny rozwój i rozmnażanie. Postępowanie zgodnie z proponowanym schematem żywienia wymaga określenia suchej masy solowca w objętości mułu zawierającego solowiec przed rozpoczęciem badania. Można tego dokonać, odważając określoną objętość mułu zawierającego solowiec, który suszono przez 24 godziny w temperaturze 60 °C na zważonej wcześniej szalce. Aby uwzględnić masę soli w mule, identyczną objętość takiego samego roztworu soli jak ten wykorzystywany w mule należy również wysuszyć, zważyć i odjąć od masy wysuszonego mułu zawierającego solowiec. Przed wysuszeniem można ewentualnie przefiltrować i wypłukać solowce wodą destylowaną, eliminując dzięki temu potrzebę ważenia „czystej soli”. Informacje te wykorzystuje się do przeliczenia informacji zawartych w tabeli z suchej masy solowca do objętości mułu zawierającego solowiec, jaką należy karmić każdą rybę. Zaleca się ponadto cotygodniowe ważenie podwielokrotności mułu zawierającego solowiec w celu sprawdzenia prawidłowej suchej masy podawanego solowca.

Tabela 1: Przykładowy schemat żywienia

Czas (po wylęgu)	Solowiec (mg suchej masy na rybę na dzień)
Dzień 1	0,5
Dzień 2	0,5
Dzień 3	0,6
Dzień 4	0,7
Dzień 5	0,8
Dzień 6	1,0
Dzień 7	1,3
Dzień 8	1,7
Dzień 9	2,2
Dzień 10	2,8
Dzień 11	3,5
Dzień 12	4,2
Dzień 13	4,5
Dzień 14	4,8
Dzień 15	5,2
Dni 16–21	5,6
Tydzień 4	7,7
Tydzień 5	9,0
Tydzień 6	11,0
Tydzień 7	13,5
Tydzień 8 – uśmiercenie	22,5

Dodatek 6**PRZYKŁADY KOMORY INKUBACYJNEJ JAJ****Przykład A**

Inkubator ten składa się z probówki do wirówki z przezroczystego szkła, połączonej tuleją ze stali nierdzewnej i utrzymywanej w miejscu przez górną pokrywę śruby wirówki. Mała rurka ze szkła lub stali nierdzewnej wystaje poza pokrywę i jest umieszczona blisko zaokrąglonego dna, delikatnie przepuszczając powietrze, by podtrzymać jaja i ograniczyć przenoszenie się między jajami zakażeń saprofitami, ułatwiając jednocześnie wymianę chemiczną między inkubatorem a zbiornikiem.

Przykład B

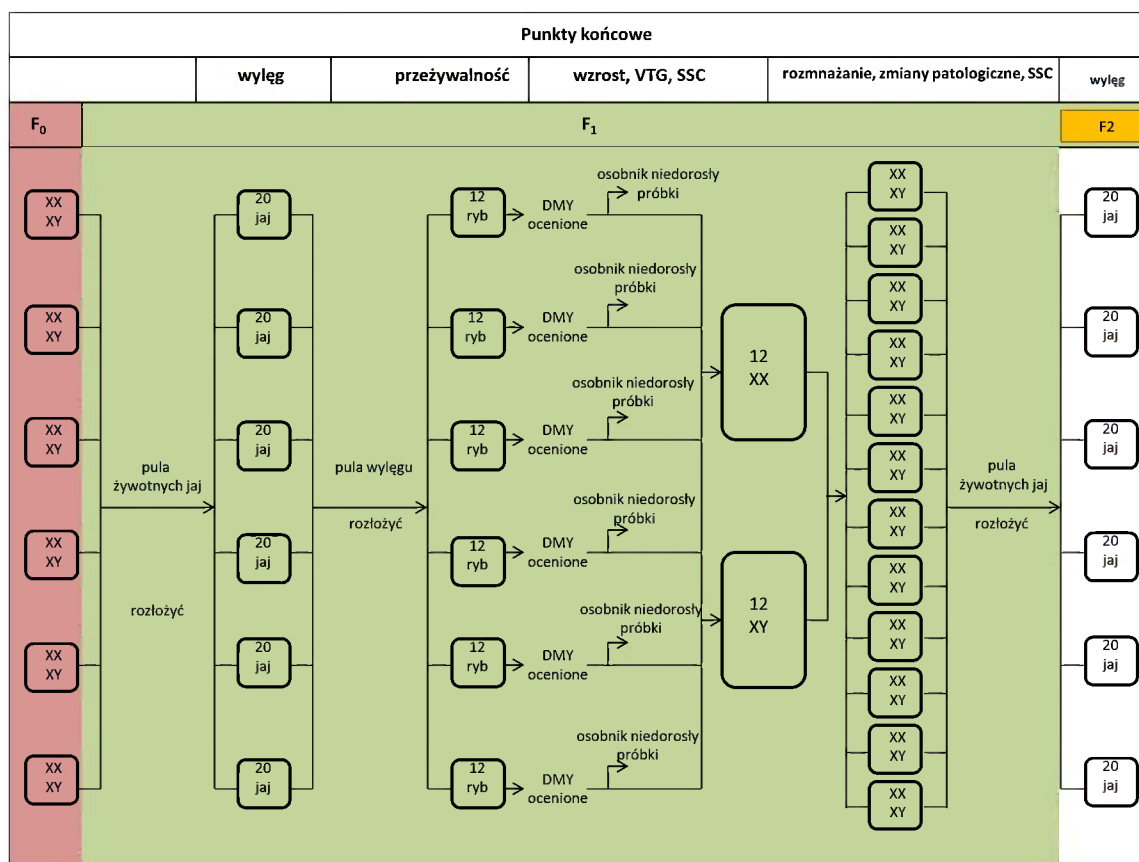


Inkubator ten składa się ze szklanego, cylindrycznego korpusu (o średnicy 5 cm i wysokości 10 cm) i nierdzewnej siatki drucianej (0,25 ϕ , oczko siatki – 32), która jest przymocowana do spodu korpusu za pomocą pierścienia PTFE. Inkubatory mocuje się do zbiorników na przewodnicy i potrząsa pionowo (w amplitudzie około 5 cm) w odpowiednim cyklu (około raz na 4 sekundy) dla jaj ryżanki japońskiej.

Dodatek 7

SCHEMAT PRZEDSTAWIAJĄCY ŁĄCZENIE I ROZPRZESTRZENIANIE KONTRPRÓB METODĄ BADAWCZĄ MEOGRT

Rys. 1: Łączenie i rozprzestrzenianie kontrprób metodą badawczą MEOGRT. Rysunek przedstawia jeden zabieg lub ½ próby kontrolnej. Z powodu połączenia, w trakcie badania tożsamość kontrpróby nie jest ciągła. Należy zauważyć, że pojęcie „jaja” odnosi się do żywotnych, zapłodnionych jaj (równoważnych z zarodkami).



Zabiegi i opracowywanie kontrprób

Na podstawie metody badawczej zaleca się, aby w pięciu zabiegach z użyciem badanej substancji chemicznej wykorzystano materiał czysty technicznie oraz próbę kontrolną ujemną. Liczba kontrprób na zabieg w trakcie MEOGRT jest zmienna, a liczba kontrprób w grupie kontrolnej stanowi dwukrotność każdego zabiegu z użyciem badanej substancji chemicznej. W pokoleniu F₀ każdy zabieg z użyciem badanej substancji chemicznej obejmuje sześć kontrprób, natomiast zabieg w próbie kontrolnej ujemnej obejmuje 12 kontrprób. Zdecydowanie odradza się wykorzystywania rozpuszczalników, a w razie ich użycia, w sprawozdaniu MEOGRT należy zawrzeć uzasadnienie dotyczące zastosowania oraz wyboru rozpuszczalnika. Jeżeli wykorzystuje się rozpuszczalnik, konieczne są również dwa rodzaje prób kontrolnych: a) kontrola z rozpuszczalnikiem, oraz b) kontrolna ujemna.

Każda z tych dwóch grup kontrolnych powinna zawierać pełny zestaw kontrprób we wszystkich punktach harmonogramu MEOGRT. Ta struktura kontrprób pozostaje niezmieniona w całym okresie rozwoju organizmów użytych do badań w pokoleniu F1 (oraz pokoleniu F2, do momentu wylęgu). W stadium dorosłym, podczas ustanawiania par hodowlanych w pokoleniu F1, liczba kontrprób z parami hodowlanymi na zabieg powinna optymalnie zostać podwojona; dlatego istnieje do 12 par kontrprób w każdym zabiegu z użyciem badanej substancji chemicznej oraz 24 pary kontrprób w grupie kontrolnej (i w razie potrzeby kolejne 24 pary kontrprób w próbie kontrolnej z rozpuszczalnikiem). Określenia wylęgu zarodków pochodzących z tarła par z pokolenia F1 dokonuje się na podstawie takiej samej struktury kontrprób jak w przypadku zarodków pochodzących z tarła par z pokolenia F0, tzn. początkowo sześć kontrprób na zabieg z użyciem badanej substancji chemicznej i 12 kontrprób w grupie kontrolnej lub w grupach kontrolnych.

Dodatek 8

ZLICZANIE BRODAWEK PŁETWY ODBYTOWEJ

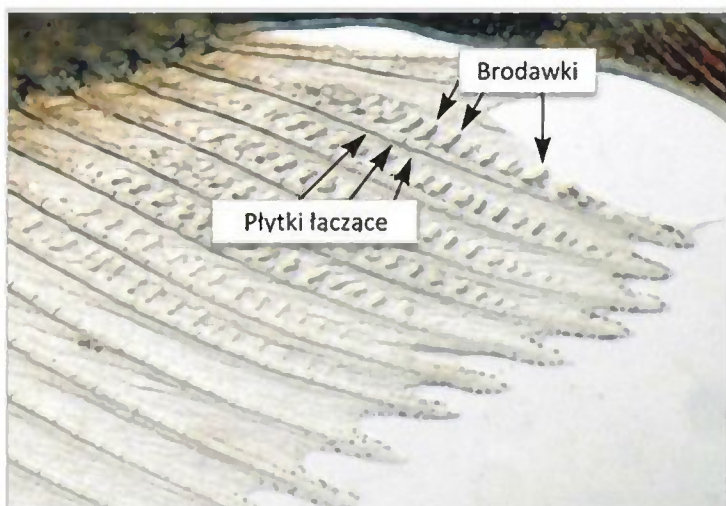
Główne materiały i odczynniki

- Mikroskop stereoskopowy (z dołączoną opcjonalną kamerą)
- Utrwalacz (np. utrwalacz Davidsona (nie zaleca się stosowania utrwalacza Bouina)), jeżeli nie prowadzi się zliczania na podstawie obrazowania

Procedury

Po autopsji należy zobrazować płetwę odbytową, aby umożliwić wygodne zliczanie jej brodawek. Chociaż zliczanie na podstawie obrazowania jest zalecaną metodą, płetwę odbytową można utrwalić stosując przez około minutę utrwalacz Davidsona lub inny odpowiedni utrwalacz. Istotne jest, aby w trakcie utrwalania płetwę odbytową trzymać w pozycji płaskiej, co ułatwi zliczanie brodawek. Ciała posiadające płetwę odbytową można do czasu analizy przechowywać w utrwalaczu Davidsona lub innym odpowiednim utrwalaczu. Należy zliczyć liczbę płytek łączących (zob. rys. 1) zawierających brodawki, które wystają z tylnego obrzeża płytki łączącej.

Rys. 1: Brodawki płetwy odbytowej



Dodatek 9

SZCZEGÓŁOWY HARMONOGRAM BADANIA MEOGRT

Tygodnie badania 1–3 (F0)

Ryby w okresie tarła z pokolenia F0, które spełniły kryteria kwalifikacji (zob. pkt 16–20), aby umożliwić rozwój gamet i tkanek gonad, są przez trzy tygodnie narażane na działanie badanej substancji chemicznej. W każdym skopiowanym zbiorniku mieści się jedna para hodowlana ryb (para hodowlana samica XX – samiec XY). Przez 21 kolejnych dni, poczynając od 1. dnia badania, złożone jaja zbiera się, liczy i ocenia pod kątem płodności.

Tydzień badania 4 (pokolenia F0 i F1)

Najlepiej, jeżeli zapłodnione i żywotne jaja (zarodki) zbiera się jednego dnia; jeżeli jednak liczba zarodków jest niewystarczająca, należy je zebrać w ciągu dwóch dni. Jeżeli zbiera się je w ciągu dwóch dni, wszystkie zarodki w ramach zabiegu, które zebrano pierwszego dnia, są łączone z zarodkami zebranymi drugiego dnia. Następnie wszystkie połączone zarodki z każdego zabiegu losowo rozdziela się do każdego inkubatora kontrpróby po 20 zarodków na inkubator. Śmiertelność zapłodnionych jaj (zarodków) sprawdza się i odnotowuje codziennie. Martwe jaja usuwa się z inkubatorów (śmierć zapłodnionych jaj można wykryć, w szczególności we wczesnych stadiach, poprzez znaczącą utratę przezroczystości i zmianę zabarwienia spowodowaną koagulacją lub strącaniem białek, przez co jaja stają się białe i nieprzezroczyste; OECD nr 210).

Uwaga: Jeżeli pojedynczy zabieg wymaga drugiego dnia zbiorów, wszystkie zabiegi (w tym próby kontrolne) należy poddać tej procedurze. W przypadku gdy po drugim dniu zbiorów liczba zarodków na zabieg jest niewystarczająca i nie pozwala na rozmieszczenie 20 zarodków na inkubator, należy wówczas zmniejszyć liczbę zarodków rozmieszczonych w ramach tego konkretnego zabiegu do 15 zarodków na inkubator. Jeżeli nie ma wystarczającej liczby zarodków, aby rozmieścić je po 15 na inkubator, należy wówczas zmniejszyć liczbę inkubatorów do takiej, przy której wystarczy zarodków do rozmieszczenia po 15 na inkubator. Ponadto w pokoleniu F0 można dodać więcej par hodowlanych na zabieg i próby kontrolne, aby wytworzyć więcej jaj i osiągnąć zalecane 20 jaj na kontrpróbę.

W 24. dniu badania pary hodowlane z pokolenia F0 uśmierca się w sposób humanitarny i odnotowuje się ich masę i długość. W razie potrzeby pary hodowlane z pokolenia F0 można utrzymać przez dodatkowe 1–2 dni, aby ponownie ustanowić pokolenie F1.

Tygodnie badania 5–6 (F1)

Dzień do dwóch dni przed przewidywanym rozpoczęciem wylęgu należy zaprzestać poruszania inkubowanymi jajami lub ograniczyć je, aby usprawnić wylęg. Z uwagi na fakt, że zarodki wykluwają się każdego dnia, narybek łączy się według zabiegu i systematycznie przenosi do każdego zbiornika zawierającego kontrpróbę z larwami w ramach konkretnego

zabiegu i w ilości nie większej niż 12 osobników z wylęgu. Dokonuje się tego poprzez losowy wybór narybku i umieszczenie pojedynczych osobników w następujących po sobie kontrpróbach w losowym pobieraniu, przechodząc w ten sposób przez poszczególne kontrpróby poddane zabiegowi, aż do momentu, gdy wszystkie kontrpróby w ramach zabiegu będą miały zawierały 12 osobników z wylęgu. Jeżeli liczba osobników w wylęgu nie jest wystarczająca, by wypełnić wszystkie kontrpróby, należy wówczas dopilnować, aby jak najwięcej kontrprób posiadało 12 osobników z wylęgu w celu ustanowienia pokolenia F1.

Jaja, z których w czasie będącym dwukrotnością mediany dnia wylęgu w próbie kontrolnej nie wykluły się młode, uznaje się za niezdolne do życia i odrzuca. Liczbę osobników z wylęgu rejestruje się, a w każdej kontrpróbie wylicza się skuteczność wylęgu (wylęgowość).

Tygodnie badania 7–11 (F1)

Przeżywalność ryb w fazie larwalnej w przypadku wszystkich kontrprób sprawdza się i odnotowuje codziennie. W 43. dniu badania odnotowuje się liczbę ryb, które przeżyły w każdej kontrpróbie, a także początkową liczbę narybku umieszczonego w kontrpróbie (nominalnie dwanaście). Pozwala to na obliczenie odsetka przeżywalności od wylęgu do stadium niepełnej dojrzałości.

Tygodnie badania (F1)

W dniach badania 78–85 pobiera się niewielką próbkę z płetwy ogonowej każdej ryby, aby określić płć genetyczną osobnika (np. znakowanie przez obcinanie płetw) w odniesieniu do wszystkich ryb. Informacje te wykorzystywane są do ustanawiania par hodowlanych.

W ciągu trzech dni od określenia płci genetycznej, ustanawia się losowo 12 par hodowlanych na zabieg i 24 pary hodowlane na próbę kontrolną. Z każdej kontrpróby wybiera się losowo dwie ryby XX i dwie ryby XY i łączy według płci, a następnie ryby wybiera się losowo w celu ustanowienia pary hodowlanej (np. para XX-XY). Wykorzystując jedną parę hodowlaną na kontrpróbę, ustanawia się co najmniej 12 kontrprób na zabieg oraz 24 kontrpróby w odniesieniu do próby kontrolnej. Jeżeli kontrpróba nie zawiera dwóch ryb posiadających chromosomy XX albo XY, które można połączyć, wówczas z innych kontrprób w ramach zabiegu należy pozyskać rybę z odpowiednim genotypem płci.

Pozostałe ryby (maksimum 8 ryb na kontrpróbę) uśmierca się w sposób humanitarny i pobiera się z nich próbki pod kątem zbadania punktów końcowych osobników nie w pełni dojrzałych. Dane *dmy* (XX lub XY) dotyczące wszystkich próbek osobników nie w pełni dojrzałych zachowuje się w celu zapewnienia, aby wszystkie dane dotyczące punktów końcowych odnosiły się do płci genetycznej każdej pojedynczej ryby.

Tygodnie badania 13–14 (F1)

Narażenie kontynuuje się, gdy nie w pełni dojrzałe pary hodowlane przekształcają się w osobniki dorosłe. W 98. dniu badania (tj. w dniu przed rozpoczęciem zbierania jaj) jaja usuwa się zarówno z akwariów, jak i z samic.

Tygodnie badania 15–17 (F1)

Złożone jaja pobiera się codziennie przez 21 kolejnych dni w każdej próbie i ocenia pod względem potencjału reprodukcyjnego i płodności.

Tydzień badania 18 (powtórzenie tygodnia badania 4) (F1 i F2)

Rano 120. dnia badania jaja są zbierane z każdego zbiornika kontrpróby. Zebrane jaja poddaje się ocenie, a zapłodnione jaja (po usunięciu włókien) każdej pary hodowlanej są łączone według zabiegu i systematycznie rozdzielane do komór inkubacyjnych z jajami po 20 zapłodnionych jaj na inkubator. Inkubatory można umieścić w oddzielnych „zbiornikach inkubatorów” zakładanych dla każdego zabiegu lub w zbiorniku z kontrpróbą, w którym po wylęgu znajdują się wyklute larwy. Najlepiej zbierać zarodki jednego dnia; jeżeli jednak nie ma wystarczającej liczby zarodków, można je zebrać w ciągu dwóch dni. W przypadku gdy są zbierane w ciągu dwóch dni, wszystkie zarodki poddane działaniu substancji, które zebrano pierwszego dnia, są łączone z zarodkami zebranymi drugiego dnia. Następnie wszystkie połączone zarodki z każdego zabiegu losowo rozdziela się do każdego inkubatora kontrpróby po 20 zarodków na inkubator. Uwaga: Jeżeli pojedynczy zabieg wymaga drugiego dnia zbiorów, wszystkie zabiegi (w tym próby kontrolne) należy poddać tej procedurze. W przypadku gdy po drugim dniu zbierania zarodków liczba zarodków przypadających na zabieg nie jest odpowiednia, aby rozmieścić je po 20 na inkubator, należy zmniejszyć liczbę zarodków rozmieszczonych w ramach tego konkretnego zabiegu do 15 zarodków na inkubator. W przypadku gdy nie ma wystarczającej liczby zarodków, aby rozmieścić je po 15 na inkubator, należy zmniejszyć liczbę inkubatorów z kontrpróbą do takiej, przy której liczba zarodków wystarczy do rozmieszczenia po 15 na inkubator.

121. dnia badania (lub 122. dnia badania, aby zapewnić prawidłowe rozpoczęcie F2), pary hodowlane F1 humanitarnie się uśmierca i bada pod kątem punktów końcowych osobników dorosłych. W razie potrzeby pary hodowlane F1 można utrzymać przez dodatkowe 1–2 dni, aby wznowić F2.

Tygodnie badania 19–20 (F2)

Dzień do dwóch dni przed przewidywanym rozpoczęciem wylęgu należy zaprzestać poruszania inkubowanymi jajami lub ograniczyć je, aby usprawnić wylęg. W przypadku gdy badanie kończy się wylęgiem F2, każdego dnia młody narybek liczy się i usuwa. (Zarodki, z których nie wylęgl się narybek po przedłużonym czasie inkubacji, definiowanym jako dwukrotność mediany dnia wylęgu w próbie kontrolnej, uznaje się za niezdolne do życia).

Dodatek 10

ANALIZA STATYSTYCZNA

Rodzaje danych biologicznych uzyskanych przy pomocy MEOGRT nie są dla niego niepowtarzalne i, z wyjątkiem danych dotyczących patologii, opracowano wiele odpowiednich metod statystycznych w celu właściwej analizy podobnych danych w zależności od ich charakterystyki, w tym normalności, jednorodności wariancji, tego, czy projekt badania nadaje się do testowania hipotez lub analizy regresji, testów parametrycznych i nieparametrycznych itp. Zasadniczo sugerowane analizy statystyczne są zgodne z zaleceniami OECD dotyczącymi danych na temat ekotoksyczności (OECD 2006), a schemat decyzyjny dotyczący analizy danych MEOGRT przedstawiono na rys. 2.

Zakłada się, że najczęściej zbiory danych będą wykazywały reakcje monotoniczne. Ponadto należy rozważyć kwestię użycia jednostronnego testu statystycznego w porównaniu z dwustronnym testem statystycznym. Zaleca się użycie testu jednostronnego, o ile nie istnieje uzasadnienie biologiczne, które sprawia, że test jednostronny jest nieodpowiedni. Chociaż w niniejszej sekcji zaleca się pewne testy statystyczne, jeżeli opracowane zostaną bardziej odpowiednie lub silniejsze metody statystyczne do stosowania w odniesieniu do konkretnych danych uzyskanych przy użyciu MEOGRT, należy używać tych testów statystycznych w celu wykorzystania tych przewag.

Dane MEOGRT należy analizować oddzielnie dla każdej płci genetycznej. Istnieją dwie strategie analizy danych dotyczących ryb o odwróconej płci (albo samców XX, albo samic XY). 1) Można usunąć dane dotyczące ryb o odwróconej płci z całego testu oprócz częstości występowania odwróconej płci w każdej kontrpróbie. 2) Można zostawić dane dotyczące wszystkich ryb o odwróconej płci w zbiorze danych i przeprowadzić analizę na podstawie genotypu.

Dane histopatologiczne

Dane histopatologiczne zgłasza się w postaci stopni nasilenia zmian, ocenianych przy pomocy nowo opracowanej procedury statystycznej, testu Rao-Scotta Cochrane'a-Armitage'a by Slices (RSCABS) (Green *et al.*, 2014). Poprawka Rao-Scotta zachowuje informacje dotyczące powtórzeń testu; procedura *by Slices* uwzględnia przewidywanie biologiczne, że stopień nasilenia zmian zazwyczaj rośnie wraz z rosnącym badanym stężeniem. Dla każdej diagnozy wynik RSCABS określa, które zabiegi mają wyższą częstość występowania patologii niż próby kontrolne i związany z nimi poziom nasilenia.

Dane dotyczące potencjału reprodukcyjnego

Analizy danych dotyczących potencjału reprodukcyjnego obejmują test regresyjny Jonckheere'a-Terpstra lub Williamsa, aby określić efekty poddania działaniu substancji, pod warunkiem że dane są zgodne z monotoniczną zależnością stężenie-odpowiedź. Przy pomocy testu regresyjnego dokonuje się wszystkich porównań na poziomie istotności 0,05, nie biorąc poprawki na liczbę porównań. Zakłada się spójność danych z monotoniczną

zależnością stężenie-odpowiedź, ale można to zweryfikować albo przy pomocy kontroli wzrokowej danych, albo przy pomocy konstrukcji liniowych i kwadratowych kontrastów średnich zabiegu po uszeregowaniu danych według kategorii. Test trendu uznaje się za wykonany, chyba że kontrast kwadratowy jest istotny, a kontrast liniowy nie. W pozostałych przypadkach do określenia efektów zabiegu używa się testu Dunnetta, jeżeli dane mają rozkład normalny o jednorodnej wariancji. Jeżeli te wymogi nie są spełnione, używa się testu Dunna z poprawką Bonferroni-Holma. Wszystkie wskazane testy przeprowadza się niezależnie od dowolnego ogólnego testu F lub testu Kruskala-Wallisa. Szczegółowe informacje można znaleźć w OECD 2006.

Można wykorzystywać metody alternatywne, takie jak uogólniony model liniowy z błędami Poissona dla liczby jaj (bez transformacji), jeżeli jest to uzasadnione statystycznie (Cameron i Trividi, 2013). W przypadku użycia metody alternatywnej, zaleca się skorzystanie z doradztwa statystycznego.

Codzienne zliczanie jaj przy jednym pokoleniu

Model ANOVA wyznacza się następująco: $Y = \text{Czas} * \text{Czas} + \text{Zabieg} + * \text{Zabieg} + \text{Czas} * \text{Zabieg} + * \text{Czas} * \text{Zabieg}$, przy efektach losowych: Kontrpróba (Pokolenie * Zabieg) i Czas * Kontrpróba (Zabieg), dopuszczając nierówne komponenty wariancyjne obu rodzajów u wszystkich pokoleń. Czas oznacza tutaj częstotliwość zliczania jaj (np. dzień lub tydzień). Jest to analiza polegająca na powtarzaniu pomiarów, w której korelacje między obserwacjami tych samych kontrprób stanowią przyczynę pomiarowo powtarzalnego charakteru danych.

Efekty główne zabiegu sprawdza się przy pomocy testu Dunnetta (lub Dunnetta-Hsu), w którym uwzględnia się liczbę porównań. Należy uwzględnić efekt główny pokolenia lub czasu, ponieważ przy tych dwóch czynnikach nie istnieje poziom kontrolny, a każda para poziomów stanowi potencjalnie poszukiwane porównanie. W odniesieniu do tych dwóch efektów głównych, w przypadku gdy test F dla efektu głównego jest istotny na poziomie 0,05, wtedy porównania tego czynnika w parach na wszystkich poziomach tego czynnika mogą być testowane na poziomie 0,05 bez dodatkowej korekty.

Model obejmuje interakcje dwóch i trzech czynników, aby efekt główny, np. dla czasu, nie był istotny, pomimo istotnego wpływu czasu na wyniki. Dlatego jeżeli interakcja dwóch lub trzech czynników obejmująca czas jest istotna na poziomie 0,05, wtedy porównania ilości czasu na poziomie istotności 0,05 można przyjąć bez dodatkowej korekty.

Następne są testy F istotności zabiegu w czasie, tzw. części w tabeli ANOVA. Jeżeli na przykład część obejmująca pokolenie F1 i czas 12 jest istotna na poziomie 0,05, porównania par dla zabiegu obejmującego pokolenie F1 i czas 12 można przyjąć na poziomie istotności 0,05 bez dodatkowej korekty. Podobne twierdzenia mają zastosowanie względem testów czasu obejmujących F1 i zabieg oraz pokolenia w czasie i poddanego zabiegowi.

Ponadto w przypadku porównań nie należących do żadnej z powyższych kategorii należy uwzględnić korektę Bonferroni-Holma dotyczącą wartości p. Szczegółowe informacje

na temat analizy powyższych modeli znajdują się w Hocking (1985) oraz Hochberg i Tamhane (1987).

Alternatywnie surowe dane są odnotowywane i prezentowane w sprawozdaniu z badań jako potencjał reprodukcyjny (liczba jaj) na kontrpróbę na dzień. Należy obliczyć średnią kontrpróby surowych danych, a następnie zastosować przekształcenie pierwiastka kwadratowego. Jednoczynnikową ANOVA średnich kontrprób po przekształceniu należy obliczać zgodnie z kontrastami Dunnetta. Pomocna może się okazać także kontrola wzrokowa danych dotyczących potencjału reprodukcyjnego przy każdym zabiegu lub kontrpróbie przy pomocy wykresu punktowego, pokazującego dane w czasie. Umożliwi to nieformalną ocenę potencjalnych efektów w czasie.

Wszystkie pozostałe dane biologiczne

Analizy statystyczne oparte są na podstawowym założeniu, że przy odpowiednim doborze dawki dane będą monotoniczne. Dlatego zakłada się, że dane są monotoniczne i są formalnie badane pod kątem monotoniczności przy użyciu kontrastów liniowych i kwadratowych. W przypadku gdy dane są monotoniczne, zaleca się przeprowadzenie testu Jonckheere'a-Terpstra na trendzie median kontrpróby (zgodnie z zaleceniami OECD 2006). Jeżeli kontrast kwadratowy jest istotny, a kontrast liniowy nie, dane uznaje się za niemonotoniczne.

W przypadku gdy dane nie są monotoniczne, w szczególności z powodu obniżonej reakcji jednego lub dwóch zabiegów o najwyższych wartościach, należy rozważyć zredukowanie zbioru danych tak, aby przeprowadzić analizę bez tych zabiegów. Decyzję należy podjąć, uwzględniając fachową opinię i wszystkie dostępne dane, szczególnie te wskazujące na widoczną toksyczność na tych poziomach zabiegów.

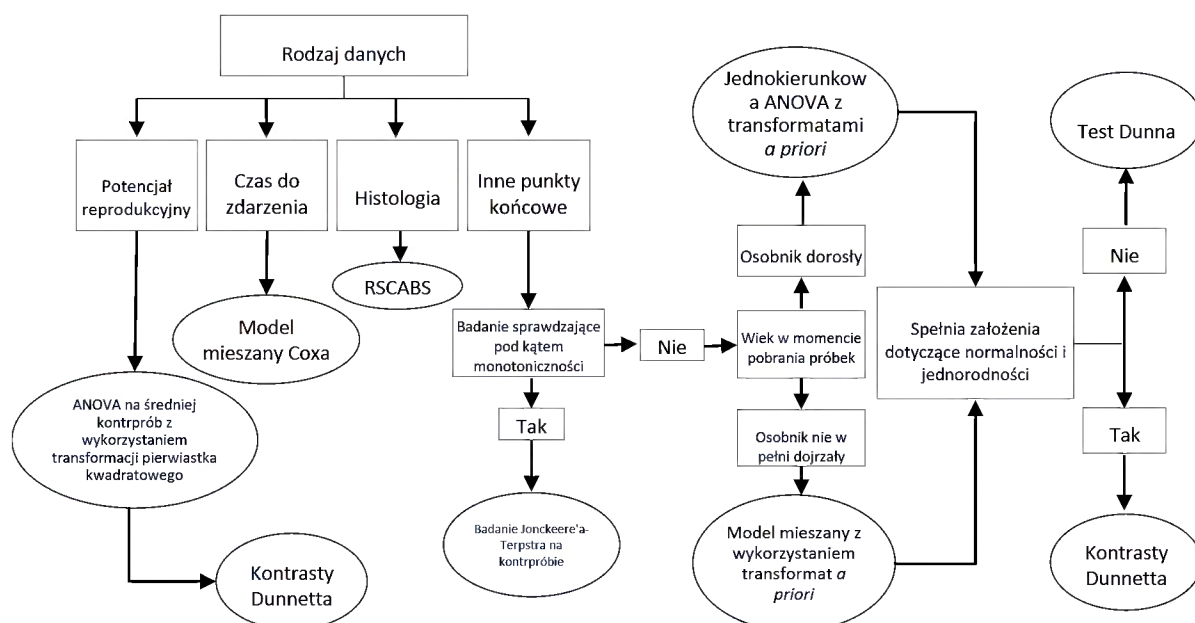
W odniesieniu do masy i długości nie zaleca się transformacji, chociaż sporadycznie mogą być one wskazane. Zaleca się jednak transformację logarytmiczną danych dotyczących witellogeniny; zaleca się transformację pierwiastka kwadratowego danych dotyczących SSC (brodawek płetwy odbytowej); zaleca się przekształcenie pierwiastkowe i arcsin danych dotyczących proporcjonalnego wylęgu, procentowego przeżycia, proporcji płci i procentu płodnych jaj. Czas do wylęgu i czas do pierwszego tarła należy traktować jako dane dotyczące czasu do wystąpienia wydarzenia, przy czym pojedyncze zarodki, które nie wylęgły się w określonym czasie, lub kontrpróby, w których nigdy nie doszło do tarła, traktowane są jako dane ucięte prawostronnie. Czas do wylęgu należy obliczać z mediany dnia wylęgu każdej kontrpróby. Powyższe punkty końcowe należy analizować przy użyciu modelu mieszanego proporcjonalnego hazardu Coxa.

Dane biologiczne z próbek osobników dorosłych obejmują jeden pomiar na kontrpróbę, tj. w akwarium z kontrpróbą utrzymuje się jedną rybę XX i jedną rybę XY. W związku z tym zaleca się przeprowadzenie jednoczynnikowej ANOVA na średnich kontrprób. W przypadku gdy spełnione są założenia ANOVA (normalność i jednorodność wariancji ocenione na podstawie reszt z ANOVA odpowiednio przy użyciu testu Shapiro-Wilksa i testu Levene'a), należy użyć kontrastów Dunnetta do określenia zabiegów, które różniły się

od próby kontrolnej. Z drugiej strony, jeżeli założenia ANOVA nie są spełnione, należy przeprowadzić test Dunna, aby określić, które zabiegi różniły się od próby kontrolnej. Podobną procedurę zaleca się względem danych ujętych w formie procentów (płodność, wylęg i przeżywalność).

Dane biologiczne otrzymane z próbek osobników nie w pełni dojrzałych obejmują 1–8 pomiarów na kontrpróbę, tj. liczby osobników, na podstawie których oblicza się średnią kontrpróby dla każdej płci genetycznej, mogą być zmienne. Dlatego zaleca się wykorzystanie kontrastów Dunnetta po użyciu mieszanego modelu ANOVA, jeżeli spełniono założenia normalności i jednorodności wariancji (w odniesieniu do reszt mieszanego modelu ANOVA). Jeżeli nie zostały one spełnione, należy przeprowadzić test Dunna, aby określić, które zabiegi różniły się od próby kontrolnej.

Rys. 2: Schemat działań do analizy danych MEOGRT dla zalecanych procedur statystycznych.



Bibliografia

- (1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (załączniki do tej publikacji stanowią osobny dokument). Paryż: OECD Publishing.
- (2) Cameron AC i 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 i Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

C.53 TEST WZROSTU I ROZWOJU PŁAZÓW W STADIUM LARWALNYM (LAGDA)

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 241 (2015). Konieczność opracowania i walidacji testu umożliwiającego określenie i opisanie niekorzystnych skutków narażenia płazów na działanie toksycznych substancji chemicznych wynika z obawy, że środowiskowe poziomy substancji chemicznych mogą wywoływać działania niepożądane zarówno u ludzi, jak i zwierząt wolno żyjących. W wytycznej OECD dotyczącej testu wzrostu i rozwoju płazów w stadium larwalnym (LAGDA) opisano badanie toksyczności z udziałem gatunku płazów, w ramach którego analizuje się wzrost i rozwój od momentu zapłodnienia do wczesnego etapu młodocianego stadium życia. W teście tym (trwającym zazwyczaj 16 tygodni) ocenia się rozwój na wczesnym etapie, przeobrażenie, przeżywalność, wzrost i częściową dojrzałość płciową. Umożliwia on również pomiar wszystkich pozostałych punktów końcowych, co pozwala na przeprowadzenie oceny diagnostycznej substancji, co do których podejrzewa się, że mogą zaburzać funkcjonowanie układu hormonalnego, lub innych typów substancji toksycznych zaburzających funkcjonowanie układu rozrodczego i rozwój. Sposób opisany w niniejszej metodzie badawczej wywodzi się z prac walidacyjnych dotyczących płaty szponiastej (łac. *Xenopus laevis*), przeprowadzonych przez Agencję Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (EPA) przy wsparciu Japonii (1). Mimo że inne gatunki płazów można przystosować do protokołu badania wzrostu i rozwoju, którego ważnym elementem jest możliwość określenia płci genetycznej, konkretne metody i punkty końcowe obserwacji wyszczególnione w niniejszej metodzie badawczej mają zastosowanie wyłącznie do płaty szponiastej.
2. Test LAGDA jest dotyczącym płazów badaniem wyższego rzędu, które stosuje się do pozyskania bardziej wyczerpujących informacji na temat szkodliwych skutków w kontekście zależności stężenie-odpowiedź i które jest odpowiednie do określenia i opisanego zagrożeń oraz do oceny ryzyka dla środowiska. Test wpasowuje się w poziom 4 ram koncepcyjnych OECD w zakresie badania i oceny substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego (ang. OECD *Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters*), gdzie testy *in vivo* również dostarczają danych na temat działań niepożądanych dotyczących punktów końcowych istotnych pod względem hormonalnym (2). Ogólny schemat doświadczalny obejmuje narażenie zarodków płaty szponiastej w 8.–10. stadium według Nieuwkoopa i Fabera (NF) (3) na działanie co najmniej czterech różnych stężeń badanej substancji chemicznej (zazwyczaj w odstępach co najmniej półlogarytmicznych) oraz próbę kontrolną (próby kontrole) do upływu 10 tygodni po medianie czasu potrzebnego do osiągnięcia 62. stadium według

Nieuwkoop i Fabera w próbie kontrolnej, jak również jedną podpróbę pobieraną w trakcie trwania badania po osiągnięciu 62. stadium według Nieuwkoop i Fabera (≤ 45 dni po zapłodnieniu; zazwyczaj około 45 dnia po zapłodnieniu). W odniesieniu do każdego badanego stężenia przygotowuje się cztery kontrpróby, a próba kontrolna zawiera osiem kontrprób. Punkty końcowe oceniane podczas narażania (podczas pobierania podpróbki w trakcie trwania badania i pobierania próbki końcowej na zakończenie badania) obejmują punkty końcowe wskazujące na toksyczność ogólną: śmiertelność, nietypowe zachowanie i oznaczenia wzrostu (długość i masa), a także punkty końcowe mające charakteryzować określone sposoby działania toksycznego na układ hormonalny ukierunkowane na procesy fizjologiczne pośredniczone przez estrogen, androgen lub tarczycę. W metodzie tej główny nacisk kładzie się na potencjalne skutki istotne dla populacji (takie jak niekorzystny wpływ na przeżywalność, rozwój, wzrost i rozrodczość), aby obliczyć stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC), lub stężenie efektywne powodujące zmianę mierzonego punktu końcowego o $x\%$ (EC_x). Należy jednak zaznaczyć, że metody oparte na EC_x rzadko są odpowiednie w przypadku dużych badań tego rodzaju, w których zwiększenie liczby badanych stężeń w celu umożliwienia określenia pożądanego EC_x może być niepraktyczne. Należy również zaznaczyć, że metoda ta nie obejmuje samego etapu rozmnażania. Definicje stosowane w niniejszej metodzie badawczej przedstawiono w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

3. Ze względu na ograniczoną liczbę badanych substancji chemicznych i laboratoriów zaangażowanych w walidację tego dość złożonego testu, szczególnie ze względu na niedokumentowaną dotychczas odtwarzalność międzylaboratoryjną przy użyciu danych doświadczalnych, przewiduje się, że gdy dostępna liczba badań będzie wystarczająca, aby ustalić wpływ tego nowego projektu badania, wówczas dotycząca badań wytyczna OECD nr 241 zostanie poddana przeglądowi i w razie potrzeby zmieniona w świetle zdobytych doświadczeń. Badanie LAGDA jest ważnym testem mającym na celu zwrócenie uwagi na potencjalne przyczyny spadku liczebności populacji płazów poprzez ocenę efektów narażenia na działanie substancji chemicznej w czasie wrażliwego stadium larwalnego, podczas którego wpływ na przeżywalność i rozwój, w tym normalny rozwój narządów płciowych, może mieć negatywne skutki dla populacji.
4. Badanie opracowano w celu wykrycia szczytowego punktu końcowego (punktów końcowych) wynikającego z funkcjonowania zarówno mechanizmu hormonalnego, jak i mechanizmów innych niż hormonalne, i obejmuje diagnostyczne punkty końcowe, które są częściowo charakterystyczne dla kluczowych zmian hormonalnych. Należy zaznaczyć, że przed opracowaniem badania LAGDA nie istniał żaden zweryfikowany test spełniający tę funkcję w odniesieniu do płazów.

5. Ważne jest, aby przed rozpoczęciem testu posiadać informacje o właściwościach fizykochemicznych badanej substancji chemicznej, w szczególności aby możliwe było tworzenie stabilnych roztworów chemicznych. Należy również posiadać odpowiednio czułą metodę analityczną na potrzeby weryfikacji stężeń badanych substancji chemicznych. Aby zapewnić wystarczającą moc testu na potrzeby oceny punktów końcowych istotnych dla populacji, takich jak wzrost, rozwój i dojrzałość płciowa, do testu (trwającego około 16 tygodni) potrzeba łącznie 480 zwierząt, tj. zarodków płatany szponiastej (lub 640 zarodków, jeżeli stosowana jest próba kontrolna z rozpuszczalnikiem).
6. Przed zastosowaniem metody badawczej w badaniu regulacyjnym mieszaniny należy zastanowić się nad tym, czy wyniki uzyskane w wyniku jej stosowania będą możliwe do zaakceptowania w odniesieniu do założonego celu regulacyjnego. Ponadto w niniejszym teście nie ocenia się bezpośrednio potencjału reprodukcyjnego, dlatego jest możliwe, że nie będzie można go zastosować na etapie bardziej zaawansowanym niż poziom 4 ram koncepcyjnych OECD w zakresie badania i oceny substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego.

PODSTAWA NAUKOWA METODY BADAWCZEJ

7. Znaczną część naszej obecnej wiedzy dotyczącej biologii płazów uzyskano przy użyciu laboratoryjnego gatunku modelowego, płatany szponiastej. Gatunek ten można rutynowo hodować w laboratorium, owulację można wywołać przy pomocy ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (hCG), a stada zwierząt są łatwo dostępne u hodowców komercyjnych.
8. Rozmnażanie płazów, jak wszystkich kręgowców, jest kontrolowane przez oś podwzgórze–przysadka–gonady (HPG) (4). Estrogeny i androgeny są przekaźnikami tego układu hormonalnego – ukierunkowują rozwój i fizjologię tkanek wykazujących dymorfizm płciowy. Można wyróżnić trzy etapy cyklu życia płazów, na których przedmiotowa oś jest wyjątkowo aktywna: 1) różnicowanie gonad podczas rozwoju w stadium larwalnym, 2) rozwój drugorzędowych cech płciowych i dojrzewanie gonad w stadium młodocianym oraz 3) funkcjonalne rozmnażanie osobników dorosłych. Każde z tych trzech okien rozwojowych może być podatne na zaburzenia hormonalne powodowane przez niektóre substancje chemiczne, takie jak estrogeny i androgeny, co ostatecznie prowadzi do utraty zdolności do rozmnażania przez te organizmy.
9. Rozwój gonad rozpoczyna się w 43. stadium według Nieuwkoopa i Fabera, w którym rozpoczyna się rozwój bipotencjalnych zawiązków gonad. Różnicowanie gonad rozpoczyna się w 52. stadium według Nieuwkoopa i Fabera, kiedy komórki prapłciowe migrują do tkanki rdzeniowej (samce) albo pozostają w okolicy korowej (samice) rozwijających się gonad (3). Pierwsze zgłoszenie dotyczące podatności procesu różnicowania płciowego gonad na zmiany w wyniku działania substancji chemicznych u

rodzaju *Xenopus* miało miejsce w latach 50. XX wieku (5)(6). Narażenie kijanek na działanie estradiolu w okresie różnicowania gonad powoduje odwrócenie płci u samców, które w momencie osiągnięcia dorosłości są w pełni funkcjonalnymi samicami (7)(8). Możliwe jest również funkcjonalne odwrócenie płci u samic (przekształcenie w samce), co zgłoszono po wszczepieniu kijance tkanki jądra (9). Mimo że narażenie na działanie inhibitora aromatazy powoduje funkcjonalne odwracanie płci również u afrykańskiej żaby szponiastej (*X. tropicalis*) (10), nie wykazano, że występuje ono u płatany szponiastej. W przeszłości toksyczne oddziaływanie na różnicowanie gonad oceniano poprzez badanie histologiczne gonad na etapie przeobrażenia, a odwrócenie płci stwierdzano jedynie na podstawie analizy proporcji płci. Do niedawna nie było możliwości bezpośredniego określenia płci genetycznej osobników z rodzaju *Xenopus*. Niedawne określenie markerów związanych z płcią u płatany szponiastej umożliwia jednak określenie płci genetycznej i bezpośrednią identyfikację zwierząt o odwróconej płci (11).

10. U samców rozwój w stadium młodocianym postępuje wraz ze wzrostem poziomu testosteronu we krwi, który odpowiada za rozwój drugorzędowych cech płciowych oraz rozwój jąder. U samic jajniki produkują estradiol, co powoduje pojawienie się witellogeniny (VTG) w osoczu, witelogennych oocytów w jajniku i rozwój jajowodów (12). Jajowody stanowią żeńskie drugorzędowe cechy płciowe, które odgrywają swoją rolę w procesie dojrzewania oocytów podczas rozmnażania. Osłonka galaretowata otacza zewnętrzną część oocytów, gdy przechodzą one przez jajowód i gromadzą się w pęcherzyku jajnikowym, gotowe do zapłodnienia. Estrogeny zdają się regulować rozwój jajowodów, ponieważ jest on skorelowany z poziomem estradiolu we krwi u płatany szponiastej (13) i afrykańskiej żaby szponiastej (12). Odnotowano rozwój jajników u samców po narażeniu na działanie związków polichlorowanego bifenyli (14) i 4-tert-oktylofenolu (15).

ZASADA BADANIA

11. Projekt badania obejmuje narażenie drogą wodną zarodków płatany szponiastej w 8.–10. stadium według Nieuwkoopa i Faberana na działanie czterech różnych stężeń badanej substancji chemicznej oraz próbę kontrolną (próby kontrolne) do upływu 10 tygodni po medianie czasu potrzebnego do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera w próbie kontrolnej, jak również jedną podpróbę pobieraną w trakcie trwania badania po osiągnięciu 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera. Chociaż dawkowanie substancji chemicznych o silnych właściwościach hydrofobowych jest również możliwe drogą pokarmową, dotychczasowe doświadczenie w stosowaniu tej drogi narażenia w niniejszym teście jest niewielkie. W odniesieniu do każdego badanego stężenia przygotowuje się cztery kontrpróby, a każda wykorzystana próba kontrolna zawiera osiem kontrprób. Punkty końcowe oceniane w trakcie narażenia obejmują punkty wskazujące na toksyczność ogólną

(tj. śmiertelność, nietypowe zachowanie i oznaczenia wzrostu (długość i masa)), jak również punkty końcowe mające charakteryzować określone sposoby działania toksycznego na układ hormonalny ukierunkowane na procesy fizjologiczne pośredniczone przez estrogen, androgen lub tarczycę (tj. histopatologia tarczycy, histopatologia gonad i nasieniowodów, nietypowy rozwój, witellogenina w osoczu (opcjonalnie) oraz genotypowe/fenotypowe proporcje płci).

KRYTERIA WAŻNOŚCI BADANIA

12. Zastosowanie mają następujące kryteria ważności badania:

- stężenie rozpuszczonego tlenu powinno wynosić ≥ 40 % wartości nasycenia powietrzem w trakcie badania;
- temperatura wody powinna mieścić się w zakresie 21 ± 1 °C, a różnice między kontrpróbami i między zabiegami nie powinny przekraczać 1,0 °C;
- pH badanego roztworu należy utrzymać w przedziale 6,5–8,5, a różnice między kontrpróbami i między zabiegami nie powinny przekraczać 0,5;
- powinny być dostępne dowody pozwalające wykazać, że stężenia badanej substancji chemicznej w roztworze utrzymano w granicach ± 20 % średnich wartości pomiarowych;
- śmiertelność w okresie narażenia powinna wynosić ≤ 20 % w każdej kontrpróbie w próbach kontrolnych;
- żywotność tarła wybranego do rozpoczęcia badań powinna wynosić ≥ 70 %;
- mediana czasu potrzebnego do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera powinna wynosić ≤ 45 dni;
- średnia masa organizmów użytych do badań w 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera i na zakończenie testu w próbach kontrolnych i próbach kontrolnych z rozpuszczalnikiem (jeżeli są stosowane) powinna wynosić odpowiednio $1,0 \pm 0,2$ i $11,5 \pm 3$ g.

13. Chociaż kryterium to nie stanowi kryterium ważności, zaleca się, aby do analizy dostępne były co najmniej trzy poziomy zabiegu z trzema niezakłóconymi kontrpróbami. Nadmierną śmiertelność, która zakłóca zabieg, definiuje się jako >4 przypadki śmiertelne (>20 %) w dwóch kontrpróbach lub większej ich liczbie, których nie można wytłumaczyć błędem technicznym. Do celów analizy powinny być dostępne co najmniej trzy poziomy zabiegu bez wyraźnie widocznej toksyczności. Oznaki widocznej toksyczności mogą obejmować między innymi unoszenie się na powierzchnię, leżenie na dnie zbiornika, pływanie brzuchem do góry lub w nieregularny sposób, brak wynurzania się na powierzchnię oraz brak reakcji na bodźce, nieprawidłowości morfologiczne (np. zdeformowane kończyny), krwawiące uszkodzenia i obrzęk brzucha.

14. W przypadku zaobserwowania odchylenia od kryteriów ważności badania skutki tych odchyleń należy przeanalizować w odniesieniu do wiarygodności wyników badania, a w sprawozdaniu z badania należy uwzględnić zarówno takie odchylenia, jak i dotyczące ich uwagi.

OPIS METOD

Aparatura

15. Zwykły sprzęt laboratoryjny, w szczególności:

- a) aparatura do regulacji temperatury (np. urządzenia do ogrzewania lub chłodzenia (ustawione na temperaturę 21 ± 1 °C));
- b) termometr;
- c) dwuokularowy mikroskop preparacyjny i narzędzia preparacyjne;
- d) aparat cyfrowy o rozdzielczości co najmniej 4 megapikseli i z funkcją mikro (w razie potrzeby);
- e) waga analityczna umożliwiająca pomiar z dokładnością do 0,001 mg lub 1 µg;
- f) miernik rozpuszczonego tlenu i miernik pH;
- g) miernik natężenia światła umożliwiający pomiar w luksach.

Woda

Źródło i jakość

16. Można użyć każdej wody rozcieńczającej, która jest dostępna w danym miejscu (np. woda źródłana lub woda wodociągowa przefiltrowana przez filtr węglowy) i która umożliwia normalny wzrost i rozwój płaty szponiastej; dostępne powinny być dowody potwierdzające normalny wzrost w tej wodzie. Ponieważ jakość lokalnie dostępnej wody może znacząco różnić się w zależności od obszaru, należy wykonać analizy jakości wody, w szczególności jeżeli nie są dostępne dane historyczne dotyczące przydatności wody do hodowli larw płazów. Jeżeli wiadomo, że woda rozcieńczająca ma względnie stałą jakość, przed testem lub np. co sześć miesięcy należy oznaczać zawartość metali ciężkich (np. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd i Ni), głównych anionów i kationów (np. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), pestycydów, zawartość całkowitego węgla organicznego i zawiesinę ogólną. Niektóre właściwości chemiczne dopuszczalnej wody rozcieńczającej wymieniono w dodatku 2.

Stężenie jodu w badanej wodzie

17. Aby tarczycy mogła syntezować hormony tarczycy warunkujące prawidłowy przebieg przeobrażenia, larwy powinny mieć dostęp do wystarczającej ilości związków jodu dostarczonych za pośrednictwem wody lub pożywienia. Obecnie nie istnieją żadne

określone empirycznie wytyczne dotyczące minimalnego stężenia jodu w pożywieniu albo wodzie, które zapewniłyby właściwy rozwój. Obecność jodu może jednak wpływać na zdolność reagowania tarczycy na substancje aktywne oddziałujące na gruczoł tarczowy i wiadomo, że jod moduluje podstawową aktywność tarczycy, którą należy uwzględnić, interpretując wyniki badania histopatologicznego tarczycy. W oparciu o wcześniejsze prace wykazano, że test wykonano z powodzeniem, gdy stężenia jodku (I^-) w wodzie rozcieńczającej wynosiły od 0,5 do 10 $\mu\text{g/l}$. Najlepiej byłoby, gdyby minimalne stężenie jodku w wodzie rozcieńczającej wynosiło 0,5 $\mu\text{g/l}$ przez całe badanie (dodanego jako sól sodowa lub potasowa). Jeżeli do badania stosowana jest woda regenerowana odtworzona z wody dejonizowanej, należy dodać jod w minimalnym stężeniu wynoszącym 0,5 $\mu\text{g/l}$. Należy odnotować zmierzone stężenia jodku w badanej wodzie (tj. wodzie rozcieńczającej) oraz uzupełnienie badanej wody jodem lub innymi solami (jeżeli są stosowane). Zawartość jodu można również zmierzyć w pożywieniu, nie tylko w wodzie badanej.

Układ narażenia

18. Badanie opracowano przy użyciu układu przepływowego z wykorzystaniem rozcieńczalnika. Części składowe układu, które mają kontakt z wodą, powinny być wykonane ze szkła, stali nierdzewnej lub innych chemicznie obojętnych materiałów. Jako zbiorniki do badań narażenia należy stosować akwaria wykonane ze szkła lub stali nierdzewnej, o objętości od około 4,0 do 10,0 l i minimalnej głębokości wody 10–15 cm. Układ powinien umożliwiać utrzymanie wszystkich stężeń ekspozycyjnych, próby kontrolnej, próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem, w razie potrzeby, z czterema kontrpróbami na każdy zabieg i ośmioma w próbach kontrolnych. Natężenie przepływu do każdego zbiornika powinno być stałe ze względu na utrzymanie zarówno warunków biologicznych, jak i narażenia chemicznego. Zaleca się, aby natężenia przepływu były odpowiednie (np. co najmniej 5 obrotów zbiornika dziennie), aby uniknąć spadku stężenia substancji chemicznej w wyniku metabolizmu zarówno organizmów użytych do badań, jak i mikroorganizmów wodnych obecnych w akwariach, albo abiotycznych dróg rozpadu (hydroliza, fotoliza) lub rozpraszania (parowanie, sorpcja). Zbiorniki zabiegowe należy losowo umieścić w układzie narażenia w celu ograniczenia ewentualnych skutków wynikających z ich umiejscowienia, między innymi niewielkich różnic temperatury, natężenia światła itd. W celu uzyskania dalszych informacji dotyczących skompilowania przepływowych układów ekspozycji należy zapoznać się z opracowanymi przez ASTM wytycznymi dotyczącymi przeprowadzania badań toksyczności ostrej na materiale badawczym przy użyciu ryb, dużych bezkręgowców i płazów (*Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians*) (16).

Dostarczanie substancji chemicznej: przygotowanie roztworów do badań

19. Aby przygotować roztwory do badań w układzie narażenia, roztwór podstawowy badanej substancji chemicznej należy dozować do układu narażenia za pomocą odpowiedniej pompy lub innego urządzenia. Przed rozpoczęciem narażenia należy przeprowadzić kalibrację natężenia przepływu roztworu podstawowego zgodnie z analitycznym potwierdzeniem roztworów do badań, a podczas badania należy je okresowo sprawdzać objętościowo. Roztwór do badań w każdej komorze należy odnawiać co najmniej 5 razy dziennie.
20. Metoda wprowadzania badanej substancji chemicznej do układu może różnić się w zależności od właściwości fizykochemicznych substancji. Dlatego też przed badaniem należy uzyskać podstawowe informacje na temat substancji chemicznej, które są istotne z punktu widzenia określenia jej testowalności. Użyteczne informacje na temat właściwości konkretnych badanych substancji chemicznych obejmują: wzór strukturalny, masę cząsteczkową, czystość, stabilność w wodzie i świetle, pK_a i K_{ow} , rozpuszczalność w wodzie (najlepiej w środowisku badania) i prężność par, jak również wyniki badania szybkiej biodegradowalności (metoda badania C.4 (17) lub C.29 (18)). Rozpuszczalność w wodzie i prężność par mogą posłużyć do obliczenia stałej Henry'ego, która wskaże, czy istnieje prawdopodobieństwo wystąpienia strat wskutek parowania badanej substancji chemicznej. W przypadku braku informacji wymienionych powyżej należy dokładnie rozważyć zasadność przeprowadzenia tego badania, ponieważ plan badania będzie zależał od właściwości fizykochemicznych badanej substancji chemicznej, a brak tych danych może utrudnić interpretację wyników badania lub sprawić, że będą one niezrozumiałe. Dostępna powinna być wiarygodna metoda analityczna do oznaczania ilościowego badanej substancji chemicznej w roztworach ze znaną i udokumentowaną dokładnością oraz granicą wykrywalności. Rozpuszczalne w wodzie badane substancje chemiczne mogą być rozpuszczone w podwielokrotnościach wody rozcieńczającej w stężeniu umożliwiającym osiągnięcie docelowego badanego stężenia w układzie przepływowym. Substancje chemiczne, które mają ciekły lub stały stan skupienia w temperaturze pokojowej i są średnio rozpuszczalne w wodzie, mogą wymagać wprowadzenia przy użyciu saturatora ciecz-ciecz lub ciecz-ciało stałe (np. z kolumną wypełnioną watą szklaną) (19). Chociaż dawkowanie badanych substancji chemicznych o silnych właściwościach hydrofobowych jest również możliwe drogą pokarmową, doświadczenie w stosowaniu tej drogi narażenia w niniejszym teście jest niewielkie.
21. Roztwory do badań o wybranych stężeniach przygotowuje się przez rozcieńczenie roztworu podstawowego. Zaleca się przygotowanie roztworu podstawowego przez zwykłe wymieszanie lub zbełtanie badanej substancji chemicznej w wodzie rozcieńczającej w sposób mechaniczny (np. za pomocą mieszadła lub ultradźwięków). Do uzyskania odpowiednio stężonego roztworu podstawowego można wykorzystać kolumny/układy nasyceniowe lub metody pasywnego dawkowania (20). Preferowany jest układ badawczy

niezawierający rozpuszczalnika obojętnego; różne badane substancje chemiczne będą jednak wykazywały różne właściwości fizykochemiczne, które prawdopodobnie będą wymagały różnych metod przygotowania wody służącej do narażenia na działanie substancji chemicznej. Należy dołożyć wszelkich starań, aby uniknąć wykorzystania rozpuszczalników lub nośników, ponieważ: 1) niektóre rozpuszczalniki same mogą powodować toksyczność lub niepożądane albo nieoczekiwane reakcje, 2) badanie substancji chemicznych, których rozpuszczalność w wodzie zostaje przekroczona (co często ma miejsce w wyniku stosowania rozpuszczalników), może skutkować niedokładnym określeniem stężeń efektywnych, 3) stosowanie rozpuszczalników w przypadku badań długoterminowych może skutkować znacznym rozrostem biofilmu związanym z aktywnością mikroorganizmów, co może wpłynąć na warunki środowiskowe, a także na zdolność do utrzymania stężenia podczas narażenia oraz 4) w przypadku braku danych historycznych, które potwierdziłyby brak wpływu rozpuszczalnika na wynik badania, użycie rozpuszczalników wymaga przeprowadzenia zabiegu z próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem, co ma znaczne konsekwencje dla dobrostanu zwierząt, ponieważ przeprowadzenie badania wymaga użycia dodatkowych zwierząt. W przypadku substancji chemicznych, których badanie nastręcza trudności, rozpuszczalnik można zastosować tylko w ostateczności, a w celu wyboru najlepszej metody należy zapoznać się z wytyczną OECD dotyczącą badania toksyczności wodnej trudnych substancji i mieszanin (*Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures*) (21). Wybór rozpuszczalnika będzie uwarunkowany właściwościami chemicznymi badanej substancji chemicznej i dostępnością historycznych danych kontrolnych dotyczących tego rozpuszczalnika. W przypadku braku danych historycznych przed przeprowadzeniem ostatecznych badań należy określić przydatność rozpuszczalnika. W przypadku gdy nie można uniknąć użycia rozpuszczalnika, a występuje aktywność mikroorganizmów (biofilm), zaleca się rejestrowanie biofilmu na zbiornik (co najmniej raz w tygodniu) podczas całego badania. Najlepiej byłoby, gdyby stężenie rozpuszczalnika było utrzymywane na stałym poziomie w próbie kontrolnej z rozpuszczalnikiem i we wszystkich zabiegach. Jeżeli stężenie rozpuszczalnika nie jest utrzymywane na stałym poziomie, do próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem należy użyć jego najwyższego stężenia w próbie badanej poddanej działaniu substancji. W przypadkach gdy używane są nośniki rozpuszczalnikowe, maksymalne stężenia rozpuszczalnika nie powinny przekraczać 100 µl/l lub 100 mg/l (21), przy czym zaleca się, aby stężenie rozpuszczalnika pozostawało jak najniższe (np. ≤ 20 µl/l), aby uniknąć potencjalnego wpływu rozpuszczalnika na mierzone punkty końcowe (22).

Zwierzęta użyte do badania

Badany gatunek

22. Badanym gatunkiem jest platana szponiasta, ponieważ: 1) gatunek ten hoduje się rutynowo w laboratoriach na całym świecie; 2) jest on łatwo dostępny za pośrednictwem dostawców komercyjnych oraz 3) możliwe jest określenie jego płci genetycznej.

Opieka nad osobnikami dorosłymi i hodowla

23. Odpowiednie metody opieki nad plataną szponiastą oraz jej hodowli opisano w znormalizowanych wytycznych (23). Kwestie trzymania platany szponiastej i opieki nad nią również opisał Read (24). W celu nakłonienia zwierząt do rozmnażania się trzem do pięciu parom dorosłych samic i samców wstrzykuje się dootrzewnowo ludzką gonadotropinę kosmówkową (hCG). Żeńskim i męskim osobnikom wstrzykuje się odpowiednio 800–1 000 IU i 500–800 IU hCG rozpuszczonego w 0,6–0,9 % roztworze soli fizjologicznej (lub żabim roztworze Ringera, izotonicznym roztworze soli fizjologicznej do stosowania u płazów; www.hermes.mbl.edu/biologicalbulletin/compendium/comp-RGR.html). Objętość iniekcji powinna wynosić około 10 µl/g masy ciała (~1 000 µl). Następnie indukowane pary hodowlane trzymane są w dużych zbiornikach zapewniających spokój i niezmiennie warunki dla przyjęcia pozycji amplexusu. Dno każdego akwarium reprodukcyjnego powinno posiadać fałszywe dno wykonane z siatki ze stali nierdzewnej (np. otwory o średnicy 1,25 cm), które umożliwia opadanie jaj na dno zbiornika. Żaby, które otrzymały zastrzyk hCG późnym popołudniem, zazwyczaj złożą większość skrzeku późnym rankiem następnego dnia. Po złożeniu i zapłodnieniu wystarczającej liczby komórek jajowych osobniki dorosłe należy usunąć z akwariów reprodukcyjnych. Następnie jaja zbiera się, a osłonki galaretowate usuwa się, poddając je działaniu L-cysteiny (23). Należy przygotować 2 % roztwór L-cysteiny i wyregulować pH do 8,1 przy użyciu 1 M NaOH. Ten roztwór o temperaturze 21 °C dodaje się do kolby Erlenmeyera o pojemności 500 ml zawierającej jaja z jednego tarła, którą delikatnie się potrząsa przez jedną do dwóch minut, a następnie jaja 6–8 razy dokładnie przepłukuje się wodą do hodowli o temperaturze 21 °C. Następnie jaja przenosi się do krystalizatora i oznacza jako >70 % żywotne przy minimalnych nieprawidłowościach w zarodkach wykazujących podział komórek.

PROJEKT BADANIA

Badane stężenia

24. Zaleca się stosowanie co najmniej czterech stężeń substancji chemicznej i odpowiednich prób kontrolnych (w tym, w razie potrzeby, prób kontrolnych z rozpuszczalnikiem). Przeważnie zaleca się, aby odstęp między stężeniami (współczynnik rozstawienia stężeń) nie przekraczały 3,2.
25. Do celów niniejszego badania przy określaniu najwyższego badanego stężenia należy możliwie w jak największym stopniu korzystać z dotychczasowych badań na płazach, aby

uniknąć stężeń, które są nadmiernie toksyczne. W ustaleniu tego stężenia pomocne mogą być informacje pochodzące na przykład z ilościowych zależności struktura-aktywność i badań przekrojowych oraz dane z dotychczasowych badań na płazach, takich jak badanie przeobrażenia płazów, metoda badawcza C.38 (25), oraz badanie teratogenezy w zarodkach żab – *Xenopus* (23) lub badania na rybach, takie jak metody badawcze C.48, C.41 i C.49 (26)(27)(28). Przed rozpoczęciem badania LAGDA można przeprowadzić doświadczenie ustalające zakres stężeń. Zaleca się rozpoczęcie badania zakresu narażenia w ciągu 24 godzin od zapłodnienia i kontynuowanie go przez 7–14 dni (lub więcej, jeżeli to konieczne) oraz ustalenie badanych stężeń w taki sposób, aby kolejne stężenie nie było większe niż 10-krotność poprzedniego. Wyniki eksperymentu ustalającego zakres powinny posłużyć do ustalenia najwyższego badanego stężenia w LAGDA. Należy zauważyć, że jeżeli istnieje potrzeba zastosowania rozpuszczalnika, wówczas w ramach badania ustalającego zakres można stwierdzić stosowność rozpuszczalnika (tj. czy może mieć on wpływ na wynik badania).

Kontrpróby grup poddanych zabiegowi i prób kontrolnych

26. Należy zastosować co najmniej cztery zbiorniki z kontrpróbą na każde badane stężenie oraz co najmniej osiem kontrprób na potrzeby prób kontrolnych (oraz próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem, w razie potrzeby) (tj. w celu zapewnienia odpowiedniej mocy statystycznej konieczne jest, aby liczba kontrprób w próbie kontrolnej oraz dowolnej próbie kontrolnej z rozpuszczalnikiem była dwa razy większa niż liczba kontrprób w każdej grupie poddanej zabiegowi). W każdej kontrpróbie powinno znajdować się nie więcej niż 20 zwierząt. Minimalna liczba zwierząt poddanych zabiegowi powinna wynosić 15 (5 osobników w 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera w podpróbce oraz 10 osobników w stadium młodocianym). Do każdej kontrpróby dodaje się jednak dodatkowe zwierzęta, aby uwzględnić ewentualną śmiertelność, zachowując nieprzekraczalną liczbę 15 zwierząt.

PROCEDURA

Przegląd testu

27. Test rozpoczyna się z wykorzystaniem nowo złożonych jaj zawierających zarodki (8.–10. stadium według Nieuwkoopa i Fabera) i trwa do czasu rozwoju osobników młodych. Zwierzęta bada się codziennie pod kątem śmiertelności oraz wszelkich oznak nietypowego zachowania. W 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera pobiera się podpróbę osobników w stadium larwalnym (do 5 zwierząt na kontrpróbę) i bada różne punkty końcowe (tabela 1). Gdy wszystkie zwierzęta osiągną 66. stadium według Nieuwkoopa i Fabera, tj. proces ich przeobrażania dobiegnie końca (lub gdy minie 70 dni od rozpoczęcia testu, w zależności od tego, co nastąpi wcześniej), przeprowadza się losową eliminację

(jednak bez pobierania podpróbek), aby zmniejszyć liczbę zwierząt (do 10 na zbiornik) (zob. pkt 43), a pozostałe zwierzęta pozostają pod wpływem substancji chemicznej w próbie kontrolnej do upłygnięcia 10 tygodni po medianie czasu potrzebnego do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera w próbie kontrolnej. Po zakończeniu testu (pobieranie próbek osobników w stadium młodocianym) przeprowadza się dodatkowe pomiary (tabela 1).

Warunki narażenia

28. Pełne streszczenie parametrów badania można znaleźć w dodatku 3. W okresie narażenia należy codziennie mierzyć stężenie rozpuszczonego tlenu, temperaturę i pH roztworów do badań. Raz na miesiąc mierzy się przewodność właściwą, zasadowość i twardość. Jeżeli chodzi o temperaturę wody roztworów do badań, różnice między kontrpróbami i między zabiegami (w ciągu jednego dnia) nie powinny przekraczać 1,0 °C. Ponadto, jeżeli chodzi o pH roztworów do badań, różnice między kontrpróbami i między zabiegami nie powinny również przekraczać 0,5.
29. Zbiorniki do badań narażenia można codziennie czyścić przy użyciu syfonu, aby usunąć niezjedzony pokarm i odchody – należy przy tym zachować ostrożność, aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego zbiorników. Należy dbać, aby ograniczyć do minimum stres i traumę, na jakie narażone są zwierzęta, w szczególności podczas poruszania, czyszczenia akwariów i przenoszenia. Należy unikać stresujących warunków/działań, takich jak głośny lub nieustanny hałas, stukanie palcem w akwarium, drgania w zbiorniku.

Czas narażenia na działanie badanej substancji chemicznej

30. Narażenie rozpoczyna się z wykorzystaniem nowo złożonych jaj zawierających zarodki (8.–10. stadium według Nieuwkoopa i Fabera) i trwa do czasu upłygnięcia dziesięciu tygodni po medianie czasu potrzebnego do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera (≤ 45 dni od rozpoczęcia testu) w grupie kontrolnej. Zazwyczaj czas trwania badania LAGDA wynosi 16 tygodni (maksymalnie 17 tygodni).

Rozpoczęcie testu

31. Zwierzęta rodzicielskie wykorzystywane do rozpoczęcia testu powinny uprzednio wydać potomstwo, u którego można określić płeć genetyczną (dodatek 5). Po odbyciu tarła przez osobniki dorosłe zarodki zbiera się, poddaje działaniu cysteiny, aby usunąć osłonkę galaretowaną, i poddaje się je badaniu przesiewowemu pod kątem żywotności (23). Poddanie działaniu cysteiny umożliwia przenoszenie zarodków podczas badania przesiewowego bez przywierania do powierzchni. Badanie przesiewowe przeprowadza się pod mikroskopem stereoskopowym, używając odpowiedniej wielkości kroplomierza do usunięcia zarodków niezdolnych do życia. Zaleca się, aby do badania wykorzystywać jedno tarło, którego żywotność przekracza 70 %. Zarodki w 8.–10. stadium według

Nieuwkoop i Fabera umieszcza się losowo w zbiornikach do zabiegów narażenia zawierających odpowiednią objętość wody rozcieńczającej do momentu umieszczenia 20 zarodków w każdym zbiorniku. Podczas przenoszenia należy bardzo ostrożnie obchodzić się z zarodkami, aby zminimalizować wynikający z tego stres i nie dopuścić do zranienia. W ciągu 96 godzin od zapłodnienia kijanki powinny przesunąć się w górę słupa wody i zacząć przylegać do boków zbiornika.

Schemat żywienia

32. Częstotliwość karmienia i objętość pokarmu w różnych stadiach rozwoju płaty szponiastej są bardzo ważnym aspektem protokołu LAGDA. Należy unikać nadmiernego karmienia w stadium larwalnym, ponieważ zazwyczaj skutkuje ono zwiększoną częstością występowania i dotkliwością skoliozy (dodatek 8). Z kolei nieodpowiednie karmienie w stadium larwalnym skutkuje bardzo zmiennym tempem rozwoju wśród prób kontrolnych, co może mieć negatywny wpływ na moc statystyczną lub zakłócać wyniki badań. W dodatku 4 przedstawiono zalecaną dietę i schematy żywienia płaty szponiastej w stadium larwalnym i młodocianym w warunkach przepływu, choć dopuszczalne jest stosowanie metod alternatywnych, o ile organizmy użyte do badań rosną i rozwijają się w sposób zadowalający. Należy zauważyć, że w przypadku pomiaru punktów końcowych właściwych dla układu hormonalnego pokarm nie powinien zawierać substancji endokrynnie czynnych, takich jak mączka sojowa.

Karmienie osobników w stadium larwalnym

33. Zalecana dieta dla larw składa się z pokarmu dla młodych pstrągów, spiruliny w tabletkach oraz pokarmu dla złotych rybek (np. płatki TetraFin[®], Tetra, Niemcy) zmieszanych ze sobą w wodzie do hodowli (lub wodzie rozcieńczającej). Mieszaninę tę podaje się trzy razy dziennie w dni powszednie i raz dziennie w weekendy. Począwszy od 8 dnia po zapłodnieniu kijanki można również karmić żywymi solowcami z gatunku *Artemia* spp., 24-godzinnymi larwami, dwa razy dziennie w dni powszednie i raz dziennie w weekendy. Karmienie osobników w stadium larwalnym, które powinno przebiegać tak samo w każdym naczyniu badawczym, powinno także umożliwić właściwy wzrost i rozwój zwierząt użytych do badania, aby zapewnić odtwarzalność i możliwość przenoszenia wyników testu: 1) mediana czasu potrzebnego do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoop i Fabera w próbach kontrolnych powinna wynosić ≤ 45 dni oraz 2) zaleca się, aby średnia masa osobników w 62. stadium według Nieuwkoop i Fabera w próbach kontrolnych wynosiła $1,0 \pm 0,2$ g.

Karmienie osobników młodych

34. Po zakończeniu procesu przeobrażania schemat żywienia składa się z wysokiej jakości opadającego na dno pokarmu dla żab np. Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, Floryda, Stany Zjednoczone) (dodatek 4). Aby zmniejszyć wielkość granulatu podawanego

młodym żabom (osobnikom we wczesnym stadium młodocianym), należy go rozdrabniać przez krótki czas przy użyciu młynka do kawy lub blendera albo pokruszyć za pomocą moździerza i tłuczka. Rozdrabnianie lub kruszenie nie jest już niezbędne w momencie, gdy osobniki młodociane są wystarczająco duże, aby jeść granulaty w całości. Zwierzęta należy karmić raz dziennie. Karmienie osobników młodocianych powinno umożliwić właściwy wzrost i rozwój organizmów: zaleca się, aby na zakończenie testu średnia masa osobników młodocianych w próbach kontrolnych wynosiła $11,5 \pm 3$ g.

Chemia analityczna

35. Przed przystąpieniem do testu należy określić stabilność badanej substancji chemicznej (np. rozpuszczalność, degradowalność i lotność) oraz wszystkie potrzebne metody analityczne, np. wykorzystując do tego celu istniejące informacje lub wiedzę. Jeżeli dawkowanie odbywa się za pomocą wody rozcieńczającej, przed rozpoczęciem badania zaleca się zbadanie stężenia w każdym zbiorniku z kontrpróbą w celu zweryfikowania efektywności układu. W okresie narażenia stężenia badanej substancji chemicznej oznacza się w odpowiednich odstępach czasu, najlepiej raz na tydzień w co najmniej jednej kontrpróbie z każdej grupy poddanej zabiegowi, co tydzień zmieniając kontrpróby w ramach tej samej grupy poddanej zabiegowi. Zaleca się, aby wyniki były oparte na mierzonych stężeniach. Jeżeli jednak stężenie badanej substancji chemicznej w roztworze można z powodzeniem utrzymywać w zakresie $\pm 20\%$ stężenia nominalnego przez cały czas trwania badania, wówczas wyniki mogą opierać się albo na wartościach nominalnych, albo na wartościach pomiarowych. Ponadto współczynnik zmienności (CV) zmierzonych badanych stężeń w całym okresie trwania badania w ramach zabiegu w każdym stężeniu należy utrzymywać na poziomie 20% lub niższym. Jeżeli zmierzone stężenia nie utrzymują się w granicach $80\text{--}120\%$ stężenia nominalnego (np. podczas badania substancji chemicznych charakteryzujących się wysokim stopniem biodegradowalności lub wykazujących silne właściwości adsorpcyjne), należy określić stężenia efektywne i wyrazić je względem średniej arytmetycznej stężenia w badaniach przepływowych.
36. Natężenia przepływu wody rozcieńczającej i roztworu podstawowego należy sprawdzać w odpowiednich odstępach czasu (np. trzy razy w tygodniu) przez cały czas trwania narażenia. W przypadku substancji chemicznych, których nie można wykryć w niektórych lub wszystkich stężeniach nominalnych (np. z powodu szybkiej degradacji lub adsorpcji w naczyniach badawczych lub w wyniku znaczącej akumulacji substancji chemicznej w ciałach narażonych zwierząt), zaleca się dostosowanie tempa wymiany roztworu do badań w każdej komorze w taki sposób, aby badane stężenia pozostały możliwie jak najbardziej stałe.

Obserwacje i pomiary punktów końcowych

37. Punkty końcowe oceniane podczas narażenia obejmują punkty wskazujące na toksyczność, w tym śmiertelność, nietypowe zachowanie, takie jak objawy kliniczne choroby lub toksyczności ogólnych, i oznaczenia wzrostu (długość i masa), jak również punkty końcowe z zakresu patologii, które mogą odpowiadać zarówno ogólnej toksyczności, jak sposobom działania toksycznego na układ hormonalny ukierunkowanym na ścieżki pośredniczone przez estrogen, androgen lub tarczycę. Ponadto na końcu testu można opcjonalnie zmierzyć stężenie VTG w osoczu. Pomiar VTG może być przydatny do zrozumienia wyników badania w kontekście mechanizmów hormonalnych, które podejrzewa się, że mogą zaburzać funkcjonowanie układu hormonalnego Punkty końcowe oraz czas pomiarów podsumowano w tabeli 1.

Tabela 1: Przegląd punktów końcowych badania LAGDA

Punkty końcowe*	Codziennie	Pobieranie próbek w trakcie badania (pobieranie próbek osobników w stadium larwalnym)	Zakończenie badania (pobieranie próbek osobników młodocianych)
Śmiertelność oraz nieprawidłowości	X		
Czas potrzebny do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera		X	
Histo(pato)logia (tarczyca)		X	
Morfometria (wzrost masy i długości)		X	X
Wskaźnik hepatosomatyczny (LSI)			X
Genetyczne/fenotypowe proporcje płci			X
Histopatologia (gonady, drogi rodne, nerki i wątroba)			X
Witellogenina (VTG) (opcjonalnie)			X

* Wszystkie punkty końcowe są analizowane statystycznie.

Śmiertelność i codzienne obserwacje

38. Należy codziennie sprawdzać wszystkie zbiorniki testowe pod kątem martwych zwierząt oraz należy odnotować śmiertelność w odniesieniu do każdego zbiornika. Martwe zwierzęta należy usunąć ze zbiornika testowego natychmiast po ich zauważeniu. Stadium rozwojowe martwych zwierząt należy klasyfikować jako: etap poprzedzający 58. stadium według Nieuwkoopa i Fabera (przed pojawieniem się kończyn przednich), etap między 58. i 62. stadium NF, etap między 63. i 66. stadium NF (między 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera a całkowitym zanikiem ogona), albo jako etap następujący po 66. stadium NF (stadium polarwalne). Wskaźnik śmiertelności powyżej 20 % może

wskazywać na nieodpowiednie warunki badania lub nadmiernie toksyczny wpływ badanej substancji chemicznej. Zwykle zwierzęta są najbardziej podatne na śmiertelność wywołaną przez czynniki inne niż substancja chemiczna w pierwszych dniach rozwoju po tarle i w momencie kulminacyjnym przeobrażania. Tego rodzaju śmiertelność można wyraźnie wyczytać z danych dotyczących kontroli.

39. Ponadto należy rejestrować każdy przypadek nietypowego zachowania, wyraźnie widocznych wad rozwojowych (np. skoliozy) lub uszkodzeń. Należy zliczyć zaobserwowane przypadki skoliozy (częstość występowania) oraz sklasyfikować je pod względem nasilenia (np. nieznaczna – NZ, minimalna – 1, umiarkowana – 2, znaczna – 3; dodatek 8). Należy podjąć starania, aby ograniczyć częstość występowania umiarkowanej i znacznej skoliozy (np. poniżej 10 % w próbach kontrolnych) w trakcie badania, aczkolwiek większa częstość występowania nieprawidłowości w próbie kontrolnej niekoniecznie musi być powodem do zakończenia badania. Normalnie zachowujące się zwierzęta w stadium larwalnym charakteryzują się tym, że są zawieszone w słupie wody z ogonem powyżej głowy, ich płetwa ogonowa uderza regularnie i rytmicznie, okresowo wynurzają się na powierzchnię, poruszają pokrywami skrzelowymi i reagują na bodźce. Nietypowe zachowania obejmowałyby na przykład unoszenie się na powierzchni, leżenie na dnie zbiornika, pływanie brzuchem do góry lub w nieregularny sposób, brak wynurzania się na powierzchnię i brak reakcji na bodziec. W przypadku zwierząt, które już się przeobraziły, oprócz wyżej wymienionych nietypowych zachowań należy rejestrować wyraźne różnice w spożyciu pokarmu występujące między zabiegami. Wyraźnie widoczne wady rozwojowe i uszkodzenia mogą obejmować m.in. nieprawidłowości morfologiczne (np. zdeformowane kończyny), krwawiące uszkodzenia, obrzęk brzucha oraz zakażenia bakteryjne i grzybicze. Przypadki wystąpienia uszkodzeń głowy tuż za tylną krawędzią nozdrzy u osobników młodocianych mogą wskazywać na niedostateczny poziom wilgotności. Ustalenia te mają charakter jakościowy i powinno się je uważać za równoznaczne z klinicznymi objawami choroby/stresu oraz dokonywać, porównując ze zwierzętami z próby kontrolnej. Jeżeli częstotliwość występowania jest większa w zbiorniku narażonym na działanie substancji chemicznej niż w próbach kontrolnych, należy ją uznać za dowód widocznej toksyczności.

Pobieranie podpróbek osobników w stadium larwalnym

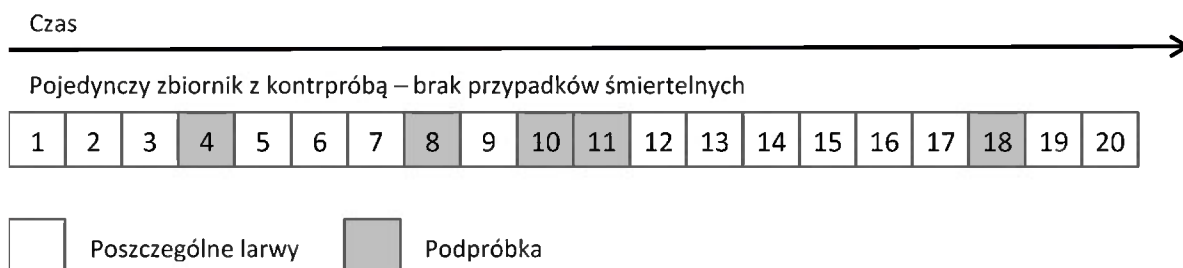
Krótki opis pobierania podpróbek osobników w stadium larwalnym

40. Kijanki, które osiągnęły 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera, należy usunąć ze zbiorników i pobrać ich próbki albo przenieść je do następnego etapu narażenia w nowym zbiorniku lub w tym samym zbiorniku za pomocą przegrody oddzielić je od pozostałych kijanek. Kijanki kontroluje się codziennie oraz rejestruje dzień badania, w którym dany osobnik osiąga 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera. Cechą charakterystyczną

stosowaną w tej ocenie jest kształt głowy. Kijankę można zaliczyć do osobników, które osiągnęły 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera, gdy rozmiar jego głowy zmniejszy się do takiego poziomu, że jej długość będzie wzrokowo porównywalna do tułowia, a kończyny przednie będą sięgać środka serca.

41. Celem jest, aby z każdego zbiornika z kontrpróbą pobrać pięć próbek kijanek, które osiągnęły 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera. Działanie to należy przeprowadzić całkowicie losowo, lecz decyzję należy podjąć *a priori*. **Rys. 1** przedstawia hipotetyczny przykład zbiornika z kontrpróbą. Jeżeli w czasie, gdy pierwszy osobnik osiągnie 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera, w danym zbiorniku znajdować się będzie 20 kijanek, należy wybrać pięć losowych liczb z zakresu 1–20. Kijanka o numerze 1 jest pierwszym osobnikiem, który osiągnie 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera, a kijanka o numerze 20 jest ostatnim osobnikiem w zbiorniku, który osiągnie 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera. Analogicznie – jeżeli w zbiorniku znajduje się 18 larw, które przeżyły, należy wybrać pięć losowych liczb z zakresu 1–18. Działanie to należy wykonać w odniesieniu do każdego zbiornika z kontrpróbą, gdy pierwszy osobnik w badaniu osiągnie 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera. Jeżeli w trakcie pobierania próbek w 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera pojawią się przypadki śmiertelne, należy dokonać ponownego losowego doboru próbek, jako podstawę przyjmując liczbę larw, które nie osiągnęły jeszcze 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera, oraz liczbę larw, których brakuje do osiągnięcia łącznej liczby pięciu próbek z tej kontrpróby. W dniu, w którym kijanka osiąga 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera, sporządza się odniesienie do przygotowanego wykresu próbkiowania, aby określić, czy od tego osobnika pobrano próbkę, czy też jest on fizycznie oddzielony od pozostałych kijanek w celu pozostania pod wpływem substancji chemicznej. W przedstawionym przykładzie (rys. 1) pierwszy osobnik, który osiąga 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera, (tj. pole nr 1) zostaje fizycznie oddzielony od pozostałych larw, pozostaje pod wpływem substancji chemicznej i należy zarejestrować dzień, w którym dany osobnik osiągnął 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera. Następnie z osobnikami o numerach 2 i 3 postępuje się w ten sam sposób, co z osobnikiem z numerem 1, a następnie od osobnika o numerze 4 pobiera się próbki do celów oceny wzrostu i histologii tarczycy (zgodnie z tym przykładem). Procedura ta trwa do momentu, w którym 20. osobnik dołącza do osobników znajdujących się na etapie następującym po 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera, albo do momentu, w którym pobiera się z niego próbkę. Zastosowana losowa procedura musi zapewnić każdemu organizmowi użytemu do badania równe prawdopodobieństwo zostania wybranym. Można to osiągnąć, wykorzystując dowolną metodę randomizacji, ale również konieczne jest złapanie każdej kijanki w którymś momencie w trakcie trwania okresu pobierania podpróbek osobników, które osiągnęły 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera.

Rys. 1: Hipotetyczny przykład schematu pobierania próbek osobników, które osiągnęły 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera, w odniesieniu do jednego zbiornika z kontrpróbą



42. Jeżeli chodzi o pobieranie podpróbek osobników w stadium larwalnym, uzyskiwane punkty końcowe są następujące: 1) czas potrzebny do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera (tj. liczba dni między zapłodnieniem a osiągnięciem 62. stadium NF), 2) nieprawidłowości zewnętrzne, 3) morfometria (np. masa i długość) oraz 4) histologia tarczycy.

Humanitarne uśmiercanie kijanek

43. Podpróbkę kijanek, które osiągnęły 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera (5 osobników na kontrpróbę), należy poddać eutanazji poprzez zanurzenie na 30 minut w odpowiednich ilościach (np. 500 ml) roztworu środka znieczulającego (np. 0,3 % roztworu MS-222, metanosulfonioanu trikainy, nr CAS: 886-86-2). Roztwór MS-222 należy zbuforować wodorowęglanem sodu do pH około 7,0, ponieważ niezbuforowany roztwór MS-222 jest kwaśny i drażniący dla żabiej skóry, co powoduje słabe wchłanianie i wywołuje u tych organizmów niepotrzebny dodatkowy stres.
44. Kijanki wyjmuje się z komory badawczej za pomocą oczkowanej siatki i przenosi się do roztworu do uśmiercania (umieszcza się w roztworze do uśmiercania). Zwierzę zostało poddane eutanazji w prawidłowy sposób i jest gotowe do autopsji, gdy nie reaguje na bodźce zewnętrzne, jak np. ściskanie tylnej kończyny za pomocą szczypiec.

Morfometria (masa i długość)

45. Pomiar mokrej masy (do pełnego miligrama) oraz długości mierzonej od otworu gębowego do odbytu (do 0,1 mm) w odniesieniu do każdej kijanki należy przeprowadzać niezwłocznie po tym, gdy przestanie reagować pod wpływem znieczulenia (rys. 2a). Do pomiaru długości mierzonej od otworu gębowego do odbytu na podstawie zdjęcia można wykorzystać oprogramowanie przeznaczone do analizy obrazu. Przed zważeniem kijanki należy osuszać na bibule, aby usunąć nadmiar wody chroniącej ich skórę. Po dokonaniu pomiarów wielkości ciała (masy i długości mierzonej od otworu gębowego do odbytu) należy zarejestrować lub odnotować wszelkie poważne nieprawidłowości morfologiczne

lub kliniczne objawy toksyczności, takie jak skolioza (zob. dodatek 8), wybroczyny i krwotoki; zaleca się również prowadzenie dokumentacji cyfrowej. Należy zauważyć, że wybroczyny to małe czerwone lub fioletowe krwotoki w naczyniach włosowatych skóry.

Pobieranie tkanek i utrwalanie

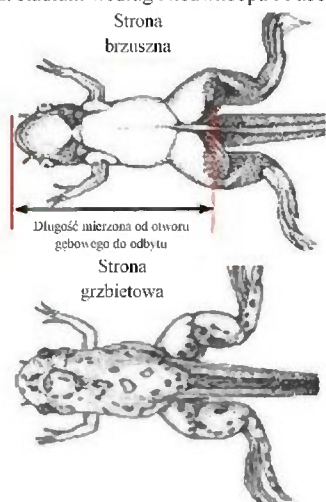
46. W przypadku podpróbek osobników w stadium larwalnym przeprowadza się histologię tarczycy. Dolną część tułowia za kończynami przednimi usuwa się i wyrzuca. Oczyszczone ciało utrwalą się w utrwalaczu Davidsona. Objętość utrwalacza w pojemniku powinna być co najmniej 10 razy większa niż przybliżona objętość tkanek. Aby odpowiednio utrwalić tkanki będące przedmiotem zainteresowania, należy zapewnić odpowiednie wstrząśnięcie lub cyrkulację utrwalacza. Wszystkie tkanki pozostawia się w utrwalaczu Davidsona przez co najmniej 48 godzin, lecz nie dłużej niż 96 godzin; po upływie tego czasu przepłukuje się je wodą dejonizowaną i przechowuje w 10 % obojętnej buforowanej formalinie (1)(29).

Histologia tarczycy

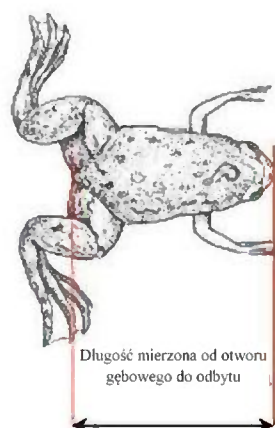
47. Każdą podpróbkę osobników w stadium larwalnym (utrwalone tkanki) poddaje się ocenie histologicznej pod kątem gruczołów tarczycowych, tj. przeprowadza się diagnostykę i klasyfikuje się pod względem nasilenia (29)(30).

Rys. 2: Punkty wykorzystywane do pomiaru długości mierzonej od otworu gębowego do odbytu na potrzeby badania LAGDA w 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera (a.) oraz młodych żab (b.). Cechy charakterystyczne 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera (a.): głowa jest tej samej szerokości co tułów, długość nerwu węchowego jest krótsza niż średnica opuszki węchowej (widok grzbietowy), a przednie kończyny znajdują się na wysokości serca (widok brzuszny). Rysunki na podstawie Nieuwkoopa i Fabera (1994).

a. Pobieranie podpróbek osobników w stadium larwalnym (62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera)



b. Pobieranie próbek osobników młodocianych



Zakończenie narażenia larw

48. Biorąc pod uwagę początkową liczbę kijanek, oczekuje się, że prawdopodobnie niewielki odsetek osobników nie rozwinie się normalnie i nie zakończy przeobrażenia (66. stadium według Nieuwkoopa i Fabera) w rozsądnym czasie. Część larwalna narażenia nie powinna przekraczać 70 dni. Wszystkie kijanki pozostałe po tym okresie należy poddać eutanazji (zob. pkt 43), zmierzyć ich mokrą masę i długość mierzoną od otworu gębowego do odbytu, określić ich stadium rozwojowe według Nieuwkoopa i Fabera, 1994, oraz odnotować wszelkie nieprawidłowości rozwojowe.

Eliminacja osobników w stadium późniejszym niż 66. stadium według Nieuwkoopa i Fabera

49. Po osiągnięciu 66. stadium według Nieuwkoopa i Fabera (całkowita resorpcja ogona) dziesięć osobników powinno nadal przebywać w każdym zbiorniku do czasu zakończenia narażenia. Dlatego też po osiągnięciu przez wszystkie zwierzęta 66. stadium według Nieuwkoopa i Fabera lub po 70 dniach (w zależności od tego, co nastąpi wcześniej), należy przeprowadzić eliminację. Należy losowo wybrać zwierzęta w stadium późniejszym niż 66. stadium według Nieuwkoopa i Fabera, które nie będą już poddawane narażeniu.
50. Zwierzęta, których nie wybrano do pozostania pod wpływem substancji chemicznej, poddaje się eutanazji (zob. pkt 43). W odniesieniu do każdego zwierzęcia dokonuje się pomiarów pod kątem określenia stadium rozwojowego, mokrej masy i długości mierzonej od otworu gębowego do odbytu (rys. 2b), a także przeprowadza się oraz pełne rozpoznanie histopatologiczne. Płeć fenotypową (na podstawie morfologii gonad) określa się jako żeńską, męską lub nieokreśloną.

Pobieranie próbek osobników młodych

Krótki opis pobierania podpróbek osobników młodych

51. Pozostałe zwierzęta pozostają pod wpływem substancji chemicznej do czasu upływu 10 tygodni po medianie czasu potrzebnego do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera w próbie kontrolnej z wodą rozcieńczającą (lub próbie kontrolnej z rozpuszczalnikiem, w stosownych przypadkach). Pod koniec okresu narażenia pozostałe zwierzęta (maksymalnie 10 żab na kontrpróbę) poddaje się eutanazji oraz dokonuje się pomiaru lub oceny oraz zapisu różnych punktów końcowych, takich jak: 1) morfometria (masa i długość), 2) fenotypowe/genetyczne proporcje płci, 3) masa wątroby (wskaźnik hepatosomatyczny), 4) histopatologia (gonady, drogi rodne, wątroba i nerki) i opcjonalnie 5) VTG w osoczu.

Humanitarne uśmiercanie żab

52. Próbkę osobników młodych, tj. żab, które zakończyły etap przeobrażania, poddaje się eutanazji przez wstrzyknięcie dootrzewnowe środka znieczulającego, np. 10 % MS-222 w

odpowiednim roztworze buforowanym fosforanami. Próbkę pobiera się od żab po tym, gdy przestaną reagować (zwykle około 2 minut po zastrzyku, jeżeli 10 % MS-222 stosuje się w dawce 0,01 ml na gram masy żaby). Chociaż młode żaby można zanurzać w większym stężeniu środka znieczulającego (MS-222), doświadczenie pokazuje, że znieczulanie ich tą metodą trwa dłużej, a czas trwania może nie być odpowiedni, aby umożliwić pobranie próbek. Wstrzyknięcie zapewnia skuteczne, szybkie uśmiercenie przed pobraniem próbek. Pobieranie próbek należy rozpocząć dopiero po potwierdzeniu braku reakcji żab w celu upewnienia się, że zwierzęta nie żyją. Jeżeli żaby wykazują oznaki znacznego cierpienia (bardzo poważnego, a ich śmierć można wiarygodnie przewidzieć) i uznaje się je za konające, zwierzęta należy znieczulić i poddać eutanazji oraz traktować jako przypadki śmiertelne do celów analizy danych. W przypadku poddania żaby eutanazji z powodu choroby należy to odnotować i zgłosić. W zależności momentu badania, w którym żabę poddaje się eutanazji, zwierzę można zachować na potrzeby analizy histopatologicznej (utrwalając żabę na potrzeby ewentualnego badania histopatologicznego).

Morfometria (masa i długość)

53. Pomiary mokrej masy i długości mierzonej od otworu gębowego do odbytu (rys. 2b) są identyczne jak te opisane w odniesieniu do pobierania podpróbek osobników w stadium larwalnym.

VTG w osoczu (opcjonalnie)

54. VTG jest powszechnie dopuszczalnym biomarkerem, który powstaje w wyniku narażenia na działanie estrogennych substancji chemicznych. W przypadku badania LAGDA VTG w osoczu można opcjonalnie mierzyć w próbkach osobników młodych (może to być szczególnie istotne, jeżeli istnieje podejrzenie, że badana substancja chemiczna jest estrogenem).
55. Tylne kończyny uśmierconych młodych osobników odcina się, a krew pobiera się za pomocą kapilary powlekanej heparyną (choć stosowane mogą być alternatywne metody pobierania krwi, takie jak nakłucie serca). Krew przelewa się do próbki do mikrowirówki (np. 1,5 ml objętości) i odwirowuje się w celu otrzymania osocza. Próbkę osocza należy przechowywać w temperaturze -70 °C lub niższej, aż do oznaczenia VTG. Stężenie VTG w osoczu można mierzyć za pomocą testu immunoenzymatycznego (ELISA) (dodatek 6) lub metodą alternatywną, taką jak spektrometria mas (31). Ze względu na większą wrażliwość preferowane są przeciwciała specyficzne dla danego gatunku.

Określanie płci genetycznej

56. Płeć genetyczną każdej młodej żaby ocenia się na podstawie markerów opracowanych przez Yoshimoto *et al.* (11). W celu określenia płci genetycznej część (lub całość) jednej

kończyny tylnej (lub innej tkanki) usuniętej w trakcie sekcji pobiera się i przechowuje w probówce do mikrowirówki (próbki tkanek pochodzące od żab można pobrać z dowolnej tkanki). Tkanek można przechowywać w temperaturze -20 °C lub niższej do momentu izolacji kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA). Izolację DNA z tkanek można przeprowadzić za pomocą zestawów dostępnych na rynku, a analizę pod kątem obecności lub braku obecności markera przeprowadza się metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) (dodatek 5). Ogólnie rzecz biorąc, zgodność między płcią histologiczną a genotypem u zwierząt z prób kontrolnych w momencie pobierania próbek od młodych osobników w grupach kontrolnych wynosi ponad 95 %.

Pobieranie tkanek i utrwalanie do celów histopatologii

57. Podczas końcowego pobierania próbek do analizy histologicznej pobiera się gonady, drogi rodne, nerki i wątrobę. Jamę brzuszną otwiera się, a wątrobę wycina się i waży. W następnej kolejności ostrożnie usuwa się organy trawienne (np. żołądek, jelita) z dolnej części brzucha w celu odsłonięcia gonad, nerek i dróg rodnych. Należy odnotować wszelkie poważne nieprawidłowości morfologiczne gonad. Na koniec należy usunąć tylne kończyny, jeśli nie usunięto ich wcześniej w celu pobrania krwi. Pobrane wątroby i tusze z gonadami pozostawionymi *in situ* należy natychmiast umieścić w utrwalaczu Davidsona. Objętość utrwalacza w pojemniku powinna być co najmniej 10 razy większa niż przybliżona objętość tkanek. Wszystkie tkanki pozostawia się w utrwalaczu Davidsona przez co najmniej 48 godzin, lecz nie dłużej niż 96 godzin; po upływie tego czasu przepłukuje się je wodą dejonizowaną i przechowuje w 10 % obojętnej buforowanej formalinie (1)(29).

Histopatologia

58. Każdą próbkę młodego osobnika poddaje się badaniu histologicznemu pod kątem zmian patologicznych gonad, dróg rodnych, nerek i wątroby, tj. przeprowadza się diagnostykę i klasyfikuje się pod względem nasilenia (32). Badanie to (np. jajnika, jądra, osobników interseksualnych) pozwala również określić fenotyp gonad, a wraz z poszczególnymi genetycznymi pomiarami płci można wykorzystać te obserwacje do obliczenia fenotypowych/genetycznych proporcji płci.

RAPORTOWANIE DANYCH

Analiza statystyczna

59. W badaniu LAGDA generowane są trzy rodzaje danych, które należy poddać analizie statystycznej: 1) ilościowe dane ciągłe (masa, długość mierzona od otworu gębowego do odbytu, wskaźnik hepatosomatyczny, VTG), 2) dane dotyczące czasu do wystąpienia wydarzenia w odniesieniu do tempa rozwoju (tj. dni do osiągnięcia 62. stadium według

Nieuwkoop i Fabera od rozpoczęcia badania) oraz 3) dane porządkowe w postaci stopnia nasilenia lub stadiów rozwojowych określonych na podstawie ocen histopatologicznych.

60. Zaleca się, aby w przypadku, gdy należy zarejestrować NOEC lub EC_x, projekt badania i wybrany test statystyczny zapewniały moc wystarczającą do wykrycia zmian o znaczeniu biologicznym w punktach końcowych. Statystyczne analizy danych (co do zasady opierające się na średnich kontrpróbach) najlepiej jest wykonywać zgodnie z procedurami opisanymi w dokumencie OECD „Aktualne podejście do statystycznej analizy danych ekotoksyczności: wytyczne stosowania” (*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*)(33). Dodatek 7 do niniejszej metody badawczej zawiera zalecane drzewo decyzyjne w zakresie analizy statystycznej oraz wytyczne dotyczące przetwarzania danych i wyboru badania statystycznego lub modelu, które będą najbardziej odpowiednie do zastosowania w badaniu LAGDA.
61. Dane z pobranych próbek osobników młodych (np. wzrost, wskaźnik hepatosomatyczny) należy analizować oddzielnie dla każdej płci genetycznej, ponieważ płeć genetyczną oznacza się w odniesieniu do wszystkich żab.

Warunki analizy danych

Wykorzystanie zakłóconych kontrprób i zabiegów

62. Kontrpróby i zabiegi mogą zostać zakłócone przez nadmierną śmiertelność z powodu widocznej toksyczności, choroby lub błędu technicznego. Jeżeli zabieg jest zakłócony z powodu choroby lub błędu technicznego, do analizy dostępne powinny być trzy niezakłócone zabiegi z trzema niezakłóconymi kontrpróbami. W przypadku wystąpienia widocznej toksyczności w zabiegach z dużą zawartością substancji chemicznej zaleca się, aby do analizy dostępne były co najmniej trzy poziomy zabiegów z trzema niezakłóconymi kontrpróbami (zgodnie z podejściem opartym na maksymalnym tolerowanym stężeniu w odniesieniu do wytycznych OECD dotyczących badań (34)). Oprócz śmiertelności oznaki widocznej toksyczności mogą obejmować skutki behawioralne (np. unoszenie się na powierzchni, leżenie na dnie zbiornika, pływanie brzuchem do góry lub w nieregularny sposób, brak wynurzania się na powierzchnię), uszkodzenia morfologiczne (np. krwawiące uszkodzenia, obrzęk brzucha) lub zahamowanie normalnej reakcji żywieniowej w porównaniu jakościowym z reakcjami zwierząt z próby kontrolnej.

Próba kontrolna z rozpuszczalnikiem

63. Na zakończenie badania należy przeprowadzić ocenę potencjalnego wpływu rozpuszczalnika (jeśli wykorzystano). Dokonuje się tego, porównując statystycznie grupę kontrolną z rozpuszczalnikiem i grupę kontrolną z wodą rozcieńczającą. Najbardziej właściwe punkty końcowe, które należy uwzględnić w niniejszej analizie, to wyznaczniki wzrostu (masa i długość), ponieważ mogą na nie wpłynąć toksyczności ogólne. Jeżeli w

tych punktach końcowych wykryte zostaną statystycznie istotne różnice między grupą kontrolną z wodą rozcieńczającą a grupami kontrolnymi z rozpuszczalnikiem, należy odwołać się do swojej najlepszej wiedzy fachowej, aby ustalić, czy stanowią one zagrożenie dla ważności badania. Jeżeli dwie próby kontrolne różnią się od siebie, próby poddawane działaniu substancji chemicznej należy porównać z próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem, chyba że wiadomo, że najlepiej jest przeprowadzić porównanie z próbą kontrolną z wodą rozcieńczającą. Jeżeli między dwiema grupami kontrolnymi nie występuje statystycznie istotna różnica, zaleca się porównanie zabiegów, w ramach których zwierzęta poddaje się działaniu badanej substancji chemicznej z pulą zabiegową (grupami kontrolnymi z rozpuszczalnikiem i z wodą rozcieńczającą), chyba że wiadomo, że najlepiej jest dokonać porównania z próbą kontrolną z wodą rozcieńczającą albo z rozpuszczalnikiem.

Sprawozdanie z badania

64. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna:

- właściwości fizyczne i – w stosownych przypadkach – właściwości fizykochemiczne;
- Substancja jednoskładnikowa:
 - wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;
 - dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp. (w tym, w stosownych przypadkach, zawartość węgla organicznego).
- Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:
 - opisane w miarę możliwości przez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), występowania ilościowego oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

Badany gatunek:

- nazwa systematyczna, szczep (jeżeli jest dostępny), źródło i metoda pobierania zapłodnionych jaj i dalsze postępowanie;
- częstość występowania skoliozy w dotychczasowych próbach kontrolnych w odniesieniu do zastosowanej kultury wyjściowej.

Warunki badania:

- fotoperiod(-y);
- projekt badania (np. rozmiar komory, objętość materiału i wody, liczba komór badawczych oraz kontrprób, liczba organizmów użytych do badań na kontrpróbę);
- metoda przygotowania roztworów podstawowych i częstotliwość wymiany (jeżeli zastosowany został środek rozpuszczający, należy podać jego stężenie);
- metoda dawkowania badanej substancji chemicznej (np. pompy, układy rozcieńczające);
- wydajność odzyskowa metody i badane stężenia nominalne, granica oznaczalności, średnie wartości pomiarowych oraz ich odchylenia standardowe w naczyniach badawczych, a także metoda uzyskania takich wartości oraz dowody świadczące o tym, że pomiary odnoszą się do stężeń badanej substancji chemicznej w rzeczywistym roztworze;
- charakterystyka wody rozcieńczającej: pH, twardość, temperatura, stężenie rozpuszczonego tlenu, poziom chloru resztkowego (jeśli dokonano pomiaru), łączna zawartość jodu, całkowity węgiel organiczny (jeśli dokonano pomiaru), zawiesina (jeśli dokonano pomiaru), zasolenie środowiska badania (jeśli dokonano pomiaru) oraz wszelkie inne wykonane pomiary;
- badane stężenia nominalne, średnie wartości pomiarowych oraz ich odchylenia standardowe;
- jakość wody w naczyniach badawczych, pH, temperatura (codziennie) i stężenie rozpuszczonego tlenu;
- szczegółowe informacje dotyczące karmienia (np. rodzaj pokarmu, jego źródło, podawana ilość i częstotliwość podawania).

Wyniki:

- dowody świadczące o tym, że próby kontrolne spełniają kryteria ważności;
- dane dotyczące próby kontrolnej (oraz próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem, jeżeli jest stosowana) oraz grup poddanych zabiegowi, takie jak: zaobserwowana śmiertelność i nieprawidłowości, czas potrzebny do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera, ocena histologiczna tarczycy (tylko próbka osobników w stadium larwalnym), wzrost (masa i długość), wskaźnik hepatosomatyczny (tylko próbka osobników młodych), genetyczne/fenotypowe proporcje płci (tylko próbka osobników młodych), wyniki oceny histopatologicznej gonad, dróg rodnych, nerki i wątroby (tylko próbka osobników młodych) oraz VTG w osoczu (tylko próbka osobników młodych, jeżeli wykonano);
- metoda analizy statystycznej i przetwarzania danych (zastosowane badanie lub model statystyczny);

- stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC) w odniesieniu do każdej ocenionej reakcji;
 - najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC), w odniesieniu do każdej ocenionej reakcji (przy $\alpha = 0,05$); EC_x w odniesieniu do każdej ocenianej reakcji, jeżeli dotyczy, i przedziały ufności (np. 95 %) oraz wykres dopasowanego modelu wykorzystanego do obliczeń, nachylenie krzywej zależności stężenie-odpowiedź, wzór modelu regresji, szacowane parametry modelu i ich błędy standardowe;
 - wszelkie odchylenia od metody badawczej oraz odchylenia od kryteriów dopuszczalności, a także rozważania dotyczące potencjalnych konsekwencji wyniku badania.
65. W odniesieniu do wyników pomiarów punktów końcowych należy przedstawić średnie wartości oraz ich odchylenia standardowe (w miarę możliwości zarówno na podstawie kontrprób, jak i stężeń).
66. Medianę czasu potrzebnego do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera w próbach kontrolnych należy obliczyć i przedstawić jako średnią median kontrprób i ich odchyłeń standardowych. Analogicznie – w przypadku zabiegów medianę zabiegów należy obliczyć i przedstawić jako średnią median kontrprób i ich odchyłeń standardowych.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (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. Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 150, Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (3) Nieuwkoop PD i Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing Inc, Nowy Jork, NY, USA.
- (4) Kloas W i 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 i 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 i Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. *Zoological Science* 16: 335-340.
- (9) Mikamo K i 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 i 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 i 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 i 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 i 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 i 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 i 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) Rozdział C.4 niniejszego załącznika, Badanie szybkiej biodegradowalności
- (18) Rozdział C.29 niniejszego załącznika, Szybka biodegradowalność - CO₂ w szczelnie zamkniętych naczyniach (nad roztworem).
- (19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL i 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. Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 23. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ i 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 s.
- (25) Rozdział C.38 niniejszego załącznika, Badanie przeobrażenia płazów.
- (26) Rozdział C.48 niniejszego załącznika, Krótkoterminowe badanie rozrodczości ryb.
- (27) Rozdział C.41 niniejszego załącznika, Badanie rozwoju płciowego ryb.
- (28) Rozdział C.49 niniejszego załącznika, Badanie toksyczności ostrej na rybach embrionach (FET).
- (29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology.Environment. Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 82, Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC i Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415–424.
- (31) Luna LG i 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. Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 228, Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 54, Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (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.

Dodatek 1

DEFINICJE

Szczytowy punkt końcowy: mający wpływ na poziomie populacji.

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

ELISA: test immunoenzymatyczny.

EC_x: (stężenie efektywne x %) jest stężeniem mającym x % wpływ na organizmy użyte do badań w danym okresie narażenia w porównaniu z próbą kontrolną. Na przykład EC₅₀ jest stężeniem, które według szacunków ma wpływ na punkt końcowy badania w 50 % narażonej populacji w określonym okresie narażenia.

DPZ: dni po zapłodnieniu.

Badanie przepływowe: badanie, w którym podczas narażenia trwa ciągły przepływ roztworów do badań przez układ badawczy.

Oś HPG: oś podwzgórze–przysadka–gonady.

IUPAC: Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej.

Najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC): najmniejsze badane stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym obserwuje się znaczące działanie toksyczne (przy $p < 0,05$) w porównaniu z próbą kontrolną. Wszystkie badane stężenia powyżej LOEC powinny jednak wywierać szkodliwy skutek równy skutkom, które zaobserwowano przy LOEC, lub od nich większy. W przypadku gdy oba warunki nie mogą być spełnione, należy szczegółowo wyjaśnić, w jaki sposób wybrano LOEC (a następnie NOEC). W dodatku 7 przedstawiono wytyczne w tym zakresie.

Mediana stężenia śmiertelnego (LC₅₀): stężenie badanej substancji chemicznej szacowane jako stężenie śmiertelne dla 50 % organizmów użytych do badań podczas trwania badania.

Stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC): badane stężenie bezpośrednio poniżej LOEC, które nie wywiera statystycznie istotnego wpływu ($p < 0,05$) w ustalonym okresie narażenia w porównaniu z próbą kontrolną.

SMILES (ang. *Simplified Molecular Input Line Entry Specification*): uproszczony sposób zapisu struktury chemicznej w liniowej formie tekstowej.

Badana substancja chemiczna: dowolna substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

UVCB: substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub

materiały biologiczne.

VTG: witellogenina to fosfolipidoglikoproteinowy prekursor białek żółtka jajka występujący zwykle u aktywnych płciowo samic wszystkich gatunków jajorodnych.

Dodatek 2**NIEKTÓRE WŁAŚCIWOŚCI CHEMICZNE DOPUSZCZALNEJ WODY ROZCIEŃCZAJĄCEJ**

Substancja	Stężenie graniczne
Cząstki stałe	5 mg/l
Całkowity węgiel organiczny	2 mg/l
Amoniak niejonizowany	1 µg/l
Chlor resztkowy	10 µg/l
Całkowita zawartość pestycydów fosforoorganicznych	50 ng/l
Całkowita zawartość pestycydów chloroorganicznych oraz polichlorowanych bifenyli	50 ng/l
Całkowity chlor organiczny	25 ng/l
Glin	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Chrom	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Miedź	1 µg/l
Żelazo	1 µg/l
Ołów	1 µg/l
Nikiel	1 µg/l
Cynk	1 µg/l
Kadm	100 ng/l
Rtęć	100 ng/l
Srebro	100 ng/l

Dodatek 3**WARUNKI BADANIA WŁAŚCIWE DLA BADANIA LAGDA**

- | | |
|--|--|
| 1. Badany gatunek | <i>Xenopus laevis</i> |
| 2. Rodzaj badania | W warunkach ciągłego przepływu |
| 3. Temperatura wody | Temperatura nominalna wynosi 21 °C. Średnia temperatura podczas badania wynosi 21 ± 1 °C (różnice między kontrpróbami i między zabiegami nie powinny przekraczać 1,0 °C). |
| 4. Jakość oświetlenia | Fluorescencyjne żarówki (szerokie spektrum) o natężeniu oświetlenia 600–2000 luksów (lumenów/m ²) przy powierzchni wody. |
| 5. Fotoperiod | 12 godzin światła, 12 godzin bez dostępu światła. |
| 6. Objętość roztworu do badań i naczynie badawcze (zbiornik) | 4–10 l (głębokość wody co najmniej 10–15 cm).
Akwarium wykonane ze szkła lub stali nierdzewnej. |
| 7. Wymiana objętości roztworów do badań | Stała, ze względu na utrzymanie zarówno warunków biologicznych, jak i narażenia chemicznego (np. 5 wymian objętości zbiornika na dzień). |
| 8. Początkowy wiek organizmów użytych do badań | 8.–10. stadium według Nieuwkoopa i Fabera. |
| 9. Liczba organizmów na kontrpróbę | 20 zwierząt (zarodków) na zbiornik (kontrpróbę) w momencie rozpoczęcia narażenia i 10 zwierząt (osobników młodych) na zbiornik (kontrpróbę) po osiągnięciu 66. stadium według Nieuwkoopa i Fabera aż do zakończenia narażenia. |
| 10. Liczba zabiegów | Co najmniej 4 zabiegi z użyciem badanej substancji chemicznej oraz odpowiednie próby kontrolne. |
| 11. Liczba kontrprób na zabieg | 4 kontrpróby na zabieg poddania działaniu badanej substancji chemicznej i 8 kontrprób na potrzeby próby kontrolnej (prób kontrolnych). |
| 12. Liczba organizmów na badane stężenie | Co najmniej 80 zwierząt na zabieg poddania działaniu badanej substancji chemicznej i co najmniej 160 kontrprób na potrzeby próby kontrolnej (prób kontrolnych). |
| 13. Woda rozcieńczająca | Dowolna woda umożliwiająca normalny wzrost i rozwój płaty szponiastej (np. woda źródlana lub woda wodociągowa przefiltrowana przez filtr węglowy). |
| 14. Napowietrzanie | Nie jest wymagane, ale napowietrzenie zbiorników może być konieczne, jeżeli poziomy stężenia rozpuszczonego tlenu spadną |

poniżej zalecanych wartości granicznych, a wzrost przepływu roztworu do badań jest maksymalizowany.

- | | |
|--|---|
| 15. Stężenie rozpuszczonego tlenu w roztworze do badań | Rozpuszczony tlen: wartość nasycenia powietrzem ≥ 40 % lub $\geq 3,5$ mg/l. |
| 16. pH roztworu do badań | 6,5–8,5 (różnice między kontrpróbami i między zabiegami nie powinny przekraczać 0,5). |
| 17. Twardość i zasadowość roztworu do badań | 10–250 mg CaCO_3 /l |
| 18. Schemat żywienia | (Zob. dodatek 4) |
| 19. Okres narażenia | Od 8.–10. stadium według Nieuwkoopa i Fabera do dziesięciu tygodni po medianie czasu potrzebnego do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera w wodzie lub grupie kontrolnej z rozpuszczalnikiem (maksymalnie 17 tygodni). |
| 20. Biologiczne punkty końcowe | Śmiertelność (i nietypowy wygląd), czas potrzebny do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera (próbka osobników w stadium larwalnym), ocena histologiczna tarczycy (próbka osobników w stadium larwalnym), wzrost (masa i długość), wskaźnik hepatosomatyczny (próbka osobników młodych), genetyczne/fenotypowe proporcje płci (próbka osobników młodych), badanie histopatologiczne gonad, dróg rodnych, nerek i wątroby (próbka osobników młodych) oraz witellogenina w osoczu (w próbce osobników młodych, opcjonalnie). |
| 21. Kryteria ważności badania | Stężenie rozpuszczonego tlenu powinno zapewniać wartość nasycenia powietrzem na poziomie >40 %; średnia temperatura wody powinna wynosić 21 ± 1 °C, a różnice między kontrpróbami i między zabiegami powinny wynosić $<1,0$ °C; pH roztworu do badań powinno mieścić się w zakresie 6,5–8,5; śmiertelność w grupie kontrolnej powinna wynosić ≤ 20 % w każdej kontrpróbie, a średni czas potrzebny do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera w grupie kontrolnej powinien wynosić ≤ 45 dni; średnia masa organizmów użytych do badań w 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera i na zakończenie testu w próbach kontrolnych i próbach kontrolnych z rozpuszczalnikiem (jeżeli są stosowane) powinna wynosić odpowiednio $1,0 \pm 0,2$ i $11,5 \pm 3$ g. powinny być dostępne dowody pozwalające wykazać, że stężenia badanej substancji chemicznej w roztworze utrzymano w granicach ± 20 % średnich wartości pomiarowych. |

Dodatek 4

SCHEMAT ŻYWIENIA

Należy zaznaczyć, że mimo iż zaleca się stosować niniejszy schemat żywienia, dopuszcza się stosowanie metod alternatywnych, pod warunkiem że organizmy użyte do badań rosną i rozwijają się w odpowiednim tempie.

Karmienie osobników w stadium larwalnym

Przygotowanie diety larw

- A. 1:1 (obj.) pokarmu dla młodych pstrągów: glony / TetraFin® (lub równoważnik);
1. Pokarm dla młodych pstrągów: 50 g pokarmu dla młodych pstrągów (drobnych granulek lub proszku) należy blendować z 300 ml odpowiedniej, przefiltrowanej wody na wysokich obrotach przez 20 sekund.
 2. Glony / mieszanka TetraFin® (lub równoważnik): 12 g spiruliny w tabletkach należy blendować z 500 ml przefiltrowanej wody na wysokich obrotach przez 40 sekund, 12 g karmy TetraFin® (lub równoważnika) blendować z 500 ml przefiltrowanej wody, a następnie połączyć te dwie mieszaniny, aby uzyskać 1 l spiruliny o stężeniu 12 g/l i TetraFin® (lub równoważnika) o stężeniu 12 g/l.
 3. Należy połączyć równe objętości zblendowanego pokarmu dla młodych pstrągów i glonów / mieszaniny TetraFin® (lub równoważnika).

B. Solowce:

15 ml jaj solowców wylęga się w 1 l słonej wody (przygotowanej przez dodanie 20 ml NaCl do 1 l wody dejonizowanej). Po napowietrzaniu przez 24 godziny w temperaturze pokojowej przy stałym świetle solowce pobiera się. Zatrzymując napowietrzenie, pozawala się solowcom krótkotrwale odstać przez 30 minut. Cysty, które wypłyną na powierzchnię pojemnika, odlewa się i usuwa, a solowce przelewa się przez odpowiednie filtry i uzupełnia do 30 ml przefiltrowaną wodą.

Protokół karmienia

W tabeli 1 podano dane referencyjne dotyczące rodzaju i ilości pokarmu stosowanego na etapie narażenia osobników w stadiach larwalnych. Zwierzęta należy karmić trzy razy dziennie od poniedziałku do piątku i raz dziennie w weekendy.

Tabela 1: Schemat żywienia larw platany szponiastej w warunkach przepływu

Czas* (po zapłodnieniu)	Pokarm dla młodych pstrągów: glony/TetraFin® (lub równoważnik)		Solowce	
	Dzień roboczy (3 razy dziennie)	Weekend (1 raz dziennie)	Dzień roboczy (dwa razy dziennie)	Weekend (1 raz dziennie)

Dni 4–14 (w tygodniach 0–1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (od dnia 8 do 15)	0,5 ml (od dnia 8 do 15)
Tydzień 2	0,67 ml	2,4 ml	1 ml (od dnia 16)	1 ml (od dnia 16)
Tydzień 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Tydzień 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Tydzień 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
Tydzień 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Tydzień 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Tygodnie 8–10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

* Dzień 0 oznacza dzień wykonania zastrzyku z hCG.

Przejście z pokarmu dla larw na pokarm dla osobników młodych

Po całkowitym przeobrażeniu larwy przechodzą na dietę dla osobników młodych opracowywaną zgodnie z poniższym opisem. W czasie tego przejścia należy zmniejszać ilość pokarmu dla larw i zwiększać ilość pokarmu dla osobników młodych. Można to przeprowadzić, stopniowo zmniejszając ilość pokarmu dla larw, jednocześnie stopniowo zwiększając ilość pokarmu dla osobników młodych, gdy każda z grup pięciu kijanek ukończy 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera oraz zbliży się do ukończenia przeobrażenia w 66. stadium według Nieuwkoopa i Fabera.

Karmienie osobników młodych

Dieta osobników młodych

Po zakończeniu procesu przeobrażania (w 66. stadium) schemat żywienia zmienia się i zwierzętom podaje się wyłącznie wysokiej jakości opadający na dno pokarm dla żab o rozmiarze 3/32 cala (Xenopus Express™, Floryda, Stany Zjednoczone) lub równoważny.

Przygotowywanie pokruszonego granulatu do stosowania w okresie przejścia ze stadium larwalnego do stadium młodocianego

Granulki opadającego na dno pokarmu dla żab przez krótki czas rozdrabnia się w młynku do kawy, blenderze lub kruszy za pomocą moździerza i tłuczka w celu zmniejszenia rozmiaru granulek o około 1/3. Nie zaleca się zbyt długiego przetwarzania, ponieważ prowadzi to do powstania proszku.

Protokół karmienia

W **tabeli 2** podano dane referencyjne dotyczące rodzaju i ilości paszy stosowanej w młodocianym i dorosłym stadium rozwoju. Zwierzęta należy karmić raz dziennie. Należy

zaznaczyć, że w okresie przeobrażenia zwierzęta nadal otrzymują porcję solowców aż do momentu, w którym >95 % zwierząt zakończy przeobrażanie.

Zwierząt nie należy karmić w dniu zakończenia badania, aby pasza nie zakłócała pomiarów masy.

Tabela 2: Schemat żywienia młodych osobników płatany szponiastej w warunkach przepływu. Należy zaznaczyć, że nieprzeobrażone zwierzęta, w tym te, których przeobrażenie zostało opóźnione w wyniku poddania działaniu substancji chemicznej, nie potrafią jeść niepokruszonego granulatu.

Czas (tygodnie po medianie daty przeobrażenia)	Objętość pokruszonego granulatu (mg na młodą żabę)	Objętość niepokruszonego granulatu (mg na młodą żabę)
W momencie zakończenia przeobrażenia	25	0
Tygodnie 0–1	25	28
Tygodnie 2–3	0	110
Tygodnie 4–5	0	165
Tygodnie 6–9	0	220

* Pierwszy dzień tygodnia 0 oznacza medianę daty przeobrażenia zwierząt z próby kontrolnej.

Dodatek 5

OKREŚLANIE PŁCI GENETYCZNEJ

Metoda określania płci genetycznej platany szponiastej opiera się na metodzie opisanej przez Yoshimoto *et al.* 2008. W razie potrzeby ze szczegółowymi procedurami dotyczącymi typowania genetycznego można się zapoznać w tej publikacji. Można korzystać z metod alternatywnych (np. łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym o wysokiej przepustowości), jeżeli okażą się odpowiednie.

Startery platany szponiastej

Marker DM-W

Sensowny: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Antysensowny: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Kontrola dodatnia

Sensowny: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Antysensowny: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Oczyszczanie DNA

Należy oczyścić DNA z tkanki mięśniowej lub skóry, używając np. Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (o numerze katalogowym 69506) lub podobnego produktu zgodnie z instrukcjami dołączonymi do zestawu. W przypadku gdy jest to konieczne do PCR, DNA można wymywać z kolumn typu spin, używając mniejszej ilości roztworu buforowego, aby otrzymać próbki o wyższym stężeniu. Należy zauważyć, że DNA jest dosyć stabilne, dlatego trzeba zachować ostrożność, aby nie dopuścić do zanieczyszczenia krzyżowego, które mogłoby prowadzić do błędnej charakterystyki samców jako samic lub odwrotnie.

PCR

Przykładowy protokół dotyczący stosowania JumpStart™ Taq firmy Sigma przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1: Przykładowy protokół dotyczący stosowania JumpStart™ Taq firmy Sigma

Mieszanina główna	1x (μl)	stężenie
-------------------	---------	----------

		końcowej
Woda wolna od nukleaz (NFW)	11	-
10X roztwór buforowy	2,0	-
MgCl ₂ (25 mM)	2,0	2,5 mM
Deoksynukleotydy (dNTP) (10 mM każdy)	0,4	200 μM
Marker startera (8 μM)	0,8	0,3 μM
Marker startera antysensownego (8 μM)	0,8	0,3 μM
Próba kontrolna startera (8 μM)	0,8	0,3 μM
Próba kontrolna startera antysensownego (8 μM)	0,8	0,3 μM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 jednostek/μl
Wzorzec DNA	1,0	~200 pg/μl

Uwaga: należy przygotować większą ilość mieszaniny głównej, aby uwzględnić straty, które mogą nastąpić podczas pipetowania (np. 25x można wykorzystać jedynie do 24 reakcji).

Reakcja:

Mieszanina główna 19,0 μl

Wzorzec 1,0 μl

Ogółem 20,0 μl

Charakterystyka termocyklera:

Krok 1. 94 °C 1 minuta

Krok 2. 94 °C 30 sekund

Krok 3. 60 °C 30 sekund

Krok 4. 72 °C 1 minuta

Krok 5. Zob. krok 2. 35 cykli

Krok 6. 72 °C 1 minuta

Krok 7. 4 °C utrzymać

Produkty powstałe w wyniku PCR można od razu wykorzystać w żelu lub przechowywać w temperaturze 4 °C.

Elektroforeza w żelu agarozowym (3 %) (przykładowy protokół)*50X TAE*

Tris 24,2 g
Kwas octowy lodowaty 5,71 ml
Na₂ (EDTA)·2H₂O 3,72 g
Dodać wodę do uzyskania 100 ml

1X TAE

H₂O 392 ml
50X TAE 8 ml

3:1 agarozy

3 części agarozy NuSieve™ GTG™
1 część agarozy Fishera o niskiej elektroosmozie

Metoda

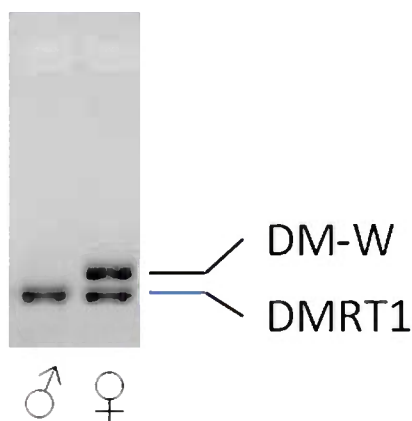
1. Przygotować 3 % żel, dodając 1,2 g mieszanki agarozy do 43 ml 1X TAE. Mieszać do rozpadu dużych grudek.
2. Podgrzewać mieszaninę agarozy w kuchence mikrofalowej do całkowitego rozpuszczenia (unikając wykipienia). Zostawić, aby trochę ostygła.
3. Dodać 1,0 µl bromku etydyny (10 mg/ml). Zamieszać kolbą. Należy zauważyć, że bromek etydyny jest mutageny, więc w tym kroku – w miarę istnienia technicznych możliwości – należy stosować alternatywne substancje chemiczne, aby zminimalizować zagrożenie dla zdrowia pracowników¹.
4. Wlać żel do formy przy użyciu grzebień. Ostudzić całkowicie.
5. Nanieść żel na aparaturę. Przykryć żel 1X TAE.

¹ Zgodnie z art. 4 ust. 1 dyrektywy 2004/37/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. w sprawie ochrony pracowników przed zagrożeniem dotyczącym narażenia na działanie czynników rakotwórczych lub mutagenów podczas pracy (szósta dyrektywa szczegółowa w rozumieniu art. 16 ust. 1 dyrektywy Rady 89/391/EWG) (Dz.U. L 158 z 30.4.2004, s. 50).

6. Dodać 1 µl 6x barwnika do nanoszenia do każdego 10 µl produktu powstałego w wyniku PCR.
7. Przenieść próbki do dołków za pomocą pipety.
8. Włączyć aparaturę przy stałym napięciu 160 woltów na ~20 minut.

Obraz żelu agarozowego pokazującego wzory prążków charakterystycznych dla osobników płci męskiej i żeńskiej przedstawiono na **rys. 1**.

Rys. 1: Obraz żelu agarozowego pokazujący wzór prążków charakterystycznych dla osobników płci męskiej (♂) (pojedyncze pasmo ~203 pz: DMRT1) i żeńskiej (♀) (dwa prążki ~259 pz: DM-W i 203 pz: DMRT1)



BIBLIOGRAFIA

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.

Dodatek 6

POMIAR WITELLOGENINY

Pomiaru witellogeniny (VTG) dokonuje się przy użyciu metody wykorzystującej test immunoenzymatyczny (ELISA), którą początkowo opracowano dla VTG strzebli wielkogłowej (Parks *et al.*, 1999). Obecnie na rynku nie ma dostępnych przeciwciał dla platany szponiastej. Biorąc pod uwagę bogactwo informacji na temat tego białka i dostępność opłacalnych usług w zakresie komercyjnej produkcji przeciwciał, rozsądne wydaje się jednak, że laboratoria mogą łatwo opracować test ELISA w celu dokonanie tego pomiaru (Olmstead *et al.*, 2009). Olmstead *et al.* (2009) podają również opis testu zmodyfikowanego pod kątem VTG u afrykańskiej żaby szponiastej, jak podano poniżej. W metodzie tej wykorzystuje się przeciwciało anty-VTG afrykańskiej żaby szponiastej, ale wiadomo, że działa ono również na VTG platany szponiastej. Należy zaznaczyć, że można również stosować niekompetycyjne testy ELISA oraz że mogą one posiadać niższe granice wykrywalności niż metoda opisana poniżej.

Materiały i odczynniki

- preadsorbowana surowica zawierająca przeciwciała pierwszorzędowe

Zmieszać 1 część surowicy zawierającej przeciwciała pierwszorzędowe anty-VTG afrykańskiej żaby szponiastej z 2 częściami osocza pobranego od samca z próby kontrolnej i pozostawić w temperaturze pokojowej na ~75 minut, położyć na lodzie na 30 minut, odwirować przy $>20K \times G$ przez 1 godzinę w temperaturze 4 °C, usunąć supernatant, podzielić na podwielokrotności, przechowywać w temperaturze -20 °C.

- przeciwciała drugorzędowe

koniugat kozi antykróliczy IgG-HRP (np. Bio-Rad 172–1019)

- wzorzec VTG

oczyszczona VTG platany szponiastej o stężeniu 3,3 mg/ml

- TMB (3,3',5,5' tetrametylobenzydina) (np. KPL 50-76-00 lub Sigma T0440)
- normalna surowica kozia (np. Chemicon® S26-100 ml)
- 96-dołkowe polistyrenowe mikropłytki do testów immunoenzymatycznych (np. ICN: 76-381-04, Costar:53590, Fisher:07-200-35)
- ciepłarka laboratoryjna do płytek utrzymująca temperaturę 37 °C (lub szybko odzyskujący równowagę inkubator powietrzny), łaźnia wodna do probówek
- pozostały zwykły sprzęt laboratoryjny, substancje chemiczne i materiały

Receptury

Roztwór buforowy opłaszczający (50 mM bufora węglanowego, pH 9,6):

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

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

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

Roztwór buforowy do przemywania (PBST):

10X PBS	100 ml
woda	900 ml

Wyregulować pH do 7,3 za pomocą 1 M HCl, a następnie dodać 0,5 ml Tween-20.

Bufor testowy:

normalna surowica kozia 3,75 ml

Roztwór buforowy do przemywania 146,25 ml

Pobieranie próbek

Krew pobiera się przy pomocy kapilary mikrohematokrytowej powlekanej heparyną, którą umieszcza się na lodzie. Po odwirowaniu przez 3 minuty kapilarę ocenia się, otwiera, a osocze przelewa się do probówek do mikrowirówki o pojemności 0,6 ml, które zawierają 0,13 jednostki liofilizowanej aprotyniny (probówki te przygotowuje się z wyprzedzeniem, dodając odpowiednią ilość aprotyniny, zamrażając i liofilizując w wirówce, w niskiej temperaturze, aż do wyschnięcia). Osocze należy przechowywać w temperaturze -80 °C do momentu poddania go analizie.

Procedura dla jednej płytki

Powlekanie płytki

Zmieszać 20 µl oczyszczonego VTG z 22 ml bufora węglanowego (stężenie końcowe: 3 µg/ml). Dodać 200 µl roztworu do każdego dołka na wykorzystywanej płytce 96-dołkowej. Pokryć płytkę samoprzylepną folią uszczelniającą i pozostawić do inkubacji w temperaturze

37 °C przez 2 godziny (lub w temperaturze 4 °C przez noc).

Blokowanie płytki

Roztwór blokujący przygotowuje się, dodając 2 ml normalnej surowicy koziej do 38 ml bufora węglanowego. Usunąć roztwór powlekający i otrząsnąć do sucha. Dodać 350 µl roztworu blokującego do każdego dołka. Pokryć płytkę samoprzylepną folią uszczelniającą i pozostawić do inkubacji w temperaturze 37 °C przez 2 godziny (lub w temperaturze 4 °C przez noc).

Przygotowanie wzorców

5,8 µl wzorca oczyszczonej VTG wymieszać z 1,5 ml bufora testowego w jednorazowej szklanej probówce borokrzemowej o wymiarach 12 x 75 mm. Uzyskane stężenie wznosi 12 760 ng/ml. Następnie tworzy się serię rozcieńczeń w postępie geometrycznym, dodając 750 µl poprzedniego rozcieńczenia do 750 µl bufora testowego, aby uzyskać stężenia końcowe wynoszące 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 i 50 ng/ml.

Przygotowanie próbek

Rozpocząć od rozcieńczenia osocza w buforze testowym w stosunku 1:300 (np. połączyć 1 µl osocza z 299 µl bufora testowego) lub 1:30. Jeżeli oczekuje się dużej ilości VTG, konieczne może być przygotowanie dodatkowych roztworów lub roztworów bardziej rozcieńczonych. Należy dążyć do utrzymania wartości B/B₀ w zakresie wzorców. W przypadku próbek, w których ilość VTG nie jest znaczna, np. u samców i samic w próbie kontrolnej (z których wszystkie są niedojrzałe), należy stosować roztwór o stosunku 1:30. W roztworach rozcieńczonych w mniejszym stopniu niż określono powyżej mogą pojawiać się niepożądane wpływy matrycy.

Ponadto zaleca się przeprowadzenie analizy próby kontrolnej dodatniej w odniesieniu do każdej płytki. Próba ta pochodzi z puli osocza zawierającego wysoko indukowane poziomy VTG. Pulę tę najpierw rozcieńcza się w normalnej surowicy koziej, dzieli na podwielokrotności i przechowuje w temperaturze -80 °C. Dla każdej płytki podwielokrotność rozmraża się, jeszcze bardziej rozcieńcza w buforze testowym i analizuje podobnie jak próbkę testową.

Inkubacja z przeciwciałami pierwszorzędowymi

Przeciwciała pierwszorzędowe przygotowuje się, rozpuszczając preadsorbowaną surowicę zawierającą przeciwciała pierwszorzędowe w buforze testowym w stosunku 1:2 000 (np. 8 µl do 16 ml bufora testowego). 300 µl roztworu zawierającego przeciwciała pierwszorzędowe należy połączyć z 300 µl próbki/wzorca w szklanej probówce. Probówkę B₀ przygotowuje się podobnie – przy użyciu 300 µl bufora testowego oraz 300 µl przeciwciał. Należy także przygotować probówkę z NSB, korzystając wyłącznie z 600 µl bufora testowego, czyli bez przeciwciał. Przykryć probówki folią uszczelniającą i delikatnie wymieszać w wirówce. Pozostawić do inkubacji w temperaturze 37 °C przez 1 godzinę.

Mycie płytki

Umyć płytkę tuż przed zakończeniem inkubacji przeciwciała pierwszorzędowego. Odbywa się to poprzez wytrząśnięcie zawartości i osuszenie na chłonnym papierze. Następnie dołki należy wypełnić 350 μ l roztworu do mycia, opróżnić i osuszyć. Przydatna jest tu automatyczna pipeta wielokanałowa lub płuczka do płytek. Etap mycia powtarza się jeszcze dwukrotnie, czyli łącznie płytki myje się trzykrotnie.

Zapełnianie płytki

Po umyciu płytki probówki należy wyjąć z łaźni wodnej i lekko odwirować. Dodać 200 μ l z każdej próbki, wzorca, B_0 oraz probówki z NSB do zduplikowanych dołków na płytce. Płytkę należy pokryć samoprzylepną folią uszczelniającą i pozostawić do inkubacji w temperaturze 37 °C przez 1 godzinę.

Inkubacja z przeciwciałami drugorzędowymi

Po zakończeniu inkubacji, która ma miejsce na poprzednim etapie, płytkę należy ponownie trzykrotnie przemyć w sposób opisany powyżej. Rozcieńczony roztwór przeciwciał drugorzędowych przygotowuje się, mieszając 2,5 μ l przeciwciał drugorzędowych z 50 ml bufora testowego. Do każdego dołka należy dodać 200 μ l rozcieńczonego roztworu przeciwciał drugorzędowych, uszczelnić jak opisano wyżej i pozostawić do inkubacji przez 1 godzinę w temperaturze 37 °C.

Dodanie substratu

Po zakończeniu inkubacji z przeciwciałami drugorzędowymi należy przemyć płytkę trzykrotnie w sposób opisany powyżej. Do każdego dołka należy dodać 100 μ l substratu TMB. Należy umożliwić zajście reakcji przez 10 minut, najlepiej przy słabym oświetleniu. Reakcję należy zatrzymać, dodając 100 μ l 1 M kwasu fosforowego. W wyniku tego działania barwa zmieni się z niebieskiej na intensywnie żółtą. Należy zmierzyć absorbancję przy 450 nm, korzystając z czytnika płytek.

Obliczanie B/B₀

Należy odjąć średnią wartość NSB od wszystkich pomiarów. Wartość B/B₀ dla każdej próbki i wzorca oblicza się, dzieląc wartość absorbancji (B) przez średnią absorbancję próbki B₀.

Uzyskiwanie krzywej wzorcowej i określenie nieznanymi ilości

Przy pomocy oprogramowania do tworzenia wykresów (np. Slidewrite™ lub Sigma Plot®) należy wygenerować krzywą wzorcową, która dokona ekstrapolacji ilości z B/B₀ próbki w oparciu o B/B₀ wzorca. Zazwyczaj ilość jest wykreślana na skali logarytmicznej, a krzywa ma kształt sigmoidalny. W przypadku stosowania wąskiego zakresu wzorców może jednak wydawać się, że wykres jest liniowy. Należy skorygować ilości próbek o współczynnik

rozcieńczenia i podać jako mg VTG/ml osocza.

Określenie minimalnych granic wykrywalności

Sposób raportowania wyników z niskich wartości często nie jest jasny, szczególnie w przypadku normalnych samców. W takich przypadkach do określenia, czy wartość należy zarejestrować jako zero, czy też jako inną liczbę, należy wykorzystać 95 % granice ufności. Jeżeli wynik próbki mieści się w przedziale ufności wzorca zerowego (B_0), wynik należy zgłosić jako zero. Minimalny poziom wykrywalności będzie najniższym wzorcem, konsekwentnie odbiegającym od wzorca zerowego; oznacza to, że dwa przedziały ufności nie pokrywają się. W odniesieniu do każdego wyniku próbki, który mieści się w granicach ufności dla minimalnego poziomu wykrywalności lub jest od niego wyższy, rejestruje się obliczoną wartość. Jeżeli próbka mieści się w przedziale między wzorcem zerowym a przedziałami minimalnego poziomu wykrywalności, należy podać połowę minimalnego poziomu wykrywalności dla wartości tej próbki.

BIBLIOGRAFIA

- 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.

Dodatek 7

ANALIZA STATYSTYCZNA

W badaniu LAGDA generowane są trzy rodzaje danych, które należy poddać analizie statystycznej: 1) ilościowe dane ciągłe, 2) dane dotyczące czasu do wystąpienia wydarzenia w odniesieniu do tempa rozwoju (czas potrzebny do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera) oraz 3) dane porządkowe w postaci stopnia nasilenia lub stadiów rozwojowych określonych na podstawie ocen histopatologicznych. Zalecane drzewo decyzyjne analizy statystycznej na potrzeby badania LAGDA przedstawiono na wykresie 1. Poniżej przedstawiono również niektóre adnotacje, które mogą być potrzebne do przeprowadzenia analizy statystycznej pomiarów uzyskanych w wyniku badania LAGDA. W przypadku drzewa decyzyjnego wyniki pomiarów w odniesieniu do śmiertelności, wzrostu (masa i długość) oraz wskaźnika hepatosomatycznego (LSI) należy analizować zgodnie z gałęzią „inne punkty końcowe”.

Dane ciągłe

Dane dotyczące ciągłych punktów końcowych należy najpierw sprawdzić pod kątem monotoniczności poprzez przekształcenie danych w ranking, dopasowanie do modelu ANOVA oraz porównanie kontrastów liniowych i kwadratowych. Jeżeli dane są monotoniczne, należy wykonać regresyjny test trendu Jonckheere'a-Terpstry na medianach kontrastów i nie należy stosować żadnych dalszych analiz. Metodą alternatywną pozyskiwania danych, które są zwykle rozprawdane z jednorodnymi wariancjami, jest regresyjny test Williamsa. Jeżeli dane są niemonotoniczne (kontrast kwadratowy jest znaczący, a liniowy nie jest znaczący), należy je analizować przy użyciu modelu mieszanego ANOVA. Dane należy następnie ocenić pod kątem normalności (preferuje się stosowanie testu Shapiro-Wilka lub testu Andersona-Darlinga) i jednorodności wariancji (preferuje się stosowanie testu Levene'a). Oba testy przeprowadza się na resztach modelu mieszanego ANOVA. Zamiast tych formalnych badań normalności i jednorodności wariancji można oprzeć się na swojej najlepszej wiedzy, jednak preferowane są badania formalne. Jeżeli dane mają rozkład normalny o jednorodnej wariancji, wówczas założenia modelu mieszanego ANOVA uznaje się za spełnione, a istotny wynik zabiegu określa się na podstawie testu Dunnetta. W przypadku stwierdzenia odchylenia od normy lub niejednorodności wariancji naruszane są założenia Dunnetta i należy dążyć do transformacji normalizującej i stabilizującej wariancję. Jeśli taka transformacja nie zostanie wykryta, wówczas istotny wynik zabiegu jest określany na podstawie testu Dunna. Gdy tylko to możliwe, analizę dwuczynnikową należy zastąpić analizą jednoczynnikową, jednak określenie, która z nich jest odpowiednia dla danego punktu końcowego, wymaga profesjonalnego osądu.

Śmiertelność

Dane dotyczące śmiertelności należy analizować w odniesieniu do całego okresu badania i należy wyrazić je jako odsetek padnięć w danym zbiorniku. Liczby kijanek, które w danym

okresie nie dokończą przeobrażenia, kijanek, które znajdują się w kohorcie podpróbek osobników w stadium larwalnym, młodych żab, które zostają wyeliminowane, oraz wszystkich zwierząt, które umierają z powodu błędu eksperymentatora, należy traktować jako dane cenzurowane i nie należy uwzględniać ich w mianowniku obliczenia procentowego. Przed przystąpieniem do jakichkolwiek analiz statystycznych należy przekształcić odsetek upadkowości w pierwiastek kwadratowy arcsin. Metodą alternatywną będzie regresyjny test Cochran-Armitage'a, ewentualnie z korektą Rao-Scotta w przypadku nadmiernego rozproszenia.

Masa i długość (dane dotyczące wzrostu)

W czasie przeobrażenia samce i samice nie wykazują dymorfizmu płciowego, dlatego analiza danych dotyczących wzrostu na podstawie pobranych podpróbek osobników w stadium larwalnym powinna być niezależna od płci. Dane dotyczące wzrostu osobników młodych powinny jednak podlegać oddzielnej analizie na podstawie płci genetycznej. W przypadku tych punktów końcowych konieczne może okazać się uwzględnienie przekształcenia logarytmicznego, ponieważ naturalny logarytm danych dotyczących wielkości nie jest rzadkością.

Wskaźnik hepatosomatyczny (LSI)

Wagę wątroby należy znormalizować w stosunku do masy całego ciała (tj. LSI) i analizować oddzielnie na podstawie płci genetycznej.

Czas potrzebny do osiągnięcia 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera

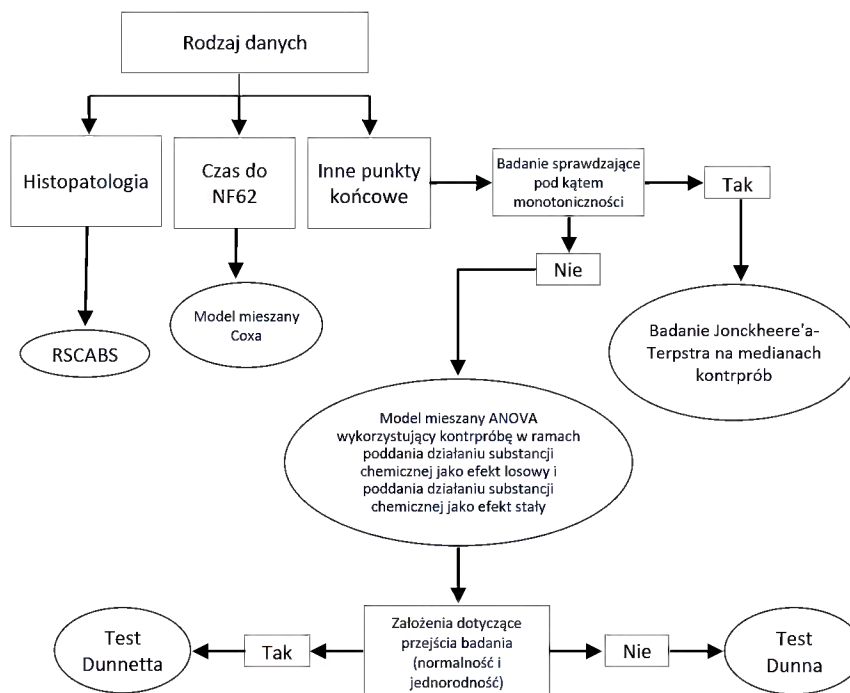
Dane dotyczące czasu potrzebnego do przeobrażenia należy traktować jako dane dotyczące czasu do wystąpienia zdarzenia, przy czym dane dotyczące śmiertelności lub osobników, które nie osiągnęły 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera w ciągu 70 dni, należy traktować jako dane ucięte prawostronnie (tzn. rzeczywista wartość jest większa niż 70 dni, ale badanie kończy się przed osiągnięciem 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera w ciągu 70 dni). Do określenia daty zakończenia badania należy wykorzystać medianę czasu potrzebnego do zakończenia przeobrażenia w 62. stadium według Nieuwkoopa i Fabera w próbie kontrolnej z wodą rozcieńczającą. Medianę czasu potrzebnego do zakończenia przeobrażenia można określić za pomocą estymatorów Kaplana-Meiera. Ten punkt końcowy należy analizować przy użyciu modelu mieszanego proporcjonalnego hazardu Coxa z uwzględnieniem struktury kontrprób badania.

Dane histopatologiczne (stopnie nasilenia i stadia rozwojowe)

Dane histopatologiczne prezentowane są w postaci stopni nasilenia lub stadiów rozwojowych. W teście RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) wykorzystuje się regresyjny test trendu Cochran-Armitage'a z korektą Rao-Scotta na każdym poziomie skali nasilenia objawów w reakcji histopatologicznej (Green *et al.*, 2014). Korekta Rao-Scotta wprowadza do testu plan doświadczalny naczyń z kontrpróbą. Procedura „by Slices” uwzględnia przewidywanie biologiczne, że stopień nasilenia objawów zazwyczaj rośnie

wraz z rosnącym badanym stężeniem lub dawką, przy jednoczesnym zachowaniu indywidualnych wyników i ujawnieniu nasilenia każdego stwierdzonego efektu. Procedura RSCABS nie tylko określa, które zabiegi odbiegają statystycznie od kontroli (tj. wykazują większe nasilenie zmian patologicznych niż kontrole), ale także, przy jakim stopniu dotkliwości występuje rozbieżność, tym samym nadając analizie bardzo potrzebny kontekst. W przypadku stadiów rozwojowych gonad i dróg rodnych należy zastosować dodatkową manipulację danymi, ponieważ RSCABS zakłada, że nasilenie skutków wzrasta wraz z dawką. Obserwowanym skutkiem może być opóźnienie lub przyspieszenie rozwoju. Dlatego też dane dotyczące etapów rozwoju powinny być analizowane w taki sposób, w jaki zostały zgłoszone w celu wykrycia przyspieszenia rozwoju, a następnie przed drugą analizą poddane inwersji manualnej w celu wykrycia opóźnienia w rozwoju.

Rys. 1: Drzewo decyzyjne dot. analizy statystycznej danych LAGDA



BIBLIOGRAFIA

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

Dodatek 8

KWESTIE DOTYCZĄCE ŚLEDZENIA PRZEBIEGU I MINIMALIZOWANIA PRZYPADKÓW WYSTĘPOWANIA SKOLIOZY

Skolioza idiopatyczna, objawiająca się zwykle jako „zgięty ogon” u kijanek platany szponiastej, może utrudniać obserwacje morfologiczne i behawioralne w populacjach poddawanych badaniu. Należy dołożyć starań, aby zminimalizować częstość występowania skoliozy lub całkowicie ją wyeliminować, zarówno w stadzie, jak i w warunkach badania. Zaleca się, aby w badaniu ostatecznym częstość występowania umiarkowanej i ciężkiej skoliozy była mniejsza niż 10 % w celu zwiększenia ufności, że badanie może wykryć związane z zabiegiem skutki rozwojowe u zdrowych larw płazów.

W ramach codziennych obserwacji podczas badania ostatecznego należy rejestrować zarówno częstość występowania (indywidualna liczba), jak i nasilenie skoliozy, o ile występuje. Charakter nieprawidłowości należy opisać w odniesieniu do miejsca występowania (np. powyżej lub poniżej odbytu) i kierunku krzywizny (np. boczna lub grzbietobrzuszną). Stopień nasilenia można określić w następujący sposób:

(NZ): nieznaczny: nie zaobserwowano krzywizny;

1) minimalny: nieznaczna boczna krzywizna poniżej odbytu; widoczna tylko w stanie spoczynku;

2) umiarkowany: boczna krzywizna poniżej odbytu; widoczna przez cały czas, ale nie utrudnia ruchu;

3) znaczna: boczna krzywizna powyżej odbytu; LUB dowolna krzywizna utrudniająca ruch; LUB dowolna krzywizna grzbietobrzuszną.

Amerykański Naukowy Panel Doradczy EPA FIFRA (FIFRA SAP 2013) dokonał przeglądu danych podsumowujących skoliozę z piętnastu badań przeobrażeń u płazów z wykorzystaniem platany szponiastej (etap obejmujący 51.–60+ stadium według Nieuwkoopa i Fabera) i przedstawił ogólne zalecenia dotyczące zmniejszenia częstości występowania tej nieprawidłowości w populacjach poddawanych badaniu. Zalecenia te są istotne dla badania LAGDA, mimo że to badanie dotyczy dłuższego przebiegu rozwoju.

Historyczna efektywność tarła

Ogólnie rzecz biorąc, pary hodowlane powinny składać się ze zdrowych dorosłych osobników o dobrych cechach; wyeliminowanie par hodowlanych, które produkują potomstwo ze skoliozą, może z czasem zminimalizować jej występowanie. Szczególnie korzystne może być zminimalizowanie wykorzystania dziko odławianych stad tarłowych. Okres narażenia w badaniu LAGDA rozpoczyna się, gdy zarodki znajdują się w 8.–10.

stadium według Nieuwkoop i Fabera, i na początku badania nie można ustalić, czy u danych osobników wystąpi skolioza. W związku z tym, oprócz śledzenia częstości występowania skoliozy u zwierząt poddanych badaniu, należy udokumentować historycznie efektywność wylęgów (w tym częstość występowania skoliozy u larw, które mogły się rozwijać). Przydatne może okazać się dalsze monitorowanie odsetka każdego wylęgu niewykorzystanego w danym badaniu i zgłaszanie tych obserwacji (FIFRA SAP 2013).

Jakość wody

Ważne jest zapewnienie odpowiedniej jakości wody, zarówno w zapasach laboratoryjnych, jak i podczas badania. Oprócz kryteriów dotyczących jakości wody, które rutynowo poddaje się ocenie na potrzeby badań toksyczności dla organizmów wodnych, przydatne może okazać się monitorowanie i korygowanie wszelkich niedoborów składników odżywczych (np. niedoboru witaminy C, wapnia, fosforu) lub nadmiaru selenu i miedzi, które według doniesień powodują wystąpienie różnych stadiów skoliozy u laboratoryjnie hodowanych zwierząt z rodzin *Rana* i *Xenopus* (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; zgodnie z raportem FIFRA SAP 2013). Stosowanie odpowiedniego sposobu żywienia (zob. dodatek 4) oraz regularne czyszczenie zbiornika zasadniczo poprawi jakość wody i zdrowie badanych osobników.

Dieta

Szczegółowe zalecenia dotyczące sposobu żywienia, które okazały się skuteczne w badaniu LAGDA, zostały szczegółowo opisane w dodatku 4. Zaleca się badanie źródeł pasz na obecność toksyn biologicznych, herbicydów i innych pestycydów, o których wiadomo, że powodują skoliozę u płaty szponiastej lub u innych zwierząt wodnych (Schlenk i Jenkins 2013). Na przykład narażenie na niektóre inhibitory cholinesterazy zostało powiązane ze skoliozą u ryb (Schultz *et al.* 1985) i żab (Bacchetta *et al.* 2008).

BIBLIOGRAFIA

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara i 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 i R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathrogenic effects of semicarbazide. *Toxicology* 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley i 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 i D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the

culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. Journal of the World Aquaculture Society 11: 445-453.

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

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