

V Bruseli 25. februára 2019
(OR. en)

6800/19
ADD 2

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

SPRIEVODNÁ POZNÁMKA

Od:	Európska komisia
Dátum doručenia:	22. februára 2019
Komu:	Generálny sekretariát Rady
Č. dok. Kom.:	Annex to D060575/02
Predmet:	Príloha k NARIADENIU KOMISIE (EÚ) .../... z XXX, ktorým sa na účely prispôsobenia technickému pokroku mení príloha k nariadeniu (ES) č. 440/2008, ktorým sa ustanovujú testovacie metódy podľa nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemických látok (REACH)

Delegáciám v prílohe zasielame dokument Annex to D060575/02.

Príloha: Annex to D060575/02

B.71 SKÚŠKY KOŽNEJ SENZIBILIZÁCIE *IN VITRO* SO ZAMERANÍM NA KLÚČOVÚ UDALOSŤ AKTIVÁCIE DENDRITOVÝCH BUNIEK V RÁMCI DRÁHY NEPRIAZNIVÉHO ÚČINKU (AOP) KOŽNEJ SENZIBILIZÁCIE

VŠEOBECNÝ ÚVOD

Testovacia metóda založená na kľúčovej udalosti aktivácie dendritových buniek

1. Pod kožným senzibilizátorom sa rozumie látka, ktorá pri kontakte s kožou vyvolá alergickú reakciu podľa definície v Globálnom harmonizovanom systéme klasifikácie a označovania chemických látok (GHS OSN) (1) a nariadení Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí (CLP)¹. V prípade kľúčových biologických udalostí vedúcich ku kožnej senzibilizácii panuje všeobecná zhoda. Súčasné poznatky o chemických a biologických mechanizmoch, ktoré súvisia s kožnou senzibilizáciou, boli zhrnuté v rámci programu AOP OECD (2) ako dráha nepriaznivého účinku (AOP), ktorá sa začína molekulárnou iniciačnou udalosťou, pokračuje následnými udalosťami a napokon vedie k nežiaducemu účinku, t. j. alergickej kontaktnej dermatitíde. V tomto prípade je molekulárnou iniciačnou udalosťou (t. j. prvou kľúčovou udalosťou) vznik kovalentnej väzby elektrofilných látok s nukleofilnými jadrami kožných proteínov. K druhej kľúčovej udalosti v rámci tejto dráhy nepriaznivého účinku (AOP) dochádza v keratinocytoch, pričom udalosť zahŕňa zápalové reakcie, ako aj zmeny génovej expresie v súvislosti so špecifickými signálnymi dráhami bunky, akými sú dráhy závislé od úseku ARE („antioxidant/electrophile response element“). Treťou kľúčovou udalosťou je aktivácia dendritových buniek (DC), ktorá sa zvyčajne posudzuje podľa expresie špecifických povrchových bunkových markerov, chemokínov a cytokínov. Štvrtou kľúčovou udalosťou je aktivácia a proliferácia T-buniek, ktorá sa nepriamo posudzuje lokálnou skúškou lymfatických uzlín na myšiach a potkanoch (LLNA) (3).

¹ Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 z 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006, Ú. v. EÚ L 353/1, 31.12.2008.

2. Táto testovacia metóda (TM) je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 442E (2017). Opisujú sa v nej skúšky *in vitro* v súvislosti s mechanizmami opísanými pri kľúčovej udalosti aktivácie dendritových buniek v rámci dráhy nepriaznivého účinku (AOP) kožnej senzibilizácie (2). Súčasťou tejto testovacej metódy sú testy, ktoré sa majú použiť na podporu rozlíšenia kožných senzibilizátorov od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu v súlade s GHS OSN a CLP.

V tejto testovacej metóde sa opisujú tieto testy:

- test aktivácie ľudskej bunkovej línie (h-CLAT),
 - test aktivácie bučkej línie U937 (U-SENSTM),
 - skúška reportérového génu interleukínu-8 (skúška IL-8 Luc).
3. Testy, ktoré sú súčasťou tejto testovacej metódy a príslušného TG OECD, sa môžu líšiť z hľadiska postupu použitého na generovanie údajov a meraných hodnôt, možno ich však bez rozdielu použiť na riešenie požiadaviek štátov týkajúcich sa výsledkov testov v súvislosti s kľúčovou udalosťou aktivácie dendritových buniek v rámci dráhy nepriaznivého účinku (AOP) kožnej senzibilizácie, pričom sa v nich využíva vzájomné uznávanie údajov OECD.

Súvislosti a zásady testov v rámci testovacej metódy na základe kľúčovej udalosti

4. Posudzovanie kožnej senzibilizácie obyčajne zahŕňalo použitie laboratórnych zvierat. Klasické metódy založené na použití morčiat, maximalizačný test na morčatách podľa Magnussona a Kligmana (GPMT) a Buehlerov test (TM B.6) (4), sú zamerané na posudzovanie indukčnej aj elicitáčnej fázy kožnej senzibilizácie. Prijaté boli aj testy na myšiach a potkanoch, lokálna skúška lymfatických uzlín (LLNA) (TM B.42) (3) a jej dve nerádioaktívne modifikácie, LLNA: DA (TM B.50) (5) a LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51) (6), ktorými sa posudzuje výlučne indukčná reakcia, pretože sú vhodnejšie ako testy na morčatách tak z hľadiska dobrých životných podmienok zvierat, ako aj z hľadiska objektívneho merania indukčnej fázy kožnej senzibilizácie.
5. Nedávno boli prijaté testovacie metódy *in chemico* a *in vitro* založené na mechanistických poznatkoch, ktoré sa zameriavajú na prvú kľúčovú udalosť [TM B.59; skúška priamej peptidovej reaktivity (7)] a druhú kľúčovú udalosť [TM B.60; testovacia metóda „ARE-Nrf2 luciferáza“ (8)] AOP kožnej senzibilizácie, ktoré majú prispievať k posudzovaniu potenciál nebezpečnosti chemikálií z hľadiska kožnej senzibilizácie.

6. Pri testoch opísaných v tejto testovacej metóde sa kvantifikuje buď zmena expresie povrchových bunkových markerov súvisiacich s procesom aktivácie monocytov a dendritových buniek po expozícii senzibilizátorom (napr. CD54, CD86), alebo zmena expresie IL-8, cytokínu súvisiaceho s aktiváciou dendritových buniek. Existujú informácie o tom, že kožné senzibilizátory vyvolávajú expresiu bunkových membránových markerov ako CD40, CD54, CD80, CD83 a CD86 popri indukcii proinflamačných cytokínov, napr. IL-1 β a TNF- α , a viacerých chemokínov vrátane IL-8 (CXCL8) a CCL3 (9) (10) (11) (12), ktoré súvisia s aktiváciou dendritových buniek (2).
7. Keďže však aktivácia dendritových buniek predstavuje len jednu kľúčovú udalosť AOP kožnej senzibilizácie (2) (13), informácie získané pomocou testov, v rámci ktorých sa merajú markery aktivácie dendritových buniek, nemusia byť dostatočné na stanovenie záveru, pokiaľ ide o existenciu alebo neexistenciu potenciálu chemikálií spôsobiť kožnú senzibilizáciu. Navrhuje sa preto, aby údaje získané pomocou testov opísaných v tejto testovacej metóde slúžili na podporu rozlíšenia kožných senzibilizátorov od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu (t. j. kategória 1 GHS OSN/CLP) pri použití v rámci integrovaných prístupov k testovaniu a hodnoteniu (IATA) spolu s inými relevantnými doplňujúcimi informáciami, napr. odvodenými zo skúšok *in vitro* so zameraním na iné kľúčové udalosti AOP kožnej senzibilizácie, ako aj z netestovacích metód vrátane prevzatých údajov odvodených z chemických analógov (13). Zverejnili sa príklady použitia údajov získaných z týchto testov v rámci definovaných prístupov (13), t. j. prístupov, ktoré sú štandardizované z hľadiska množiny použitých informačných zdrojov a postupov použitých pri týchto údajoch na odvodenie prognóz, pričom ich možno použiť ako užitočné prvky v rámci IATA.
8. Testy opísané v tejto testovacej metóde nemožno používať samostatne, a to ani pri zaradovaní kožných senzibilizátorov do podkategórií 1A a 1B vymedzených v GHS OSN/CLP v prípade, že orgány uplatňujú tieto dve voliteľné podkategórie, a ani pri stanovení predpokladanej potencie na účely rozhodnutí v súvislosti s posudzovaním bezpečnosti. V závislosti od regulačného rámca však pozitívne výsledky získané na základe týchto metód možno samostatne použiť pri klasifikácii chemikálie ako patriacej do kategórie 1 GHS OSN/CLP.

9. Pojem „testovaná chemikália“ sa v tejto testovacej metóde používa na označenie toho, čo sa testuje¹, a nesúvisí s použiteľnosťou testov na testovanie jednozložkových látok, viaczožkových látok a/alebo zmesí. V súvislosti s použiteľnosťou testov pri viaczožkových látkach/zmesiach sú v súčasnosti dostupné len obmedzené informácie (14) (15). Tieto testy sú napriek tomu technicky použiteľné aj na testovanie viaczožkových látok a zmesí. Pred použitím tejto testovacej metódy na zmesi s cieľom generovať údaje plánované na regulačné účely by sa však malo zvážiť, či môže poskytnúť adekvátne výsledky na tento účel, a ak áno, tak prečo². Takéto úvahy nie sú nutné, pokiaľ existuje regulačná požiadavka na testovanie danej zmesi. Okrem toho by sa pri testovaní viaczožkových látok alebo zmesí mala zvážiť možná interferencia medzi cytotoxickými zložkami a pozorovanými reakciami.

¹ V júni 2013 sa na spoločnom zasadnutí OECD dospelo k dohode, že tam, kde je to možné, sa bude v nových a aktualizovaných usmerneniach OECD na vykonávanie testov na opis toho, čo sa testuje, jednotnejšie uplatňovať pojem „testovaná chemikália“.

² Táto veta bola navrhnutá a schválená na zasadnutí WNT v apríli 2014.

LITERATÚRA

- (1) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. K dispozícii na lokalite: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.
- (2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. K dispozícii na lokalite: [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) Kapitola B.42 tejto prílohy: Lokálna skúška lymfatických uzlín. Kapitola B.6 tejto prílohy: Podráždenie pokožky.
- (4) Kapitola B.50 tejto prílohy: Senzibilizácia kože: lokálna skúška lymfatických uzlín: DA.
- (5) Kapitola B.51 tejto prílohy: Senzibilizácia kože: lokálna skúška lymfatických uzlín: BrdU-ELISA.
- (6) Kapitola B.59 tejto prílohy: Kožná senzibilizácia *in chemico*: skúška priamej peptidovej reaktivity (DPRA).
- (7) Kapitola B.60 tejto prílohy: Kožná senzibilizácia *in vitro*: testovacia metóda „ARE-Nrf2 luciferáza“.
- (8) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271 – 96.
- (9) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 180:1841 – 7.
- (10) Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 27:3031 – 8.
- (11) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation

of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and DNCB. *J Invest Dermatol* 120:390 – 8.

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

Dodatok 1

KOŽNÁ SENZIBILIZÁCIA *IN VITRO*: TEST AKTIVÁCIE ĽUDSKEJ BUNKOVEJ LÍNIE (H-CLAT)

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

1. V teste h-CLAT sa kvantifikujú zmeny expresie povrchových bunkových markerov v súvislosti s procesom aktivácie monocytov a dendritových buniek (DC) (t. j. CD86 a CD54) v bunkovej línii THP-1 ľudskej monocytovej leukémie po expozícii senzibilizátorom (1) (2). Namerané úrovne expresie povrchových bunkových markerov CD86 a CD54 následne slúžia ako ukazovateľ pri rozlišovaní medzi kožnými senzibilizátormi a látkami nespôsobujúcimi senzibilizáciu.
2. Test h-CLAT sa posudzoval v rámci validačnej štúdie koordinovanej referenčným laboratóriom Európskej únie pre alternatívy k testovaniu na zvieratách (EURL ECVAM) a v následnom nezávislom partnerskom preskúmaní zo strany vedeckého poradného výboru laboratória EURL ECVAM (ESAC). Na základe zváženia všetkých dostupných dôkazov a vstupov regulačných orgánov a zainteresovaných strán vydalo laboratórium EURL ECVAM odporúčanie (3), aby sa test h-CLAT používal na podporu rozlíšenia senzibilizátorov od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu v rámci IATA na účely klasifikácie a označovania nebezpečnosti. Príklady použitia údajov z testu h-CLAT v kombinácii s inými informáciami sú uvedené v literatúre (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).
3. Preukázalo sa, že test h-CLAT je prenosný do laboratórií, ktoré majú skúsenosti s technikami týkajúcimi sa bunkových kultúr a s analýzou pomocou prietokovej cytometrie. Úroveň reprodukovateľnosti v prognózach, ktorú možno od tohto testu očakávať, je rádovo 80 % v rámci laboratória a medzi laboratóriami (3) (12). Z výsledkov získaných vo validačnej štúdii (13) a v iných uverejnených štúdiách (14) celkovo vyplýva, že v porovnaní s výsledkami LLNA presnosť pri odlišovaní kožných senzibilizátorov (t. j. kategória 1 GHS OSN/CLP) od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu predstavuje 85 % (N = 142) s citlivosťou 93 % (94/101) a so špecifickosťou 66 % (27/41) [na základe opakovanej analýzy uskutočnenej laboratóriom EURL ECVAM (12), v ktorej sa zohľadnili všetky existujúce údaje a nebrali sa do úvahy negatívne výsledky pre chemikálie s hodnotou log Kow vyššou než 3,5, ako sa opisuje v odseku 4]. Test h-CLAT s väčšou pravdepodobnosťou povedie k falošne negatívnym prognózam v prípade chemikálií, ktoré vykazujú nízku až miernu potenciú z hľadiska kožnej senzibilizácie (t. j. podkategória 1B GHS OSN/CLP), než v prípade chemikálií vykazujúcich vysokú potenciú z hľadiska

kožnej senzibilizácie (t. j. podkategória 1A GHS OSN/CLP) (4) (13) (15). Celkovo z týchto informácií vyplýva, že metóda h-CLAT je užitočná a môže prispieť k zisteniu nebezpečnosti z hľadiska kožnej senzibilizácie. Uvedené hodnoty presnosti testu h-CLAT ako samostatného testu sú však len orientačné, keďže test sa má hodnotiť v kombinácii s inými zdrojmi informácií v kontexte IATA a v súlade s ustanoveniami odsekov 7 a 8 všeobecného úvodu. Okrem toho by sa pri hodnotení metód na zistenie kožnej senzibilizácie bez použitia zvierat malo zohľadniť to, že test LLNA ani iné testy na zvieratách nemusia v plnej miere odzrkadľovať situáciu u ľudí.

4. Na základe v súčasnosti dostupných údajov sa preukázalo, že metódu h-CLAT možno použiť v prípade testovaných chemikálií, ktoré predstavujú rôzne organické funkčné skupiny, majú rôzne mechanizmy reakcie, potenciú z hľadiska kožnej senzibilizácie (ako bolo stanovené v štúdiách *in vivo*) a rôzne fyzikálno-chemické vlastnosti (3) (14) (15). Metóda h-CLAT sa používa pri testovaní chemikálií, ktoré sú rozpustné alebo vytvárajú stabilné disperzie (t. j. koloid alebo suspenziu, v ktorej sa testovaná chemikália neusadí ani neoddelí od rozpúšťadla/nosiča do rôznych fáz) vo vhodnom rozpúšťadle/nosiči (pozri odsek 14). Pri testovaných chemikáliách s hodnotou log Kow vyššou než 3,5 je vyššia pravdepodobnosť vzniku falošne negatívnych výsledkov (14). Negatívne výsledky pre testované chemikálie s hodnotou log Kow vyššou než 3,5 sa preto nemajú brať do úvahy. Pozitívne výsledky získané v prípade testovaných chemikálií s hodnotou log Kow vyššou než 3,5 však možno použiť na podporu identifikácie testovanej chemikálie ako kožného senzibilizátora. Okrem toho môžu z dôvodu obmedzenej metabolickej kapacity použitej bunkovej línie (16) a experimentálnych podmienok vykazovať v teste h-CLAT negatívne výsledky aj pro-haptény (t. j. látky, ktoré musia byť aktivované enzymaticky, napríklad enzýmami P450) a pre-haptény (t. j. látky aktivované oxidáciou), zvlášť tie s pomalou oxidáciou (15). Fluorescenčné testované chemikálie možno hodnotiť pomocou testu h-CLAT (17), silné fluorescenčné testované chemikálie, ktoré emitujú svetlo na rovnakej vlnovej dĺžke ako fluoresceín-izotio-kyanát (FITC) alebo propídium-jodid (PI), však budú ovplyvňovať detekciu pomocou prietokovej cytometrie, a preto ich nemožno správne hodnotiť pomocou protilátok konjugovaných s FITC alebo pomocou PI. V takom prípade možno použiť iné protilátky označené fluorochrómom alebo iné markery cytotoxicity, pokiaľ sa preukázalo, že poskytujú podobné výsledky ako protilátky označené pomocou FITC (pozri odsek 24) alebo PI (pozri odsek 18), napr. testovaním látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 1.2. Vzhľadom na vyššie uvedené informácie je negatívne výsledky potrebné interpretovať v kontexte uvedených obmedzení a spoločne s inými zdrojmi informácií v rámci IATA. V prípade, že existujú dôkazy o nepoužitelnosti

metódy h-CLAT na iné špecifické kategórie testovaných chemikálií, by sa táto metóda nemala pri týchto špecifických kategóriách použiť.

5. Ako bolo opísané vyššie, metóda h-CLAT umožňuje rozlišovanie medzi kožnými senzibilizátormi a látkami nespôsobujúcimi senzibilizáciu. Môže však takisto potenciálne prispieť k posúdeniu potencie z hľadiska senzibilizácie (4) (5) (9), ak sa použije v rámci integrovaných prístupov ako IATA. Na to, aby bolo možné určiť, ako výsledky testu h-CLAT môžu prispieť k posudzovaniu tejto potencie, však bude potrebná ďalšia práca, pokiaľ možno založená na údajoch týkajúcich sa človeka.
6. Vymedzenie pojmov je uvedené v dodatku 1.1.

PRINCÍP TESTU

7. Metóda h-CLAT predstavuje skúšku *in vitro*, v ktorej sa kvantifikujú zmeny expresie povrchových bunkových markerov (t. j. CD86 a CD54) v bunkách THP-1 bunkovej línie ľudskej monocytovej leukémie po 24-hodinovej expozícii testovanej chemikálii. Tieto povrchové molekuly predstavujú typické markery aktivácie monocytových buniek THP-1 a môžu imitovať aktiváciu dendritových buniek, ktorá zohráva významnú úlohu pri prvotnej aktivácii T-buniek. Zmeny expresie povrchových markerov sa merajú pomocou prietokovej cytometrie po zafarbení buniek pomocou protilátok označených fluorochrómom. Súčasne sa uskutočňuje meranie cytotoxicity s cieľom posúdiť, či pri nižších ako cytotoxických koncentráciách takisto dochádza k zvýšeniu expresie povrchových markerov. Vypočíta sa relatívna intenzita fluorescencie povrchových markerov v porovnaní s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla/kontrolou s nosičom, ktorá sa použije v prognostickom modeli (pozri odsek 26) na podporu rozlíšenia senzibilizátorov od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu.

PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI

8. Je potrebné, aby laboratória pred začatím bežného používania testu opísaného v tomto dodatku k testovacej metóde B.71 preukázali technickú spôsobilosť použitím 10 látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 1.2. Používatelia testu majú okrem toho viesť historickú databázu údajov vytvorených na základe kontrol reaktivity (pozri odsek 11) a pozitívnych kontrol a kontrol s aplikáciou rozpúšťadla/kontrol s nosičom (pozri odseky 20 – 22) a na základe týchto údajov potvrdiť, že sa v priebehu času zachováva reprodukovateľnosť testu v ich laboratóriu.

POSTUP

9. Tento test je založený na protokole DB-ALM (DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation – databázová služba v súvislosti s alternatívnymi metódami k pokusom na zvieratách) č. 158 k testu h-CLAT (18), ktorý predstavuje protokol použitý pri validačnej štúdii koordinovanej laboratóriom EURL ECVAM. Tento protokol sa odporúča používať pri vykonávaní a používaní metódy h-CLAT v laboratóriu. Ďalej je uvedený opis hlavných zložiek a postupov testu h-CLAT, ktorý sa skladá z dvoch krokov: *skúška na stanovenie dávky a meranie expresie CD86/CD54*.

Príprava buniek

10. Na vykonanie metódy h-CLAT sa používa bunková línia THP-1 ľudskej monocytovej leukémie. Odporúča sa, aby sa bunky (TIB-202™) získali z riadne kvalifikovanej bunkovej banky, ako je napríklad bunková banka ATCC (American Type Culture Collection).
11. Bunky THP-1 sa kultivujú pri teplote 37 °C v atmosfére s vyššou relatívnou vlhkosťou a 5 % CO₂ v rastovom médiu RPMI-1640 s pridaním 10 % bovinného fetálneho séra (FBS), 2-merkaptotanolu s koncentráciou 0,05 mM, 100 jednotiek/ml penicilínu a 100 µg/ml streptomycínu. Je možné vyhnúť sa použitiu penicilínu a streptomycínu v rastovom médiu. V takom prípade však musia používatelia overiť, že neprítomnosť antibiotík v rastovom médiu nemá vplyv na výsledky, a to napríklad testovaním látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 1.2. S cieľom minimalizovať riziko kontaminácie je v každom prípade potrebné dodržiavať osvedčené postupy kultivácie buniek bez ohľadu na prítomnosť alebo neprítomnosť antibiotík v médiu na kultiváciu buniek. Bunky THP-1 sa štandardne nasadia každé 2 – 3 dni s hustotou 0,1 až $0,2 \times 10^6$ buniek/ml. Je potrebné ich udržiavať pri hustote 0,1 až $1,0 \times 10^6$ buniek/ml. Pred použitím na testovanie sa bunky kvalifikujú uskutočnením kontroly reaktivity. Kontrola reaktivity buniek sa má uskutočniť dva týždne po rozmrazení pomocou pozitívnych kontrol, 2,4-dinitrochlórbenzénu (DNCB) (č. CAS 97-00-7, čistota $\geq 99\%$) a síranu nikelnatého (NiSO₄) (č. CAS 10101-97-0, čistota $\geq 99\%$), a negatívnej kontroly, kyseliny mliečnej (LA) (č. CAS 50-21-5, čistota $\geq 85\%$). DNCB aj NiSO₄ majú vyvolať pozitívnu reakciu povrchových bunkových markerov CD86 aj CD54 a LA má vyvolať negatívnu reakciu povrchových bunkových markerov CD86 aj CD54. V rámci skúšky sa použijú len bunky, ktoré vyhovujú pri kontrole reaktivity. Bunky možno po rozmrazení rozmnožovať až dva

mesiace. Nemá sa prekročiť 30 pasáží. Kontrola reaktivity sa má uskutočniť podľa postupov opísaných v odsekoch 20 – 24.

12. Na účely testovania sa bunky THP-1 nasadia s hustotou $0,1 \times 10^6$ buniek/ml alebo $0,2 \times 10^6$ buniek/ml a predbežne sa kultivujú v kultivačných bankách 72 hodín, resp. 48 hodín. Dôležité je, aby hustota buniek v kultivačnej banke priamo po období predbežnej kultivácie bola v každom pokuse čo najrovnomernejšia (na základe jednej z dvoch podmienok predbežnej kultivácie opísaných vyššie), pretože hustota buniek v kultivačnej banke priamo po predbežnej kultivácii môže ovplyvňovať expresiu CD86/CD54 vyvolanú alergénmi (19). V deň testovania sa bunky zozbierané z kultivačnej banky resuspendujú pomocou čerstvého rastového média s koncentráciou 2×10^6 buniek/ml. Bunky sa ďalej rozdelia na 24-jamkovú platničku s plochým dnom v objeme 500 μ l (1×10^6 buniek/jamka) alebo na 96-jamkovú mikrotitračnú platničku s plochým dnom v objeme 80 μ l ($1,6 \times 10^5$ buniek/jamka).

Skúška na stanovenie dávky

13. *Skúška na stanovenie dávky* sa uskutočňuje s cieľom stanoviť hodnotu CV75 predstavujúcu koncentráciu testovanej chemikálie, ktorá spôsobuje 75 % životaschopnosť buniek (CV) v porovnaní s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla/kontrolou s nosičom. Na základe hodnoty CV75 sa stanovuje koncentrácia testovaných chemikálií na meranie expresie CD86/CD54 (pozri odseky 20 – 24).

Príprava testovaných chemikálií a kontrolných látok

14. Testované chemikálie a kontrolné látky sa pripravujú v deň testovania. V prípade metódy h-CLAT sa testované chemikálie rozpustia alebo stabilne rozmiešajú (pozri aj odsek 4) vo fyziologickom roztoku alebo v rastovom médiu, ktoré predstavujú prvú možnosť pri výbere rozpúšťadla/nosiča, alebo v dimetylsulfoxide (DMSO, čistota ≥ 99 %), ktorý predstavuje druhú možnosť pri výbere rozpúšťadla/nosiča, ak testovaná chemikália nie je rozpustná ani nevytvára stabilnú disperziu v prvých dvoch rozpúšťadlách, a to s konečnými koncentráciami 100 mg/ml (vo fyziologickom roztoku alebo v rastovom médiu) alebo 500 mg/ml (v DMSO). Iné rozpúšťadlá/nosiče ako tie, ktoré sú opísané vyššie, možno použiť, ak sa uvedie dostatočné vedecké zdôvodnenie. Zohľadňuje sa aj stabilita testovanej chemikálie v konečnom rozpúšťadle/nosiči.

15. Vykonajú sa tieto kroky riedenia, pričom sa začne pri zásobnom roztoku testovanej chemikálie s koncentráciou 100 mg/ml (vo fyziologickom roztoku alebo v rastovom médiu) alebo 500 mg/ml (v DMSO):

- V prípade použitia fyziologického roztoku alebo rastového média ako rozpúšťadla/nosiča: Pripraví sa osem zásobných roztokov (osem koncentrácií) pomocou dvojnásobných sériových riedení s príslušným rozpúšťadlom/nosičom. Tieto zásobné roztoky sa ďalej 50-násobne zriedia do rastového média (pracovné roztoky). Ak najvyššia konečná koncentrácia na mikrotitračnej platničke predstavujúca 1 000 µg/ml nie je toxická, opätovne sa stanoví maximálna koncentrácia pomocou nového testu cytotoxicity. Konečná koncentrácia na mikrotitračnej platničke nemá prekročiť 5 000 µg/ml v prípade testovaných chemikálií, ktoré sú rozpustené alebo stabilne rozmiešané vo fyziologickom roztoku alebo v rastovom médiu.
- V prípade použitia DMSO ako rozpúšťadla/nosiča: Pripraví sa osem zásobných roztokov (osem koncentrácií) pomocou dvojnásobných sériových riedení s príslušným rozpúšťadlom/nosičom. Tieto zásobné roztoky sa ďalej 250-násobne zriedia do rastového média (pracovné roztoky). Konečná koncentrácia na mikrotitračnej platničke nemá prekročiť 1 000 µg/ml, aj keď táto koncentrácia nie je toxická.

Pracovné roztoky sa nakoniec použijú na expozíciu pridaním rovnakého objemu pracovného roztoku do objemu bunkovej suspenzie THP-1 na mikrotitračnej platničke (pozri aj odsek 17), aby sa dosiahlo ďalšie dvojnásobné riedenie (konečný rozsah koncentrácií na mikrotitračnej platničke je zvyčajne 7,81 – 1 000 µg/ml).

16. V metóde h-CLAT sa ako kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom používa rastové médium [v prípade testovaných chemikálií rozpustených alebo stabilne rozmiešaných (pozri odsek 4) v rastovom médiu alebo vo fyziologickom roztoku] alebo DMSO (v prípade testovaných chemikálií rozpustených alebo stabilne rozmiešaných v DMSO), ktoré sa na mikrotitračnej platničke testuje v jednej konečnej koncentrácii 0,2 %. Riedi sa rovnakým spôsobom, ako je opísané pri pracovných roztokoch v odseku 15.

Aplikácia testovaných chemikálií a kontrolných látok

17. Rastové médium alebo pracovné roztoky opísané v odsekoch 15 a 16 sa zmiešajú v objemovom pomere 1:1 s bunkovými suspenziami pripravenými na 24-jamkovej alebo 96-jamkovej platničke s plochým dnom (pozri odsek 12). Ošetrované platničky sa potom inkubujú 24 ± 0,5 hod. pri teplote 37 °C a v atmosfére s obsahom 5 % CO₂. Treba dbať na to, aby sa zabránilo vyparovaniu prchavých testovaných chemikálií a krížovej

kontaminácii testovanými chemikáliami medzi jamkami, napr. hermetickým uzatvorením platničky pred inkubáciou s testovanými chemikáliami (20).

Farbenie pomocou propidium-jodidu (PI)

18. Po expozícii v trvaní $24 \pm 0,5$ hod. sa bunky prenesú do vzorkových skúmaviek a vykoná sa ich odber pomocou centrifugácie. Supernatanty sa odstránia a zvyšné bunky sa resuspendujú pomocou 200 μ l (v prípade použitia 96 jamiek) alebo 600 μ l (v prípade použitia 24 jamiek) fosfátového tlmivého fyziologického roztoku obsahujúceho 0,1 % bovinného sérového albumínu (vyfarbovací tlmivý roztok). 200 μ l bunkovej suspenzie sa prenesie do 96-jamkovej mikrotitračnej platničky s okrúhlym dnom (v prípade použitia 96 jamiek) alebo do mikroskúmavky (v prípade použitia 24 jamiek) a dvakrát sa premyje pomocou 200 μ l (v prípade použitia 96 jamiek) alebo 600 μ l (v prípade použitia 24 jamiek) vyfarbovacieho tlmivého roztoku. Nakoniec sa bunky resuspendujú vo vyfarbovacom tlmivom roztoku (napr. 400 μ l) a pridá sa roztok PI (napr. 20 μ l) (konečná koncentrácia PI je napríklad 0,625 μ g/ml). Možno použiť iné markery cytotoxicity, ako je 7-aminoaktinomycín D (7-AAD), trypanová modrá alebo iné látky, ak pri alternatívnych farbivách možno preukázať, že poskytujú podobné výsledky ako PI, napríklad pomocou testovania látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 1.2.

Meranie cytotoxicity pomocou prietokovej cytometrie a odhad hodnoty CV75

19. Príjem PI sa analyzuje pomocou prietokovej cytometrie s akvizičným kanálom FL-3. Vyžaduje sa celkový počet 10 000 živých buniek (bez prítomnosti PI). Životaschopnosť buniek možno vypočítať v analytickom programe cytometra pomocou rovnice uvedenej ďalej. V prípade nízkej životaschopnosti buniek je potrebné získať až 30 000 buniek vrátane mŕtvych buniek. Údaje možno prípadne získať počas jednej minúty po začatí analýzy.

$$\text{Životaschopnosť buniek} = \frac{\text{Počet živých buniek}}{\text{Celkový počet získaných buniek}} \times 100$$

Hodnota CV75 (pozri odsek 13), t. j. koncentrácia, pri ktorej sa prejavuje 75 % prežitie buniek THP-1 (25 % cytotoxicita), sa vypočíta pomocou logaritmickej lineárnej interpolácie podľa tejto rovnice:

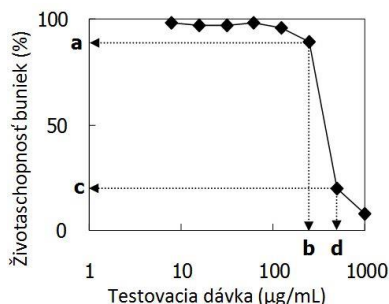
$$\text{Log CV75} = \frac{(75-c) \times \text{Log}(b) - (75-a) \times \text{Log}(d)}{a-c}$$

Keď:

a je minimálna hodnota životaschopnosti buniek nad 75 %

c je maximálna hodnota životaschopnosti buniek pod 75 %

b a d sú koncentrácie, pri ktorých sa prejavuje hodnota životaschopnosti buniek a, resp. c



Na odvodenie hodnoty CV75 možno použiť aj iné prístupy, pokiaľ sa preukáže, že to nemá vplyv na výsledky (napr. pomocou testovania látok na preukázanie spôsobnosti).

Meranie expresie CD86/CD54

Príprava testovaných chemikálií a kontrolných látok

20. Na rozpustenie alebo stabilné rozmiešanie testovaných chemikálií sa používa vhodné rozpúšťadlo/nosič (fyziologický roztok, rastové médium alebo DMSO; pozri bod 14). Testované chemikálie sa najskôr zriedia na koncentráciu, ktorá zodpovedá 100-násobku (v prípade fyziologického roztoku alebo rastového média) alebo 500-násobku (v prípade DMSO) hodnoty $1,2 \times CV75$ stanovenej v *skúške na stanovenie dávky* (pozri odsek 19). Ak hodnotu CV75 nemožno určiť (t. j. v *skúške na stanovenie dávky* sa nepozoruje dostatočná toxicita), ako počiatočná koncentrácia sa použije najvyššia rozpustná alebo stabilne rozmiešaná koncentrácia testovanej chemikálie pripravená pomocou jednotlivého rozpúšťadla/nosiča. Konečná koncentrácia na mikrotitračnej platničke nemá prekročiť 5 000 µg/ml (v prípade fyziologického roztoku alebo rastového média) alebo 1 000 µg/ml (v prípade DMSO). Ďalej sa pomocou príslušného rozpúšťadla/nosiča uskutočnia 1,2-násobné sériové riedenia, aby sa získali zásobné roztoky [osem koncentrácií v rozsahu od $100 \times 1,2 \times CV75$ do $100 \times 0,335 \times CV75$ (v prípade fyziologického roztoku alebo rastového média) alebo od $500 \times 1,2 \times CV75$ do $500 \times 0,335 \times CV75$ (v prípade DMSO)], ktoré sa budú testovať v rámci metódy h-CLAT (pozri príklad schémy dávkovania v protokole DB-ALM č. 158). Tieto zásobné roztoky sa ďalej 50-násobne (v prípade fyziologického roztoku alebo rastového média) alebo 250-násobne (v prípade DMSO) zriedia do rastového média (pracovné roztoky). Tieto pracovné roztoky sa nakoniec použijú na expozíciu s použitím ďalšieho faktora na konečné dvojnásobné riedenie na mikrotitračnej platničke. Ak výsledky nevyhovujú kritériám prijateľnosti opísaným v odsekoch 29 a 30 v súvislosti so životaschopnosťou buniek, môže sa zopakovať *skúška*

na stanovenie dávky s cieľom určiť presnejšiu hodnotu CV75. Na meranie expresie CD86/CD54 možno použiť len 24-jamkové platničky.

21. Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom sa pripraví podľa opisu v odseku 16. Ako pozitívna kontrola sa pri metóde h-CLAT používa DNCB (pozri odsek 11), pričom sa pripraví zásobné roztoky v DMSO a zriedia sa podľa opisu pre zásobné roztoky v odseku 20. DNCB sa použije na platničke ako pozitívna kontrola na *meranie expresie CD86/CD54* v jednej konečnej koncentrácii (zvyčajne 4,0 µg/ml). Na získanie koncentrácie 4,0 µg/ml DNCB na platničke sa pripraví zásobný roztok 2 mg/ml DNCB v DMSO a ďalej sa 250-násobne zriedi s rastovým médiom na pracovný roztok s koncentraciou 8 µg/ml. Prípadne možno ako koncentráciu pozitívnej kontroly použiť hodnotu CV75 DNCB, ktorá sa stanovuje v každom testovacom zariadení. Použiť možno iné vhodné pozitívne kontroly, ak sú k dispozícii historické údaje na odvodenie kritérií prijateľnosti porovnateľných testovacích cyklov. V prípade pozitívnych kontrol nemá daná jedna konečná koncentrácia na mikrotitračnej platničke prekročiť 5 000 µg/ml (v prípade fyziologického roztoku alebo rastového média) alebo 1 000 µg/ml (v prípade DMSO). Kritériá prijateľnosti testovacieho cyklu sú rovnaké ako kritériá prijateľnosti opísané pre testovanú chemikáliu (pozri odsek 29) okrem posledného kritéria prijateľnosti, keďže sa pozitívna kontrola testuje v jednej koncentrácii.

Aplikácia testovaných chemikálií a kontrolných látok

22. Pre každú testovanú chemikáliu a kontrolnú látku sa na získanie prognózy vyžaduje jeden pokus. Súčasťou každého pokusu sú najmenej dva nezávislé testovacie cykly na účely *merania expresie CD86/CD54* (pozri odseky 26 – 28). Jednotlivé nezávislé testovacie cykly sa uskutočnia v rôznych dňoch alebo v ten istý deň za predpokladu, že sa pre každý testovací cyklus: a) pripraví nezávislé čerstvé zásobné roztoky a pracovné roztoky testovanej chemikálie a roztoky s protilátkami a b) použijú sa nezávisle odobraté bunky (t. j. bunky sa odoberú z rôznych kultivačných baniek); bunky však môžu pochádzať z rovnakej pasáže. Testované chemikálie a kontrolné látky pripravené ako pracovné roztoky (500 µl) sa zmiešajú s 500 µl suspendovaných buniek (1×10^6 buniek) v pomere 1:1 a bunky sa inkubujú $24 \pm 0,5$ hod. podľa opisu v odsekoch 20 a 21. V každom testovacom cykle je postačujúci jeden replikát každej koncentrácie testovanej chemikálie a kontrolnej látky, pretože sa prognóza stanovuje najmenej na základe dvoch nezávislých testovacích cyklov.

Farbenie buniek a analýza

23. Po expozícii v trvaní $24 \pm 0,5$ hod. sa bunky prenesú z 24-jamkovej platničky do vzorkových skúmaviek, vykoná sa ich odber pomocou centrifugácie a potom sa dvakrát premyjú pomocou 1 ml vyfarbovacieho tlmivého roztoku (v prípade potreby možno uskutočniť ďalšie kroky premytia). Pre premytí sa uskutoční blokovanie buniek pomocou 600 μ l blokujúceho roztoku [vyfarbovací tlmivý roztok s obsahom globulínu s koncentráciou 0,01 % (hm./obj.) (Cohnova frakcia II, III, ľudská; SIGMA, č. G2388-10G alebo ekvivalent)] a bunky sa 15 minút inkubujú pri teplote 4 °C. Po blokovaní sa bunky rozdelia na tri alikvoty s objemom 180 μ l do 96-jamkovej mikrotitračnej platničky alebo mikroskúmavky.
24. Po centrifugácii sa bunky zafarbia pomocou 50 μ l anti-CD86 protilátok, anti-CD54 protilátok alebo myších protilátok (izotypu) IgG1 označených pomocou FITC pri teplote 4 °C počas 30 min. Protilátky opísané v protokole DB-ALM č. 158 (18) k testu h-CLAT sa majú použiť zriedené v objemovom pomere 3:25 [pre CD86 (BD-PharMingen, č. 555657; klon: Fun-1)] alebo v objemovom pomere 3:50 [pre CD54 (DAKO, č. F7143; klon: 6.5B5) a IgG1 (DAKO, č. X0927)] s vyfarbovacím tlmivým roztokom. Tvorcovia testu vymedzili tieto faktory riedenia protilátok na základe toho, že poskytujú najlepší pomer signál-šum. Zo skúseností tvorcov testu vyplýva, že intenzita fluorescence protilátok je medzi rôznymi šaržami zvyčajne jednotná. Používatelia však môžu zvážiť titráciu protilátok v podmienkach vlastného laboratória s cieľom stanoviť najvhodnejšie koncentrácie, ktoré sa majú použiť. Iné anti-CD86 a/alebo anti-CD54 protilátky označené fluorochrómom možno použiť, ak pri nich možno preukázať, že poskytujú podobné výsledky ako protilátky konjugované s FITC, napríklad pomocou testovania látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 1.2. Je potrebné poznamenať, že výsledky môže ovplyvniť zmena klonu alebo dodávateľa protilátok, ako sa opisuje v protokole DB-ALM č. 158 (18) k testu h-CLAT. Po dvojnásobnom alebo viacnásobnom premytí pomocou 150 μ l vyfarbovacieho tlmivého roztoku sa bunky resuspendujú vo vyfarbovacom tlmivom roztoku (napr. 400 μ l) a pridá sa roztok PI (napr. 20 μ l na dosiahnutie konečnej koncentrácie 0,625 μ g/ml) alebo iný roztok markera cytotoxicity (pozri odsek 18). Pomocou prietokovej cytometrie sa analyzujú úrovně expresie CD86 a CD54, ako aj životaschopnosť buniek.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Hodnotenie údajov

25. Expresia CD86 a CD54 sa analyzuje pomocou prietokovej cytometrie s akvizičným kanálom FL-1. Na základe geometrického priemeru intenzity fluorescence (MFI) sa

relatívna intenzita fluorescencie (RFI) CD86 a CD54 pre bunky pozitívnej kontroly a bunky ošetrované chemikáliou vypočíta podľa tohto vzorca:

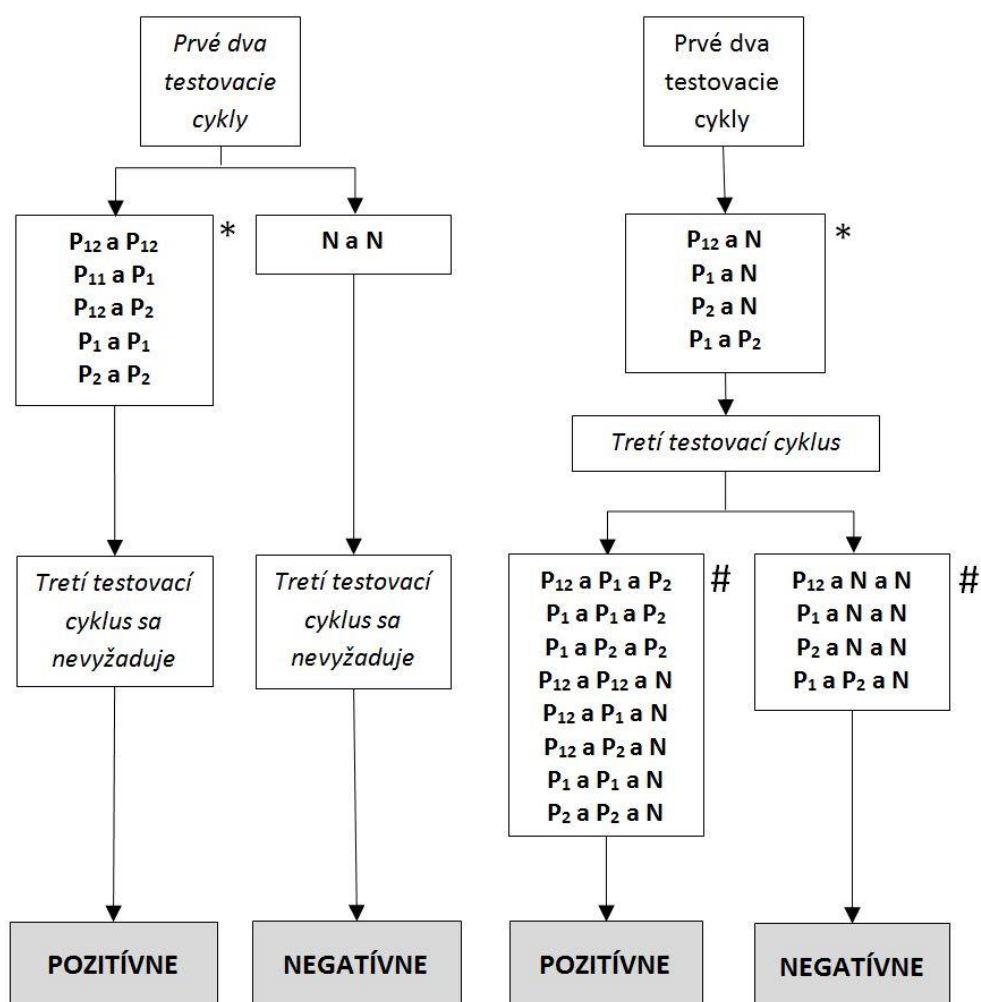
$$RFI = \frac{MFI \text{ buniek ošetrovaných chemikáliou} - MFI \text{ buniek v izotypovej kontrole ošetrovaných chemikáliou}}{MFI \text{ kontr.buniek ošetrovaných rozpúšťadlom/nosičom} - MFI \text{ buniek v iz.kon.ošetrovaných rozp./nos.}} \times 100$$

Životaschopnosť buniek dosiahnutá pri bunkách v izotypovej kontrole (ctrl) [ktoré sú zafarbené pomocou myších protilátok (izotypu) IgG1] sa takisto vypočíta podľa vzorca opísaného v odseku 19.

Prognostický model

26. Na účely merania expresie *CD86/CD54* sa každá testovaná chemikália testuje najmenej v dvoch nezávislých testovacích cykloch, aby sa odvodila jedna prognóza (POZITÍVNA alebo NEGATÍVNA). Prognóza v teste h-CLAT sa považuje za POZITÍVNU, ak je splnená aspoň jedna z týchto podmienok v 2 z 2 alebo aspoň v 2 z 3 nezávislých testovacích cyklov, inak sa prognóza v teste h-CLAT považuje za NEGATÍVNU (obrázok 1):
 - hodnota RFI pre CD86 je rovnaká alebo vyššia než 150 % pri každej testovanej koncentrácii (so životaschopnosťou buniek ≥ 50 %),
 - hodnota RFI pre CD54 je rovnaká alebo vyššia než 200 % pri každej testovanej koncentrácii (so životaschopnosťou buniek ≥ 50 %).
27. Na základe uvedených informácií platí, že ak sú oba prvé dva testovacie cykly pozitívne v prípade CD86 a/alebo sú oba pozitívne v prípade CD54, prognóza v teste h-CLAT sa považuje za POZITÍVNU a tretí testovací cyklus nie je potrebné uskutočniť. Podobne, ak sú prvé dva testovacie cykly negatívne pre oba markery, prognóza v teste h-CLAT sa považuje za NEGATÍVNU (s prihliadnutím na ustanovenia odseku 30) bez toho, aby bolo potrebné uskutočniť tretí testovací cyklus. Ak však prvé dva testovacie cykly nie sú zhodné aspoň pre jeden z markerov (CD54 alebo CD86), vyžaduje sa tretí testovací cyklus a konečná prognóza bude založená na väčšinovom výsledku z troch jednotlivých testovacích cyklov (t. j. 2 z 3). V tejto súvislosti je potrebné poznamenať, že ak sa uskutočnia dva nezávislé testovacie cykly a jeden z nich je pozitívny len pre CD86 (ďalej len „P₁“) a druhý je pozitívny len pre CD54 (ďalej len „P₂“), vyžaduje sa tretí testovací cyklus. Ak je tento tretí testovací cyklus negatívny pre oba markery (ďalej len „N“), prognóza v teste h-CLAT sa považuje za NEGATÍVNU. Na druhej strane, ak je tretí testovací cyklus pozitívny pre jeden z markerov (P₁ alebo P₂) alebo pre oba markery (ďalej len „P₁₂“), prognóza v teste h-CLAT sa považuje za POZITÍVNU.

Obrázok 1: Prognostický model použitý v metóde h-CLAT Prognóza v teste h-CLAT by sa mala posudzovať v rámci IATA a v súlade s ustanoveniami odsekov 7 a 8 všeobecného úvodu.



P1: testovací cyklus s pozitívnym výsledkom len pre CD86; P2: testovací cyklus s pozitívnym výsledkom len pre CD54; P12: testovací cyklus s pozitívnym výsledkom pre CD86 aj CD54; N: testovací cyklus, ktorý nie je pozitívny pre CD86 ani pre CD54.

*V políčkach sa uvádzajú relevantné kombinácie výsledkov z prvých dvoch testovacích cyklov bez ohľadu na poradie, v akom sa mohli získať.

#V políčkach sa uvádzajú relevantné kombinácie výsledkov z troch testovacích cyklov na základe výsledkov získaných v prvých dvoch testovacích cykloch uvedených v predchádzajúcom políčku, neodrážajú však poradie, v akom sa mohli získať.

28. V prípade testovaných chemikálií, ktoré sú na základe prognózy v teste h-CLAT považované za POZITÍVNE, sa voliteľne môžu stanoviť dve hodnoty účinnej koncentrácie (EC), EC150 pre CD86, resp. EC200 pre CD54, čo je koncentrácia, pri ktorej testované chemikálie viedli k indukcii RFI s hodnotou 150 alebo 200. Tieto hodnoty EC môžu potenciálne prispieť k posúdeniu potencie z hľadiska senzibilizácie (9), ak sa použijú v rámci integrovaných prístupov ako IATA (4) (5) (6) (7) (8). Možno ich vypočítat pomocou týchto rovníc:

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

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

keď

A_{conc} je najnižšia koncentrácia v $\mu\text{g/ml}$ s hodnotou RFI > 150 (CD86) alebo 200 (CD54)

B_{conc} je najvyššia koncentrácia v $\mu\text{g/ml}$ s hodnotou RFI < 150 (CD86) alebo 200 (CD54)

A_{RFI} je hodnota RFI pri najnižšej koncentrácii s hodnotou RFI > 150 (CD86) alebo 200 (CD54)

B_{RFI} je hodnota RFI pri najvyššej koncentrácii s hodnotou RFI < 150 (CD86) alebo 200 (CD54)

Na účely presnejšieho odvodenia hodnôt EC150 a EC200 sa môžu vyžadovať tri nezávislé testovacie cykly *merania expzie* CD86/CD54. Konečné hodnoty EC150 a EC200 sa potom určia ako hodnota mediánu účinných koncentrácií (EC) vypočítaných z troch nezávislých testovacích cyklov. Keď kritériá pozitívnosti splňajú len dva z troch nezávislých testovacích cyklov (pozri odseky 26 – 27), použije sa vyššia hodnota EC150 alebo EC200 z dvoch vypočítaných hodnôt.

Kritériá prijateľnosti

29. Pri použití metódy h-CLAT majú byť splnené tieto kritériá prijateľnosti (22) (27).

- Hodnoty životaschopnosti buniek kontrol s rastovým médiom a kontrol s aplikáciou rozpúšťadla/kontrol s nosičom majú byť vyššie ako 90 %.

- Pri kontrole s aplikáciou rozpúšťadla/kontrole s nosičom nemajú hodnoty RFI pre CD86 ani pre CD54 prekročiť kritériá klasifikácie ako pozitívnej látky (RFI pre CD86 $\geq$ 150 % a RFI pre CD54 $\geq$ 200 %). Hodnoty RFI kontroly s aplikáciou rozpúšťadla/kontroly s nosičom sa vypočítajú pomocou vzorca opísaného v odseku 25 [výraz „MFI chemikálie“ sa nahrádza výrazom „MFI rozpúšťadla/nosiča“ a výraz „MFI rozpúšťadla/nosiča“ sa nahrádza výrazom „MFI kontroly (s rastovým médiom)“].
 - Pre kontroly s rastovým médiom aj kontroly s aplikáciou rozpúšťadla/kontroly s nosičom má byť pomer MFI pre CD86 aj pre CD54 voči izotypovej kontrole $>$ 105 %.
 - V pozitívnej kontrole (DNCB) majú hodnoty RFI pre CD86 aj CD54 spĺňať kritériá klasifikácie ako pozitívnej látky (RFI pre CD86 $\geq$ 150 a RFI pre CD54 $\geq$ 200) a životaschopnosť buniek má byť vyššia ako 50 %.
 - V prípade testovanej chemikálie má byť životaschopnosť buniek vyššia ako 50 % najmenej v štyroch testovaných koncentráciách v každom testovacom cykle.
30. Negatívne výsledky sú prijateľné len pri testovaných chemikáliách, pri ktorých sa prejavuje životaschopnosť buniek nižšia ako 90 % pri najvyššej testovanej koncentrácii (t. j. $1,2 \times CV75$ podľa schémy sériového riedenia opísanej v odseku 20). Ak je životaschopnosť buniek pri koncentrácii $1,2 \times CV75$ rovnaká alebo vyššia ako 90 %, tento negatívny výsledok sa vyradí. V takom prípade sa odporúča spresniť výber dávky opakovaným stanovením hodnoty CV75. Je potrebné poznamenať, že keď sa ako maximálna testovaná koncentrácia testovanej chemikálie použije 5 000 $\mu\text{g/ml}$ vo fyziologickom roztoku (alebo v rastovom médiu či iných rozpúšťadlách/nosičoch), 1 000 $\mu\text{g/ml}$ v DMSO alebo najvyššia rozpustná koncentrácia, negatívny výsledok je prijateľný, aj keď je životaschopnosť buniek vyššia ako 90 %.

Správa o teste

31. Správa o teste obsahuje tieto informácie:

Testovaná chemikália

Jednozložkové látky

- identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,
- fyzický vzťah, log Kow, rozpustnosť vo vode, rozpustnosť v DMSO, molekulová hmotnosť a iné relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu,
- čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

- úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie), ak sa uplatňuje,
- testované koncentrácie,
- podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,
- odôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča pre každú testovanú chemikáliu.

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi

- čo najpodrobnejšia charakterizácia, napr. prostredníctvom chemickej identity (pozri vyššie), čistoty, kvantitatívneho výskytu a relevantných fyzikálno-chemických vlastností (pozri vyššie) zložiek v dostupnom rozsahu,
- fyzický vzťah, rozpustnosť vo vode, rozpustnosť v DMSO a iné relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu,
- molekulová hmotnosť alebo relatívna molekulová hmotnosť v prípade zmesí/polymérov známeho zloženia alebo iné informácie potrebné na vykonanie štúdie,
- úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie), ak sa uplatňuje,
- testované koncentrácie,
- podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,
- odôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča pre každú testovanú chemikáliu.

Kontroly

Pozitívna kontrola

- identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,
- fyzický vzťah, log K_{ow} , rozpustnosť vo vode, rozpustnosť v DMSO, molekulová hmotnosť a iné relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu a podľa potreby,
- čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,
- úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie), ak sa uplatňuje,
- testované koncentrácie,
- podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,

- v uplatniteľnom prípade odkaz na historické výsledky pre pozitívne kontroly dokazujúce vhodné kritériá prijateľnosti testovacieho cyklu.

Negatívna kontrola a kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom

- identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,
- čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,
- fyzický vzhľad, molekulová hmotnosť a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v prípade, že sa použijú iné kontrolné rozpúšťadlá/nosiče ako tie uvedené v usmernení na vykonávanie testov, a to v dostupnom rozsahu,
- podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,
- odôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča pre každú testovanú chemikáliu.

Podmienky testu

- meno a adresa objednávateľa, testovacieho zariadenia a vedúceho štúdie,
- opis použitého testu,
- použitá bunková línia, podmienky jej skladovania a zdroj (napr. zariadenie, z ktorého bola získaná),
- použitá prietoková cytometria (napr. model) vrátane použitých nastavení prístroja, globulínu, protilátok a markera cytotoxicity,
- postup použitý na preukázanie spôsobilosti laboratória vykonávať daný test testovaním chemikálií na preukázanie spôsobilosti a postup použitý na preukázanie opakovateľného vykonávania testu v priebehu času, napr. údaje o historických kontrolách a/alebo údaje o historických kontrolách reaktivity.

Kritériá prijateľnosti testu

- hodnoty životaschopnosti buniek, hodnoty MFI a RFI získané pomocou kontroly s aplikáciou rozpúšťadla/kontroly s nosičom v porovnaní s rozsahmi prijateľnosti,
- hodnoty životaschopnosti buniek a hodnoty RFI získané pomocou pozitívnej kontroly v porovnaní s rozsahmi prijateľnosti,
- životaschopnosť buniek pri všetkých testovaných koncentráciách testovanej chemikálie.

Testovací postup

- počet použitých testovacích cyklov,
- použité koncentrácie testovaných chemikálií, ich použitie a expozičný čas (ak sa líšia od odporúčaných),
- trvanie expozície (ak sa líši od odporúčaného trvania),
- opis použitých kritérií hodnotenia a rozhodovania,
- opis všetkých zmien v testovacom postupe.

Výsledky

- údaje v tabuľkovej podobe vrátane CV75 (v uplatniteľnom prípade), individuálnych geometrických priemerov MFI, RFI, hodnôt životaschopnosti buniek, hodnôt EC150/EC200 (v uplatniteľnom prípade) získaných pri testovanej chemikálii a pri pozitívnej kontrole v každom testovacom cykle, ako aj uvedenie hodnotenia testovanej chemikálie podľa prognostického modelu,
- v uplatniteľnom prípade opis všetkých relevantných pozorovaní.

Rozbor výsledkov

- rozbor výsledkov získaných metódou h-CLAT,
- posúdenie výsledkov testu v kontexte IATA, ak sú k dispozícii iné relevantné informácie.

Záver

LITERATÚRA

- (1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro* 20, 767 – 773.
- (2) Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol. In Vitro* 21, 428 – 437.
- (3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. K dispozícii na lokalite: <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). K dispozícii na lokalite: <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. K dispozícii na lokalite:: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. J. Toxicol. Sci. 38, 599 – 609.
- (15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275 – 284.
- (16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch Toxicol 87, 1683 – 1969.

- (17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6th report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81 – 88.
- (18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), s. 23. K dispozícii na lokalite: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
- (19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamoto K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70 – 82.
- (20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89 – 96.
- (21) OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 2005, s. 96.
- (22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No 168. K dispozícii na lokalite: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- (23) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. K dispozícii na lokalite: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).

- (25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27 – 35.

Dodatok 1.1

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: miera zhody výsledkov testu s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o mieru výkonnosti testu a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa zameniteľne s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testu (21).

AOP (dráha nepriaznivého účinku): sled udalostí od chemickej štruktúry cieľovej chemikálie alebo skupiny podobných chemikálií cez molekulárnu iniciačnú udalosť až po výsledok *in vivo*, ktorý je predmetom záujmu (22).

Chemikália: látka alebo zmes.

CV75: odhadovaná koncentrácia, pri ktorej sa pozoruje 75% životaschopnosť buniek.

EC150: koncentrácie, pri ktorých sa vykazujú hodnoty RFI 150 pri expresii CD86.

EC200: koncentrácie, pri ktorých sa vykazujú hodnoty RFI 200 pri expresii CD54.

Prietoková cytometria: cytometrická technika, pri ktorej bunky rozmiešané v kvapaline prechádzajú jednotlivo cez ohnisko excitovaného svetla, ktoré je rozptýlené podľa vzorov charakteristických pre bunky a ich zložky. Bunky sa často označujú pomocou fluorescenčných markerov, vďaka čomu sa svetlo najskôr absorbuje a následne emituje v zmenených frekvenciách.

Nebezpečnosť: inherentná vlastnosť činidla, prípadne situácia, ktorá môže vyvolať nepriaznivé účinky pri expozícii organizmu, systému alebo (sub)populácie účinkom daného činidla.

IATA (integrovaný prístup k testovaniu a hodnoteniu): štruktúrovaný prístup používaný na identifikáciu (potenciálnej) nebezpečnosti, charakterizáciu nebezpečnosti (z hľadiska potencie) a/alebo hodnotenie bezpečnosti (potenciál/potencia a expozícia) chemikálie alebo skupiny chemikálií, ktorý strategicky integruje a porovnáva všetky relevantné údaje v záujme prijatia regulačného rozhodnutia o potenciálnej nebezpečnosti a/alebo riziku a/alebo potrebe vykonania ďalších cielených, t. j. minimálnych testov.

Kontrola s rastovým médiom: neošetrený replikát, ktorý obsahuje všetky zložky testovacieho systému. Táto vzorka sa spracuje so vzorkami ošetrovanými testovanou chemikáliou, ako aj s inými kontrolnými vzorkami s cieľom zistiť, či rozpúšťadlo/nosič a testovací systém na seba navzájom pôsobia.

Zmes: zmes alebo roztok zložený z dvoch alebo viacerých látok.

Jednozložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je hlavná zložka zastúpená v koncentrácii najmenej 80 hm. %.

Viaczložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je viac ako jedna hlavná zložka zastúpená v koncentrácii ≥ 10 hm. % a < 80 hm. %. Viaczložková látka je výsledkom výrobného procesu. Rozdiel medzi zmesou a viaczložkovou látkou spočíva v tom, že zmes sa získava zmiešaním dvoch alebo viacerých látok bez toho, aby došlo k chemickej reakcii. Viaczložková látka je výsledkom chemickej reakcie.

Pozitívna kontrola: replikát obsahujúci všetky zložky testovacieho systému a ošetrovanej látkou, ktorá je známa tým, že vyvoláva pozitívnu reakciu. Aby bolo možné vyhodnotiť variabilitu reakcie na pozitívnu kontrolu v čase, nesmie byť rozsah pozitívnej reakcie nadmerne veľký.

Pre-haptény: chemikálie, ktoré sa stávajú senzibilizátormi prostredníctvom abiotickej transformácie.

Pro-haptény: chemikálie, pri ktorých sa vyžaduje enzymatická aktivácia na to, aby vznikol potenciál kožnej senzibilizácie.

Relatívna fluorescenčná intenzita (RFI): relatívne hodnoty geometrického priemeru intenzity fluorescencie (MFI) v bunkách ošetrovaných chemikáliou v porovnaní s hodnotou MFI pri bunkách ošetrovaných rozpúšťadlom/nosičom.

Relevantnosť: opis vzťahu testu k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a toho, či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej sa testom správne meria alebo predpovedá biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) testu (21).

Spoľahlivosť: miera rozsahu, v rámci ktorého sa môže test počas istého časového obdobia reprodukovateľne vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Hodnotí sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti a vnútrolaboratórnej opakovateľnosti (21).

Testovací cyklus: testovací cyklus pozostáva z jednej alebo viacerých testovaných chemikálií testovaných súbežne s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla/kontrolou s nosičom a s pozitívnou kontrolou.

Citlivosť: podiel všetkých pozitívnych/aktívnych chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testu, ktorý poskytuje kategorizačné výsledky. Ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testu (21).

Vyfarbovací tlmivý roztok: fosfátový tlmivý fyziologický roztok obsahujúci 0,1 % bovinného sérového albumínu.

Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom: neošetrená vzorka obsahujúca všetky zložky testovacieho systému okrem testovanej chemikálie, ale vrátane použitého rozpúšťadla/nosiča. Slúži na stanovenie základnej reakcie vzoriek ošetrovaných testovanou chemikáliou rozpustenou alebo stabilne rozmiešanou v rovnakom rozpúšťadle/nosiči. Keď sa táto vzorka testuje so súbežnou kontrolou s rastovým médiom, preukáže sa aj to, či rozpúšťadlo/nosič a testovací systém na seba navzájom pôsobia.

Špecifickosť: podiel všetkých negatívnych/neaktívnych chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testu, ktorý poskytuje kategorizačné výsledky. Ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testu (21).

Látka: chemický prvok a jeho zlúčeniny v prírodnom stave alebo získané akýmkoľvek výrobným postupom vrátane všetkých prísad potrebných na udržanie ich stability a všetkých nečistôt pochádzajúcich z použitého postupu, ktorý však nezahŕňa žiadne rozpúšťadlá, ktoré možno oddeliť bez ovplyvnenia stability látky alebo zmeny jej zloženia.

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto metódy.

Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií OSN (GHS OSN): systém, ktorým sa navrhuje klasifikácia chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a úrovní fyzikálnej, zdravotnej a environmentálnej nebezpečnosti a ich označovanie zodpovedajúcimi komunikačnými prvkami, ako sú piktogramy, výstražné slová, výstražné upozornenia, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov, s cieľom poskytnúť informácie o nepriaznivých účinkoch daných chemikálií v záujme ochrany osôb (vrátane zamestnávateľov, pracovníkov, prepravcov, spotrebiteľov a subjektov reakcie na núdzové situácie) a životného prostredia (23).

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

Platný test: test, ktorý sa na daný účel považuje za dostatočne relevantný a spoľahlivý a ktorý je založený na vedecky podložených zásadách. Test nie je nikdy platný v absolútnom zmysle, ale len vo vzťahu k vymedzenému účelu (21).

Dodatok 1.2

LÁTKY NA PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI

Je potrebné, aby laboratóriá pred začatím bežného používania testu opísaného v tomto dodatku k testovacej metóde B.71 preukázali technickú spôsobilosť tak, že správne získajú očakávanú prognózu výsledku testu h-CLAT v prípade 10 chemikálií odporúčaných v tabuľke 1 a získajú hodnoty CV75, EC150 a EC200, ktoré patria do príslušného referenčného rozsahu pre najmenej 8 z 10 látok na preukázanie spôsobilosti. Látky na preukázanie spôsobilosti boli vybrané tak, aby reprezentovali rozsah reakcií z hľadiska nebezpečenstva kožnej senzibilizácie. Medzi ďalšie výberové kritériá patrilo to, aby boli látky komerčne dostupné a aby boli dostupné referenčné údaje *in vivo* s vysokou kvalitou, ako aj údaje *in vitro* s vysokou kvalitou vygenerované pomocou metódy h-CLAT. Pre metódu h-CLAT sú k dispozícii aj publikované referenčné údaje (3) (14).

Tabuľka 1: Odporúčané látky na preukazovanie technickej spôsobilosti pri metóde h-CLAT

Látky na preukázanie spôsobilosti	Registračné číslo CAS	Skupenstvo	Prognóza <i>in vivo</i> ¹	Referenčný rozsah CV75 v µg/ml ²	Výsledky h-CLAT pre CD86 (referenčný rozsah EC150 v µg/ml) ²	Výsledky h-CLAT pre CD54 (Referenčný rozsah EC200 v µg/ml) ²
2,4-dinitrochlórbenzén	97-00-7	tuhé	senzibilizátor (extrémny)	2 – 12	pozitívne (0,5 – 10)	pozitívne (0,5 – 15)
4-fenyléndiamín	106-50-3	tuhé	senzibilizátor (silný)	5 – 95	pozitívne (< 40)	negatívne (> 1,5) ³
síran nikelnatý	10101-97-0	tuhé	senzibilizátor (mierny)	30 – 500	pozitívne (< 100)	pozitívne (10 – 100)
2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	tuhé	senzibilizátor (mierny)	30 – 400	negatívne (> 10) ³	pozitívne (10 – 140)
R(+)-limonén	5989-27-5	kvapalné	senzibilizátor (slabý)	> 20	negatívne (> 5) ³	pozitívne (< 250)
imidazolidinyl močovina	39236-46-9	tuhé	senzibilizátor (slabý)	25 – 100	pozitívne (20 – 90)	pozitívne (20 – 75)
izopropanol	67-63-0	kvapalné	nespôsobuje senzibilizáciu	> 5 000	negatívne (> 5 000)	negatívne (> 5 000)
glycerol	56-81-5	kvapalné	nespôsobuje senzibilizáciu	> 5 000	negatívne (> 5 000)	negatívne (> 5 000)
kyselina mliečna	50-21-5	kvapalné	nespôsobuje senzibilizáciu	1 500 – 5 000	negatívne (> 5 000)	negatívne (> 5 000)
kyselina 4-aminobenzoová	150-13-0	tuhé	nespôsobuje senzibilizáciu	> 1 000	negatívne (> 1 000)	negatívne (> 1 000)

Skratky: Registračné číslo CAS = číslo v registri služby CAS (Chemical Abstracts Service)

¹ Prognóza nebezpečnosti a (potencie) *in vivo* na základe údajov LLNA (3) (14). Potencia *in vivo* je odvodená pomocou kritérií navrhnutých organizáciou ECETOC (24).

² Na základe historických pozorovaných hodnôt (13) (25).

³ Historicky sa väčšina negatívnych výsledkov získala pre tento marker, a preto sa prevažne očakáva negatívny výsledok. Uvedený rozsah bol vymedzený na základe malého počtu historicky pozorovaných pozitívnych výsledkov. V prípade, že sa získa pozitívny výsledok, hodnota EC má byť v rámci uvádzaného referenčného rozsahu.

Dodatok 2

KOŽNÁ SENZIBILIZÁCIA *IN VITRO*: TEST AKTIVÁCIE BUKOVEJ LÍNIE U937 (U-SENS™)

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

1. V teste U-SENS™ sa kvantifikuje zmena expresie povrchového bunkového markera v súvislosti s procesom aktivácie monocytov a dendritových buniek (DC) (t. j. CD86) v bunkovej línii U937 ľudského histiocytového lymfómu po expozícii senzibilizátorom (1). Namerané úrovne expresie povrchového bunkového markera CD86 v bunkovej línii U937 následne slúžia ako ukazovateľ pri rozlišovaní medzi kožnými senzibilizátormi a látkami nespôsobujúcimi senzibilizáciu.
2. Test U-SENS™ sa hodnotil v rámci validačnej štúdie (2) koordinovanej spoločnosťou L'Oreal a následne bol predmetom nezávislého partnerského preskúmania zo strany vedeckého poradného výboru (ESAC) referenčného laboratória Európskej únie pre alternatívy k testovaniu na zvieratách (EURL ECVAM) (3). Na základe zváženia všetkých dostupných dôkazov a vstupov regulačných orgánov a zainteresovaných strán vydalo laboratórium EURL ECVAM odporúčanie (4), aby sa test U-SENS™ používal na podporu rozlíšenia senzibilizátorov od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu v rámci IATA na účely klasifikácie a označovania nebezpečnosti. OECD sa v usmerňovacom dokumente o vykazovaní štruktúrovaných prístupov k integrácii údajov a k individuálnym zdrojom informácií, ktoré sa používajú v rámci IATA v prípade kožnej senzibilizácie, v súčasnosti venuje viacerým prípadovým štúdiám opisujúcim rôzne stratégie testovania a prognostické modely. Jeden z uvedených rôznych vymedzených prístupov je založený na skúške U-SENS (5). Príklady použitia údajov z testu U-SENS™ v kombinácii s inými informáciami vrátane historických údajov a existujúcich platných údajov o ľuďoch (6) sú uvedené v literatúre (4) (5) (7).
3. Preukázalo sa, že test U-SENS™ je prenosný do laboratórií, ktoré majú skúsenosti s technikami týkajúcimi sa bunkových kultúr a s analýzou pomocou prietokovej cytometrie. Úroveň reprodukovateľnosti v prognózach, ktorú možno od tohto testu očakávať, je rádovo 90 % v rámci laboratória a 84 % medzi laboratóriami (8). Z výsledkov získaných vo validačnej štúdii (8) a v iných uverejnených štúdiách (1) celkovo vyplýva, že v porovnaní s výsledkami LLNA presnosť pri odlišovaní kožných senzibilizátorov (t. j. kategória 1 GHS OSN/CLP) od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu predstavuje 86 % (N = 166) s citlivosťou 91 % (118/129) a so špecifickosťou 65 % (24/37). V porovnaní

s výsledkami u ľudí presnosť pri odlišovaní kožných senzibilizátorov (t. j. kategória 1 GHS OSN/CLP) od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu predstavuje 77 % (N = 101) s citlivosťou 100 % (58/58) a so špecifickosťou 47 % (20/43). V porovnaní s LLNA povedie test U-SENS™ s väčšou pravdepodobnosťou k falošne negatívnym prognózam v prípade chemikálií, ktoré vykazujú nízku až miernu potenciu z hľadiska kožnej senzibilizácie (t. j. podkategória 1B GHS OSN/CLP), než v prípade chemikálií vykazujúcich vysokú potenciu z hľadiska kožnej senzibilizácie (t. j. podkategória 1A GHS OSN/CLP) (1) (8) (9). Celkovo z týchto informácií vyplýva, že test U-SENS™ je užitočný a môže prispieť k zisteniu nebezpečnosti z hľadiska kožnej senzibilizácie. Uvedené hodnoty presnosti testu U-SENS™ ako samostatného testu sú však len orientačné, keďže test sa má hodnotiť v kombinácii s inými zdrojmi informácií v kontexte IATA a v súlade s ustanoveniami odsekov 7 a 8 všeobecného úvodu. Okrem toho by sa pri hodnotení metód na zistenie kožnej senzibilizácie bez použitia zvierat malo zohľadniť to, že test LLNA ani iné testy na zvieratách nemusia v plnej miere odzrkadľovať situáciu u ľudí.

4. Na základe v súčasnosti dostupných údajov sa preukázalo, že test U-SENS™ možno použiť v prípade testovaných chemikálií (vrátane zložiek kozmetických výrobkov, napr. konzervačných látok, povrchovo aktívnych látok, účinných látok, farbív), ktoré predstavujú rôzne organické funkčné skupiny, fyzikálno-chemické vlastnosti, potenciu z hľadiska kožnej senzibilizácie (na základe stanovenia v štúdiách *in vivo*) a spektrum mechanizmov reakcie, o ktorých je známe, že súvisia s kožnou senzibilizáciou (t. j. Michaelov akceptor, vznik Schiffových zásad, prvok sprostredkujúci prenos acylovej skupiny, nukleofilná bimolekulová substitúcia [SN₂] alebo nukleofilná substitúcia na aromatickom jadre [SN_{Ar}]) (1) (8) (9) (10). Test U-SENS™ sa používa pri testovaní chemikálií, ktoré sú rozpustné alebo vytvárajú stabilné disperzie (t. j. koloid alebo suspenziu, v ktorej sa testovaná chemikália neusadí ani neoddelí od rozpúšťadla/nosiča do rôznych fáz) vo vhodnom rozpúšťadle/nosiči (pozri odsek 13). Pomocou testu U-SENS™ sa dosiahla správna prognóza v prípade chemikálií, ktoré sú v množine údajov uvádzané ako pre-haptény (t. j. látky aktivované oxidáciou) alebo pro-haptény (t. j. látky vyžadujúce enzymatickú aktiváciu, napríklad pomocou enzýmov P450) (1) (10). Látky spôsobujúce narušenie membrány môžu viesť k falošne pozitívnym výsledkom vzhľadom na nešpecifické zvýšenie expresie CD86, keďže 3 zo 7 falošne pozitívnych látok vzhľadom na referenčnú klasifikáciu *in vivo* boli povrchovo aktívne látky (1). Takéto pozitívne výsledky v prípade povrchovo aktívnych látok je potrebné posudzovať obozretne, zatiaľ čo negatívne výsledky v prípade povrchovo aktívnych látok možno použiť na podporu identifikácie testovanej chemikálie ako látky nespôsobujúcej senzibilizáciu. Fluorescenčné testované chemikálie možno hodnotiť pomocou testu U-SENS™ (1), silné fluorescenčné

testované chemikálie, ktoré emitujú svetlo na rovnakej vlnovej dĺžke ako fluoresceín-izotio-kyanát (FITC) alebo propídium-jodid (PI), však budú ovplyvňovať detekciu pomocou prietokovej cytometrie, a preto ich nemožno správne hodnotiť pomocou protilátok konjugovaných s FITC (potenciálne falošne negatívny výsledok) alebo pomocou PI (nie je možné merať životaschopnosť). V takom prípade možno použiť iné protilátky označené fluorochrómom alebo iné markery cytotoxicity, pokiaľ sa preukázalo, že poskytujú rovnaké výsledky ako protilátky označené pomocou FITC alebo PI (pozri odsek 18), napr. testovaním látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 2.2. Vzhľadom na vyššie uvedené informácie je potrebné interpretovať pozitívne výsledky v prípade povrchovo aktívnych látok a negatívne výsledky v prípade silných fluorescenčných testovaných chemikálií v kontexte uvedených obmedzení a spoločne s inými zdrojmi informácií v rámci IATA. V prípade, že existujú dôkazy o nepoužiteľnosti testu U-SENS™ na iné špecifické kategórie testovaných chemikálií, by sa tento test nemal pri týchto špecifických kategóriách použiť.

5. Ako bolo opísané vyššie, test U-SENS™ umožňuje rozlišovanie medzi kožnými senzibilizátormi a látkami nespôsobujúcimi senzibilizáciu. Môže však takisto potenciálne prispieť k posúdeniu potencie z hľadiska senzibilizácie, ak sa použije v rámci integrovaných prístupov ako IATA. Na to, aby bolo možné určiť, ako výsledky testu U-SENS™ môžu prispieť k posudzovaniu tejto potencie, však bude potrebná ďalšia práca, pokiaľ možno založená na údajoch týkajúcich sa človeka.
6. Vymedzenie pojmov je uvedené v dodatku 2.1.

PRINCÍP TESTU

7. Test U-SENS™ predstavuje skúšku *in vitro*, v ktorej sa kvantifikujú zmeny expresie povrchového bunkového markera CD86 v bunkách U937 bunkovej línie ľudského histiocytového lymfómu po expozícii testovanej chemikálii v trvaní 45 ± 3 hod. Povrchový marker CD86 je jedným typickým markerom aktivácie U937. Je známe, že CD86 je kostimulačná molekula, ktorá môže imitovať monocytovú aktiváciu zohrávajúcu významnú úlohu pri prvotnej aktivácii T-buniek. Zmeny expresie povrchového bunkového markera CD86 sa merajú pomocou prietokovej cytometrie po zafarbení buniek zvyčajne pomocou protilátok označených fluoresceín-izotio-kyanátom (FITC). Súčasne sa uskutočňuje aj meranie cytotoxicity (napr. pomocou PI) s cieľom posúdiť, či pri nižších ako cytotoxických koncentráciách dochádza k zvýšeniu expresie povrchového bunkového markera CD86. Vypočíta sa stimulačný index (SI) povrchového bunkového markera CD86 v porovnaní s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla/kontrolou s nosičom, ktorý sa použije

v prognostickom modeli (pozri odsek 19) na podporu rozlíšenia senzibilizátorov od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu.

PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI

8. Je potrebné, aby laboratória pred začatím bežného používania testu opísaného v tomto dodatku k testovacej metóde B.71 preukázali technickú spôsobilosť použitím 10 látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 2.2 v súlade so správnymi postupmi metód *in vitro* (11). Používatelia testu majú okrem toho viesť historickú databázu údajov vytvorených na základe kontrol reaktivity (pozri odsek 11) a pozitívnych kontrol a kontrol s aplikáciou rozpúšťadla/kontrol s nosičom (pozri odseky 15 – 16) a na základe týchto údajov potvrdiť, že sa v priebehu času zachováva reprodukovateľnosť testu v ich laboratóriu.

POSTUP

9. Tento test je založený na protokole DB-ALM (DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation – databázová služba v súvislosti s alternatívnymi metódami k pokusom na zvieratách) č. 183 k testu U-SENS™ (12). Pri zavádzaní a využívaní testu U-SENS™ v laboratóriu sa majú používať štandardné prevádzkové postupy (SOP). Na používanie testu U-SENS™ možno použiť automatizovaný systém, ak pri ňom možno preukázať, že poskytuje podobné výsledky, napríklad pomocou testovania látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 2.2. Ďalej je uvedený opis hlavných zložiek a postupov testu U-SENS™.

Príprava buniek

10. Na vykonanie testu U-SENS™ sa používa bunková línia U937 ľudského histiocytového lymfómu (13). Bunky (klon CRL1593.2) sa majú získať z riadne kvalifikovanej bunkovej banky, ako je napríklad bunková banka ATCC (American Type Culture Collection).
11. Bunky U937 sa kultivujú pri teplote 37 °C v atmosfére s vyššou relatívnou vlhkosťou a 5 % CO₂ v rastovom médiu RPMI-1640 s pridaním 10 % fetálneho teľacieho séra (FCS), L-glutamínu s koncentráciou 2 mM, 100 jednotiek/ml penicilínu a 100 µg/ml streptomycínu (úplné rastové médium). Pasážovanie buniek U937 sa štandardne uskutočňuje každé 2 – 3 dni s hustotou 1,5, resp. 3×10^5 buniek/ml. Hustota buniek nemá prekročiť 2×10^6 buniek/ml a životaschopnosť buniek, ktorá sa meria na základe vylúčenia trypanovej modrej, má byť ≥ 90 % (nemá sa použiť pri prvej pasáži po rozmrazení). Pred použitím na testovanie sa každá šarža buniek, FCS alebo protilátok kvalifikuje

uskutočnením kontroly reaktivity. Na kontrolu reaktivity buniek sa používa pozitívna kontrola, kyselina 2,4,6-trinitrobenzénsulfónová trihydrát: TNBS) (registračné číslo CAS 2508-19-2, čistota $\geq 99\%$), a negatívna kontrola, kyselina mliečna (LA) (registračné číslo CAS 50-21-5, čistota $\geq 85\%$), a to aspoň jeden týždeň po rozmrazení. Na kontrolu reaktivity sa testuje šesť konečných koncentrácií pre každú z týchto dvoch kontrol (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/ml}$ a LA: 1, 10, 20, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$). V prípade TNBS rozpustenej v úplnom rastovom médiu sa má pri CD86 dosiahnuť pozitívna reakcia a reakcia závislá od koncentrácie (napr. keď za pozitívnu koncentráciu, SI pre CD86 ≥ 150 , nasleduje koncentrácia s rastúcou hodnotou SI pre CD86) a v prípade LA rozpustenej v úplnom rastovom médiu sa má pri CD86 dosiahnuť negatívna reakcia (pozri odsek 21). V rámci skúšky sa použije len tá šarža buniek, ktorá dvakrát vyhovela pri kontrole reaktivity. Bunky možno po rozmrazení rozmnožovať až sedem týždňov. Nemá sa prekročiť 21 pasáží. Kontrola reaktivity sa má uskutočniť podľa postupov opísaných v odsekoch 18 – 22.

12. Na účely testovania sa bunky U937 nasadia s hustotou 3×10^5 buniek/ml alebo 6×10^5 buniek/ml a predbežne sa kultivujú v kultivačných bankách 2 dni, resp. 1 deň. Iné podmienky predbežnej kultivácie ako tie, ktoré sú opísané vyššie, možno použiť, ak sa uvedie dostatočné vedecké zdôvodnenie a ak pri nich možno preukázať, že poskytujú podobné výsledky, napríklad pomocou testovania látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 2.2. V deň testovania sa bunky zozbierané z kultivačnej banky resuspendujú pomocou čerstvého rastového média s koncentráciou 5×10^5 buniek/ml. Bunky sa ďalej rozdelia na 96-jamkovú mikrotitračnú platničku s plochým dnom po 100 μl (konečná hustota buniek $0,5 \times 10^5$ buniek/jamka).

Príprava testovaných chemikálií a kontrolných látok

13. Pred testovaním sa uskutoční posúdenie rozpustnosti. Na tento účel sa testované chemikálie rozpustia alebo stabilne rozmiešajú s koncentráciou 50 mg/ml v úplnom rastovom médiu, ktoré predstavuje prvú možnosť pri výbere rozpúšťadla, alebo v dimetylsulfoxide (DMSO, čistota $\geq 99\%$), ktorý predstavuje druhú možnosť pri výbere rozpúšťadla/nosiča, ak testovaná chemikália nie je rozpustná v rozpúšťadle/nosiči s úplným rastovým médiom. Na účely tohto testovania sa testovaná chemikália rozpustí s konečnou koncentráciou 0,4 mg/ml v úplnom rastovom médiu, ak je chemikália rozpustná v tomto rozpúšťadle/nosiči. Ak je chemikália rozpustná len v DMSO, rozpustí sa s koncentráciou 50 mg/ml. Iné rozpúšťadlá/nosiče ako tie, ktoré sú opísané vyššie, možno použiť, ak sa uvedie dostatočné vedecké zdôvodnenie. Zohľadňuje sa aj stabilita testovanej chemikálie v konečnom rozpúšťadle/nosiči.

14. Testované chemikálie a kontrolné látky sa pripravujú v deň testovania. Keďže sa neuskutočňuje skúška na stanovenie dávky, v prvom testovacom cykle sa testuje 6 konečných koncentrácií (1, 10, 20, 50, 100 a 200 µg/ml) v príslušnom rozpúšťadle/nosiči, a to buď v úplnom rastovom médiu, alebo v 0,4 % DMSO v rastovom médiu. V nasledujúcich testovacích cykloch, pri ktorých sa začína s roztokmi testovanej chemikálie od koncentrácie 0,4 mg/ml v úplnom rastovom médiu alebo 50 mg/ml v DMSO, sa pripravia aspoň 4 pracovné roztoky (t. j. aspoň 4 koncentrácie) v príslušnom rozpúšťadle/nosiči. Pracovné roztoky sa nakoniec použijú na ošetrovanie pridaním rovnakého objemu bunkovej suspenzie U937 (pozri odsek 11 vyššie) k objemu pracovného roztoku na mikrotitračnej platničke, aby sa dosiahlo ďalšie dvojnásobné riedenie (12). Koncentrácie (aspoň 4 koncentrácie) pre akýkoľvek ďalší testovací cyklus sa zvolia na základe jednotlivých výsledkov všetkých predchádzajúcich testovacích cyklov (8). Použiteľné konečné koncentrácie sú 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 a 200 µg/ml. Maximálna konečná koncentrácia je 200 µg/ml. V prípade, že sa pri CD86 pozoruje pozitívna hodnota pri koncentrácii 1 µg/ml, vyhodnotí sa koncentrácia 0,1 µg/ml s cieľom zistiť koncentráciu testovanej chemikálie, ktorá nespôsobuje indukciu CD86 nad hranicu pozitívnej klasifikácie. Pri každom testovacom cykle sa vypočíta hodnota EC150 (koncentrácia, pri ktorej sa pri chemikálii dosahuje hranica pozitívnej klasifikácie z hľadiska CD86 na úrovni 150 %, pozri odsek 19), ak sa pozoruje pozitívna reakcia v závislosti od koncentrácie v prípade CD86. V prípade, že testovaná chemikália vyvoláva pozitívnu reakciu CD86, ktorá nesúvisí s koncentráciou, výpočet hodnoty EC150 nemusí byť relevantný, ako sa opisuje v protokole DB-ALM č. 183 k testu U-SENSTM (12). Vždy, keď je to možné, sa pri každom testovacom cykle vypočíta hodnota CV70 (koncentrácia, pri ktorej sa pri chemikálii dosahuje hranica cytotoxicity na úrovni 70 %, pozri odsek 19) (12). S cieľom skúmať účinok zvýšenia CD86 z hľadiska závislosti od koncentrácie je potrebné zvoliť všetky koncentrácie spomedzi použiteľných koncentrácií tak, aby boli rovnomerne rozložené medzi hodnotou EC150 (alebo najvyššou negatívnou koncentráciou CD86, ktorá nie je cytotoxická) a hodnotou CV70 (alebo najvyššou povolenou koncentráciou, t. j. 200 µg/ml). V každom testovacom cykle sa majú testovať najmenej 4 koncentrácie, pričom na účely porovnania majú byť aspoň 2 koncentrácie spoločné s predchádzajúcimi testovacími cyklami.
15. V teste U-SENSTM sa ako kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom používa úplné rastové médium (v prípade testovaných chemikálií, ktoré sú rozpustené alebo stabilne rozmiešané) (pozri odsek 4) alebo 0,4 % DMSO v úplnom rastovom médiu (v prípade testovaných chemikálií rozpustených alebo stabilne rozmiešaných v DMSO).

16. Ako pozitívna kontrola sa v teste U-SENS™ používa TNBS (pozri odsek 11) pripravená v úplnom rastovom médiu. TNBS sa použije na platničke ako pozitívna kontrola pre meranie expresie CD86 v jednej konečnej koncentrácii (50 µg/ml), pri ktorej sa dosahuje životaschopnosť buniek > 70 %. Na získanie koncentrácie 50 µg/ml TNBS na platničke sa pripraví zásobný roztok s koncentráciou 1 M (t. j. 293 mg/ml) TNBS v úplnom rastovom médiu a ďalej sa 2 930-násobne zriedi s úplným rastovým médiom na pracovný roztok s koncentráciou 100 µg/ml. Ako negatívna kontrola sa použije kyselina mliečna (LA, CAS 50-21-5) s koncentráciou 200 µg/ml, ktorá je rozpustená v úplnom rastovom médiu (zo zásobného roztoku s koncentráciou 0,4 mg/ml). Na každej platničke každého testovacieho cyklu sa pripravujú tri replikáty neošetrenej kontroly s úplným rastovým médiom, kontroly s aplikáciou rozpúšťadla/kontroly s nosičom, negatívnych a pozitívnych kontrol (12). Použiť možno iné vhodné pozitívne kontroly, ak sú k dispozícii historické údaje na odvodenie kritérií prijateľnosti porovnateľných testovacích cyklov. Kritériá prijateľnosti testovacieho cyklu sú rovnaké ako kritériá prijateľnosti opísané pre testovanú chemikáliu (pozri odsek 12).

Aplikácia testovaných chemikálií a kontrolných látok

17. Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom alebo pracovné roztoky opísané v odsekoch 14 – 16 sa zmiešajú v objemovom pomere 1:1 s bunkovými suspenziami pripravenými na 96-jamkovej mikrotitračnej platničke s plochým dnom (pozri odsek 12). Ošetrované platničky sa potom inkubujú 45 ± 3 hod. pri teplote 37 °C a v atmosfére s obsahom 5 % CO₂. Pred inkubáciou sa mikrotitračné platničky uzatvoria polopriepustnou membránou, aby sa zabránilo vyparovaniu prchavých testovaných chemikálií a krížovej kontaminácii medzi jamkami ošetrovanými testovanými chemikáliami (12).

Farbenie buniek

18. Po expozícii v trvaní 45 ± 3 hod. sa bunky preniesú na mikrotitračnú platničku s kónickým dnom a vykoná sa ich odber pomocou centrifugácie. Interferencia z hľadiska rozpustnosti sa prejavuje vytvorením kryštálov alebo kvapiek, ktoré možno pozorovať pod mikroskopom 45 ± 3 hod. po ošetrení (pred zafarbením buniek). Supernatanty sa odstránia a zvyšné bunky sa jedenkrát premyjú pomocou 100 µl ľadového fosfátového tlmivého fyziologického roztoku (PBS) s obsahom 5 % fetálneho teľacieho séra (vyfarbovací tlmivý roztok). Po centrifugácii sa bunky resuspendujú pomocou 100 µl vyfarbovacieho tlmivého roztoku a zafarbujú sa pomocou 5 µl (napr. 0,25 µg) anti-CD86 protilátok alebo myších protilátok (izotypu) IgG1 označených pomocou FITC pri teplote 4 °C počas 30 min, pričom sú chránené pred svetlom. Použijú sa protilátky opísané v protokole DB-ALM č. 183 (12) k testu U-SENS™ (pre CD86: BD-PharMingen č. 555657, klon: Fun-1 alebo

Caltag/Invitrogen č. MHCD8601, klon: BU63; a pre IgG1: BD-PharMingen č. 555748 alebo Caltag/Invitrogen č. GM4992). Zo skúseností tvorcov testu vyplýva, že intenzita fluorescencie protilátok je medzi rôznymi šaržami zvyčajne jednotná. V skúške možno použiť aj iné klony alebo protilátky od iného dodávateľa, ktoré vyhoveli pri kontrole reaktivity (pozri odsek 11). Používatelia však môžu zvážiť titráciu protilátok v podmienkach vlastného laboratória s cieľom stanoviť najvhodnejšiu koncentráciu, ktorá sa má použiť. Iný systém detekcie, napr. anti-CD86 protilátky označené fluorochrómom, možno použiť, ak pri nich možno preukázať, že poskytujú podobné výsledky ako protilátky konjugované s FITC, napríklad pomocou testovania látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 2.2. Bunky sa premyjú dvakrát pomocou 100 µl vyfarbovacieho tlmivého roztoku a jedenkrát pomocou 100 µl ľadového PBS a následne sa resuspendujú v ľadovom PBS (napr. 125 µl pri vzorkách, ktoré sa analyzujú manuálne po jednotlivých skúmavkách, alebo 50 µl pri použití platničky s automatickým dávkovačom) a pridá sa roztok PI (konečná koncentrácia 3 µg/ml). Možno použiť aj iné markery cytotoxicity, ako je 7-aminoaktinomycín D (7-AAD) alebo trypanová modrá, ak pri týchto alternatívnych farbivách možno preukázať, že poskytujú podobné výsledky ako PI, napríklad pomocou testovania látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 2.2.

Analýza pomocou prietokovej cytometrie

19. Pomocou prietokovej cytometrie sa analyzuje úroveň expresie CD86, ako aj životaschopnosť buniek. Bunky sa zobrazujú v rámci bodového grafu veľkosti (FSC) a granulácie (SSC) v logaritmickej mierke, aby bolo možné zreteľne identifikovať populáciu v prvej ohraničenej oblasti (gate) R1 a eliminovať úlomky buniek. V každej jamke sa vyžaduje dosiahnutie celkového cieľového počtu 10 000 buniek v ohraničenej oblasti R1. Bunky z rovnakej ohraničenej oblasti (gate) R1 sa zobrazujú v bodovom grafe FL3 alebo FL4/SSC. Životaschopné bunky sa vymedzia označením druhej ohraničenej oblasti R2, pomocou ktorej sa vyberie populácia buniek bez prítomnosti propídium-jodidu (kanál FL3 alebo FL4). Životaschopnosť buniek možno vypočítať v analytickom programe cytometra pomocou rovnice uvedenej ďalej. V prípade nízkej životaschopnosti buniek je možné získať až 20 000 buniek vrátane mŕtvych buniek. Údaje možno prípadne získať počas jednej minúty po začatí analýzy.

$$\text{Životaschopnosť buniek} = \frac{\text{Počet živých buniek}}{\text{Celkový počet získaných buniek}} \times 100$$

Potom sa zmeria percentuálny podiel buniek pozitívnych z hľadiska FL1 spomedzi týchto životaschopných buniek nachádzajúcich sa v ohraničenej oblasti R2 (v rámci ohraničenej oblasti R1). Expresia CD86 na povrchu buniek sa analyzuje v bodovom grafe FL1/SSC obsahujúcom ohraničenú oblasť (oblasti) životaschopných buniek (R2).

V prípade jamiek s úplným rastovým médiom/IgG1 sa marker analýzy stanoví blízko hlavnej populácie, aby sa IgG1 v kontrolách s úplným rastovým médiom nachádzali v cieľovej zóne 0,6 až 0,9 %.

Farebná interferencia sa vymedzuje ako posun v bodovom grafe znázorňujúcom IgG1 označené pomocou FITC (hodnota SI geometrického priemeru IgG1 FL1 ≥ 150 %).

Stimulačný index (SI) CD86 v prípade buniek v kontrolách (neošetrené alebo rozmiešané v 0,4 % DMSO) a buniek ošetrovaných chemikáliou sa vypočíta pomocou tejto rovnice:

$$SI = \frac{\% \text{ ošetrovaných buniek } CD86^{+} - \% \text{ ošetrovaných buniek } IgG1^{+}}{\% \text{ kontrolných buniek } CD86^{+} - \% \text{ kontrolných buniek } IgG1^{+}} \times 100$$

% neošetrených kontrolných buniek IgG1⁺: označuje percentuálny podiel buniek IgG1 pozitívnych z hľadiska FL1, ktoré sú vymedzené spomedzi životaschopných neošetrených buniek pomocou markera analýzy (prijateľný rozsah $\geq 0,6$ % a $< 1,5$ %, pozri odsek 22).

% kontrolných/ošetrovaných buniek IgG1⁺/CD86⁺: označuje percentuálny podiel buniek IgG1/CD86 pozitívnych z hľadiska FL1, ktoré sú vymedzené spomedzi životaschopných kontrolných/ošetrovaných buniek bez premiestnenia markera analýzy.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Hodnotenie údajov

20. V teste U-SENS™ sa vypočítajú tieto parametre: hodnota CV70, t. j. koncentrácia, pri ktorej sa prejavuje 70 % prežitie buniek U937 (30 % cytotoxicita), a hodnota EC150, t. j. koncentrácia, pri ktorej testované chemikálie vyvolali stimulačný index (SI) pre CD86 na úrovni 150 %.

Hodnota CV70 sa vypočíta pomocou logaritmickej lineárnej interpolácie na základe tejto rovnice:

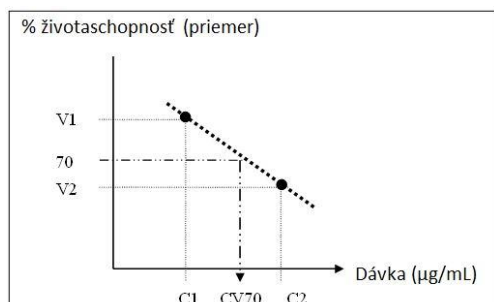
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70)/(V1 - V2) \times (C2 - C1)]$$

Keď:

V1 je minimálna hodnota životaschopnosti buniek nad 70 %,

V2 je maximálna hodnota životaschopnosti buniek pod 70 %,

C1 a C2 sú koncentrácie, pri ktorých sa prejavuje hodnota životaschopnosti buniek V1, resp. V2.



Na odvodenie hodnoty CV70 možno použiť aj iné prístupy, pokiaľ sa preukáže, že to nemá vplyv na výsledky (napr. pomocou testovania látok na preukázanie spôsobilosti).

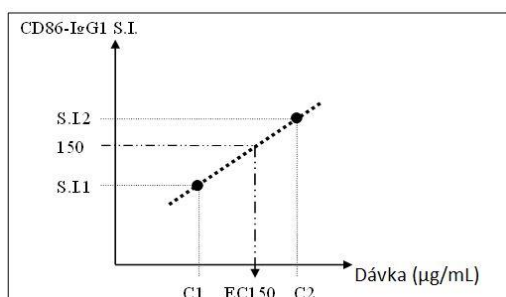
Hodnota EC150 sa vypočíta pomocou logaritmickej lineárnej interpolácie na základe tejto rovnice:

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

Keď:

C1 je najvyššia koncentrácia v µg/ml s hodnotou SI pre CD86 < 150 % (SI 1),

C2 je najnižšia koncentrácia v µg/ml s hodnotou SI pre CD86 ≥ 150 % (SI 2).



Hodnoty EC150 a CV70 sa vypočítajú

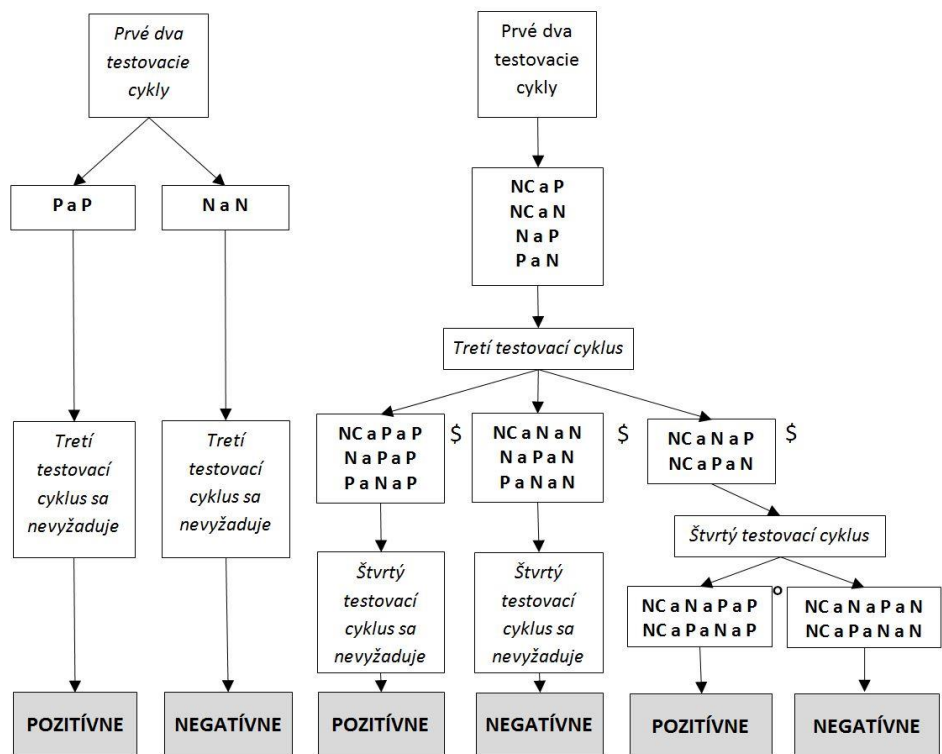
- pre každý testovací cyklus: jednotlivé hodnoty EC150 a CV70 slúžia ako nástroje na skúmanie účinku zvýšenia CD86 v závislosti od koncentrácie (pozri odsek 14),
- na základe priemerných hodnôt životaschopnosti; stanoví sa celková hodnota CV70 (12),
- na základe priemeru SI hodnôt CD86; stanoví sa celková hodnota EC150 pre testovanú chemikáliu, ktorá sa na základe prognózy v teste U-SENS™ považuje za POZITÍVNU (pozri odsek 21) (12).

Prognostický model

21. Na účely merania expresie CD86 sa každá testovaná chemikália testuje najmenej v štyroch koncentráciách a najmenej v dvoch nezávislých testovacích cykloch (uskutočnených v rôznych dňoch), aby sa odvodila jedna prognóza (NEGATÍVNA alebo POZITÍVNA).
- Jednotlivý záver testovacieho cyklu U-SENS™ sa považuje za negatívny (ďalej len „N“), ak je SI pre CD86 nižší ako 150 % pri všetkých necytotoxických koncentráciách (životaschopnosť buniek ≥ 70 %) a ak sa nepozoruje žiadna interferencia (cytotoxicita, rozpustnosť: pozri odsek 18 alebo farba: pozri odsek 19 bez ohľadu na necytotoxické koncentrácie, pri ktorých sa zistí interferencia). Vo všetkých ostatných prípadoch: ak je SI pre CD86 vyšší než alebo sa rovná 150 % a/alebo ak sa pozorujú interferencie, jednotlivý záver testovacieho cyklu U-SENS™ sa považuje za pozitívny (ďalej len „P“).
 - Prognóza v teste U-SENS™ sa považuje za NEGATÍVNU, ak sú najmenej dva nezávislé testovacie cykly negatívne (N) (obrázok 1). Ak sú oba prvé testovacie cykly negatívne (N), prognóza v teste U-SENS™ sa považuje za NEGATÍVNU a tretí testovací cyklus nie je potrebné uskutočniť.
 - Prognóza v teste U-SENS™ sa považuje za POZITÍVNU, ak sú najmenej dva nezávislé testovacie cykly pozitívne (P) (obrázok 1). Ak sú oba prvé testovacie cykly pozitívne (P), prognóza v teste U-SENS™ sa považuje za POZITÍVNU a tretí testovací cyklus nie je potrebné uskutočniť.
 - Keďže sa neuskutočňuje skúška na stanovenie dávky, existuje výnimka v prípade, že v prvom testovacom cykle je SI pre CD86 vyšší než alebo sa rovná 150 % len pri najvyššej necytotoxickkej koncentrácii. Testovací cyklus sa v takom prípade považuje za NEJEDNOZNAČNÝ (NC) a v dodatočných testovacích cykloch je potrebné testovať ďalšie koncentrácie (v rozsahu od najvyššej necytotoxickkej koncentrácie po najnižšiu cytotoxickú koncentráciu – pozri odsek 20). V prípade, že je testovací cyklus identifikovaný ako NC, je potrebné vykonať najmenej dva dodatočné testovacie cykly, ako aj štvrtý testovací cyklus v prípade, že výsledky testovacích cyklov 2 a 3 nie sú zhodné (nezávisle N a/alebo P) (obrázok 1). Nasledujúce testovacie cykly sa budú považovať za pozitívne, aj keď sa len pri jednej necytotoxickkej koncentrácii dosiahne hodnota CD86 rovnaká alebo vyššia ako 150 %, keďže sa nastavenie koncentrácie upravilo podľa konkrétnej testovanej chemikálie. Pri konečnej prognóze sa bude vychádzať z väčšinového výsledku troch alebo štyroch individuálnych testovacích cyklov (t. j. 2 z 3 alebo 2 zo 4) (obrázok 1).

Obrázok 1: Prognostický model použitý v teste U-SENS™ Prognóza v teste U-SENS™ by sa mala

posudzovať v rámci IATA a v súlade s ustanoveniami odsekov 4, 7, 8 a 9 všeobecného úvodu.



N: testovací cyklus bez pozorovania pozitívnej hodnoty CD86 alebo interferencie,

P: testovací cyklus s pozorovanou pozitívnou hodnotou CD86 a/alebo interferenciou,

NC: nejednoznačné. Prvý testovací cyklus s nejednoznačným výsledkom, keď je CD86 pozitívne len pri najvyššej necytotoxickéj koncentrácii,

#: Nejednoznačný (NC) individuálny záver dosiahnutý len pri prvom testovacom cykle automaticky znamená potrebu tretieho testovacieho cyklu, aby sa dosiahla väčšina pozitívnych (P) alebo negatívnych (N) záverov aspoň v 2 z 3 nezávislých testovacích cyklov.

\$: V políčkach sa uvádzajú relevantné kombinácie výsledkov z troch testovacích cyklov na základe výsledkov získaných v prvých dvoch testovacích cykloch uvedených v predchádzajúcom políčku.

°: V políčkach sa uvádzajú relevantné kombinácie výsledkov zo štyroch testovacích cyklov na základe výsledkov získaných v prvých troch testovacích cykloch uvedených v predchádzajúcom políčku.

Kritériá prijateľnosti

22. Pri použití testu U-SENS™ majú byť splnené tieto kritériá prijateľnosti (12).

- Na konci obdobia expozície v trvaní 45 ± 3 hod. dosiahla priemerná životaschopnosť neošetrených buniek U937 testovaných trojmo hodnotu $> 90 \%$ a nepozoroval sa posun v expresii CD86. Bazálna expresia CD86 neošetrených buniek U937 bola v rozsahu $\geq 2 \%$ a $\leq 25 \%$.

- Keď sa ako rozpúšťadlo používa DMSO, platnosť kontroly s nosičom DMSO sa posudzuje vypočítaním SI pre DMSO v porovnaní s neošetrenými bunkami, pričom priemerná životaschopnosť buniek testovaných trojmo musela byť $> 90 \%$. Kontrola s nosičom DMSO je platná, ak stredná hodnota trojmo vypočítaného SI pre CD86 bola nižšia než 250% strednej hodnoty trojmo vypočítaného SI pre CD86 v prípade neošetrených buniek U937.
- Testovacie cykly sa považujú za platné, ak aspoň dve z troch hodnôt IgG1 neošetrených buniek U937 patria do rozsahu $\geq 0,6 \%$ a $< 1,5 \%$.
- Súbežne testovaná negatívna kontrola (kyselina mliečna) sa považuje za platnú, ak aspoň dva z troch replikátov boli negatívne (SI pre CD86 $< 150 \%$) a necytotoxické (životaschopnosť buniek $\geq 70 \%$).
- Pozitívna kontrola (TNBS) sa považuje za platnú, ak aspoň dva z troch replikátov boli pozitívne (SI pre CD86 $\geq 150 \%$) a necytotoxické (životaschopnosť buniek $\geq 70 \%$).

Správa o teste

23. Správa o teste obsahuje tieto informácie:

Testovaná chemikália

Jednozložkové látky

- identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,
- fyzický vzhľad, rozpustnosť v úplnom rastovom médiu, rozpustnosť v DMSO, molekulová hmotnosť a iné relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu,
- čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,
- úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie), ak sa uplatňuje,
- testované koncentrácie,
- podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,
- odôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča pre každú testovanú chemikáliu.

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

- čo najpodrobnejšia charakterizácia, napr. prostredníctvom chemickej identity (pozri vyššie), čistoty, kvantitatívneho výskytu a relevantných fyzikálno-chemických vlastností (pozri vyššie) zložiek v dostupnom rozsahu,
- fyzický vzhľad, rozpustnosť v úplnom rastovom médiu, rozpustnosť v DMSO a iné relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu,
- molekulová hmotnosť alebo relatívna molekulová hmotnosť v prípade zmesí/polymérov známeho zloženia alebo iné informácie potrebné na vykonanie štúdie,
- úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie), ak sa uplatňuje,
- testované koncentrácie,
- podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,
- odôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča pre každú testovanú chemikáliu.

Kontroly

Pozitívna kontrola

- identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,
- fyzický vzhľad, rozpustnosť v DMSO, molekulová hmotnosť a iné relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu a podľa potreby,
- čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,
- úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie), ak sa uplatňuje,
- testované koncentrácie,
- podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,
- v uplatniteľnom prípade odkaz na historické výsledky pre pozitívne kontroly dokazujúce vhodné kritériá prijateľnosti testovacieho cyklu.

Negatívna kontrola a kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom

- identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,
- čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,

- fyzický vzhľad, molekulová hmotnosť a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v prípade, že sa použijú iné kontrolné rozpúšťadlá/nosiče ako tie uvedené v usmernení na vykonávanie testov, a to v dostupnom rozsahu,
- podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,
- odôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča pre každú testovanú chemikáliu.

Podmienky testu

- meno a adresa objednávateľa, testovacieho zariadenia a vedúceho štúdie,
- opis použitého testu,
- použitá bunková línia, podmienky jej skladovania a zdroj (napr. zariadenie, z ktorého bola získaná),
- použitá prietoková cytometria (napr. model) vrátane použitých nastavení prístroja, protilátok a markera cytotoxicity,
- postup použitý na preukázanie spôsobilosti laboratória vykonávať daný test testovaním chemikálií na preukázanie spôsobilosti a postup použitý na preukázanie opakovateľného vykonávania testu v priebehu času, napr. údaje o historických kontrolách a/alebo údaje o historických kontrolách reaktivity.

Kritériá prijateľnosti testu

- hodnoty životaschopnosti buniek a hodnoty SI pre CD86 získané pomocou kontroly s aplikáciou rozpúšťadla/kontroly s nosičom v porovnaní s rozsahmi prijateľnosti,
- hodnoty životaschopnosti buniek a hodnoty SI získané pomocou pozitívnej kontroly v porovnaní s rozsahmi prijateľnosti,
- životaschopnosť buniek pri všetkých testovaných koncentráciách testovanej chemikálie.

Testovací postup

- počet použitých testovacích cyklov,
- použité koncentrácie testovaných chemikálií, ich použitie a expozičný čas (ak sa líšia od odporúčaných),
- dĺžka expozície,
- opis použitých kritérií hodnotenia a rozhodovania,
- opis všetkých zmien v testovacom postupe.

Výsledky

- údaje v tabuľkovej podobe vrátane CV70 (v uplatniteľnom prípade), SI, hodnôt životaschopnosti buniek, hodnôt EC150 (v uplatniteľnom prípade) získaných pri testovanej chemikálii a pri pozitívnej kontrole v každom testovacom cykle, ako aj uvedenie hodnotenia testovanej chemikálie podľa prognostického modelu,
- v uplatniteľnom prípade opis všetkých relevantných pozorovaní.

Rozbor výsledkov

- rozbor výsledkov získaných pomocou testu U-SENSTM,
- posúdenie výsledkov testu v kontexte IATA, ak sú k dispozícii iné relevantné informácie.

Záver

LITERATÚRA

- (1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901 – 916.
- (2) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. K dispozícii na lokalite: 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. K dispozícii na lokalite: [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. K dispozícii na lokalite: <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. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. K dispozícii na lokalite: [<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337 – 351.

- (8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373 – 382.
- (9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehn, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259 – 270.
- (10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683 – 1696.
- (11) OECD. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. K dispozícii na lokalite: [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). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), s. 33. K dispozícii na lokalite: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].
- (13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565 – 577.
- (14) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. K dispozícii na lokalite: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (15) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: United Nations Publications. K dispozícii na lokalite:

http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

- (16) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. K dispozícii na lokalite: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. K dispozícii na lokalite: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

Dodatok 2.1

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: miera zhody výsledkov testu s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o mieru výkonnosti testu a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa zameniteľne s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testu (14).

AOP (dráha nepriaznivého účinku): sled udalostí od chemickej štruktúry cieľovej chemikálie alebo skupiny podobných chemikálií cez molekulárnu iniciačnú udalosť až po výsledok *in vivo*, ktorý je predmetom záujmu (15).

Reakcia v závislosti od koncentrácie CD86: označuje závislosť od koncentrácie (alebo reakciu v závislosti od koncentrácie), keď za pozitívnu koncentráciou ($CD86\ SI \geq 150$) nasleduje koncentrácia s rastúcou hodnotou CD86 SI.

Chemikália: látka alebo zmes.

CV70: odhadovaná koncentrácia, pri ktorej sa pozoruje 70 % životaschopnosť buniek.

Posun: posun je vymedzený tým, že i) korigovaná hodnota $\%CD86^+$ replikátu 3 neošetrenej kontroly je nižšia ako 50 % strednej korigovanej hodnoty $\%CD86^+$ replikátov 1 a 2 neošetrenej kontroly a ii) korigovaná hodnota $\%CD86^+$ replikátu 3 negatívnej kontroly je nižšia ako 50 % strednej korigovanej hodnoty $\%CD86^+$ replikátov 1 a 2 negatívnej kontroly.

EC150: odhadované koncentrácie, pri ktorých sa vykazuje 150 % SI expresie CD86.

Prietoková cytometria: cytometrická technika, pri ktorej bunky rozmiešané v kvapaline prechádzajú jednotlivo cez ohnisko excitovaného svetla, ktoré je rozptýlené podľa vzorov charakteristických pre bunky a ich zložky. Bunky sa často označujú pomocou fluorescenčných markerov, vďaka čomu sa svetlo najskôr absorbuje a následne emituje v zmenených frekvenciách.

Nebezpečnosť: inherentná vlastnosť činidla, prípadne situácia, ktorá môže vyvolať nepriaznivé účinky pri expozícii organizmu, systému alebo (sub)populácie účinkom daného činidla.

IATA (integrovaný prístup k testovaniu a hodnoteniu): štruktúrovaný prístup používaný na identifikáciu (potenciálnej) nebezpečnosti, charakterizáciu nebezpečnosti (z hľadiska potencie) a/alebo hodnotenie bezpečnosti (potenciál/potencia a expozícia) chemikálie alebo skupiny chemikálií, ktorý strategicky integruje a porovnáva všetky relevantné údaje v záujme prijatia regulačného rozhodnutia o potenciálnej nebezpečnosti a/alebo riziku a/alebo potrebe vykonania ďalších cielených, t. j. minimálnych testov.

Zmes: zmes alebo roztok zložený z dvoch alebo viacerých látok.

Jednozložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je hlavná zložka zastúpená v koncentrácii najmenej 80 hm. %.

Viaczložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je viac ako jedna hlavná zložka zastúpená v koncentrácii ≥ 10 hm. % a < 80 hm. %. Viaczložková látka je výsledkom výrobného procesu. Rozdiel medzi zmesou a viaczložkovou látkou spočíva v tom, že zmes sa získava zmiešaním dvoch alebo viacerých látok bez toho, aby došlo k chemickej reakcii. Viaczložková látka je výsledkom chemickej reakcie.

Pozitívna kontrola: replikát obsahujúci všetky zložky testovacieho systému a ošetrovanej látkou, ktorá je známa tým, že vyvoláva pozitívnu reakciu. Aby bolo možné vyhodnotiť variabilitu reakcie na pozitívnu kontrolu v čase, nesmie byť rozsah pozitívnej reakcie nadmerne veľký.

Pre-haptény: chemikálie, ktoré sa stávajú senzibilizátormi prostredníctvom abiotickej transformácie, napr. oxidácie.

Pro-haptény: chemikálie, pri ktorých sa vyžaduje enzymatická aktivácia na to, aby vznikol potenciál kožnej senzibilizácie.

Relevantnosť: opis vzťahu testu k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a toho, či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej sa testom správne meria alebo predpovedá biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) testu (14).

Spoľahlivosť: miera rozsahu, v rámci ktorého sa môže test počas istého časového obdobia reprodukovateľne vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Hodnotí sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti a vnútrolaboratórnej opakovateľnosti (14).

Testovací cyklus: testovací cyklus pozostáva z jednej alebo viacerých testovaných chemikálií testovaných súbežne s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla/kontrolou s nosičom a s pozitívnou kontrolou.

Citlivosť: podiel všetkých pozitívnych/aktívnych chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testu, ktorý poskytuje kategorizačné výsledky. Ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testu (14).

SI: stimulačný index. Relatívne hodnoty geometrického priemeru intenzity fluorescencie v bunkách ošetrovaných chemikáliou v porovnaní s bunkami ošetrovanými rozpúšťadlom.

Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom: neošetrovaná vzorka obsahujúca

všetky zložky testovacieho systému okrem testovanej chemikálie, ale vrátane použitého rozpúšťadla/nosiča. Slúži na stanovenie základnej reakcie vzoriek ošetrovaných testovanou chemikáliou rozpustenou alebo stabilne rozmiešanou v rovnakom rozpúšťadle/nosiči. Keď sa táto vzorka testuje so súbežnou kontrolou s rastovým médiom, preukáže sa aj to, či rozpúšťadlo/nosič a testovací systém na seba navzájom pôsobia.

Špecifickosť: podiel všetkých negatívnych/neaktívnych chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testu, ktorý poskytuje kategorizačné výsledky. Ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testu (14).

Vyfarbovací tlmivý roztok: fosfátový tlmivý fyziologický roztok obsahujúci 5 % fetálneho teľacieho séra.

Látka: chemický prvok a jeho zlúčeniny v prírodnom stave alebo získané akýmkoľvek výrobným postupom vrátane všetkých prísad potrebných na udržanie ich stability a všetkých nečistôt pochádzajúcich z použitého postupu, ktorý však nezahŕňa žiadne rozpúšťadlá, ktoré možno oddeliť bez ovplyvnenia stability látky alebo zmeny jej zloženia.

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tohto testu.

Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií OSN (GHS OSN): systém, ktorým sa navrhuje klasifikácia chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a úrovní fyzikálnej, zdravotnej a environmentálnej nebezpečnosti a ich označovanie zodpovedajúcimi komunikačnými prvkami, ako sú piktogramy, výstražné slová, výstražné upozornenia, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov, s cieľom poskytnúť informácie o nepriaznivých účinkoch daných chemikálií v záujme ochrany osôb (vrátane zamestnávateľov, pracovníkov, prepravcov, spotrebiteľov a subjektov reakcie na núdzové situácie) a životného prostredia (16).

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

Platný test: test, ktorý sa na daný účel považuje za dostatočne relevantný a spoľahlivý a ktorý je založený na vedecky podložených zásadách. Test nie je nikdy platný v absolútnom zmysle, ale len vo vzťahu k vymedzenému účelu (14).

Dodatok 2.2**LÁTKY NA PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI**

Pred rutinným použitím testu opísaného v tomto dodatku k testovacej metóde B.71 by mali laboratóriá preukázať technickú spôsobilosť tým, že správne získajú očakávanú prognózu výsledku skúšky U-SENSTM v prípade 10 chemikálií odporúčaných v tabuľke 1 a získajú hodnoty CV70 a EC150, ktoré patria do príslušného referenčného rozsahu pre najmenej 8 z 10 látok na preukázanie spôsobilosti. Látky na preukázanie spôsobilosti boli vybrané tak, aby reprezentovali rozsah reakcií z hľadiska nebezpečenstva kožnej senzibilizácie. Medzi ďalšie výberové kritériá patrilo to, aby boli látky komerčne dostupné a aby boli dostupné referenčné údaje *in vivo* s vysokou kvalitou, ako aj údaje *in vitro* s vysokou kvalitou vygenerované pomocou testu U-SENSTM. Pre test U-SENSTM sú k dispozícii aj publikované referenčné údaje (1) (8).

Tabuľka 1: Odporúčané látky na preukazovanie technickej spôsobilosti pri teste U-SENSTM

Látky na preukázanie spôsobilosti	Registračné číslo CAS	Skupenstvo	Prognóza <i>in vivo</i> ¹	U-SENS TM Rozpúšťadlo/ nosič	U-SENS TM Referenčný rozsah CV70 v µg/ml ²	U-SENS TM Referenčný rozsah EC150 v µg/ml ²
4-fenyléndiamín	106-50-3	tuhé	senzibilizátor (silný)	úplné rastové médium ³	< 30	pozitívne (≤ 10)
kyselina 2,4,6-trinitrobenzénsulfónová trihydrát	2508-19-2	kvapalné	senzibilizátor (silný)	úplné rastové médium	> 50	pozitívne (≤ 50)
dietylmaleát	141-05-9	kvapalné	senzibilizátor (mierny)	DMSO	10 – 100	pozitívne (≤ 20)
rezorcinol	108-46-3	tuhé	senzibilizátor (mierny)	úplné rastové médium	> 100	pozitívne (≤ 50)
škoricový alkohol	104-54-1	tuhé	senzibilizátor (slabý)	DMSO	> 100	pozitívne (10 – 100)
4-alylanizol	140-67-0	kvapalné	senzibilizátor (slabý)	DMSO	> 100	pozitívne (< 200)
sacharín	81-07-2	tuhé	nespôsobuje senzibilizáciu	DMSO	> 200	negatívne (> 200)
glycerol	56-81-5	kvapalné	nespôsobuje senzibilizáciu	úplné rastové médium	> 200	negatívne (> 200)
kyselina mliečna	50-21-5	kvapalné	nespôsobuje senzibilizáciu	úplné rastové	> 200	negatívne (> 200)

				médium		
kyselina salicylová	69-72-7	tuhé	nespôsobuje senzibilizáciu	DMSO	> 200	negatívne (> 200)

Skratky: Registračné číslo CAS = číslo v registri služby CAS (Chemical Abstracts Service)

¹ Prognóza nebezpečnosti a (potencie) *in vivo* na základe údajov LLNA (1) (8). Potencia *in vivo* je odvodená pomocou kritérií navrhnutých organizáciou ECETOC (17).

² Na základe historických pozorovaných hodnôt (1) (8).

³ Úplné rastové médium: rastové médium RPMI-1640 doplnené o 10 % fetálne teľacie sérum, L-glutamín s koncentráciou 2 mM, 100 jednotiek/ml penicilínu a 100 µg/ml streptomycínu (8).

Dodatok 3

KOŽNÁ SENZIBILIZÁCIA *IN VITRO*: SKÚŠKA IL-8 LUC

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

1. Na rozdiel od skúšok, v rámci ktorých sa analyzuje expresia povrchových bunkových markerov, sa v skúške IL-8 Luc kvantifikujú zmeny exprese IL-8, čo je cytokín súvisiaci s aktiváciou dendritových buniek (DC). V reportérovej bunkovej línii IL-8 odvodenej od THP-1 (THP-G8, stanovená z bunkovej línie THP-1 akútnej ľudskej monocytovej leukémie) sa expresia IL-8 meria po expozícii senzibilizátorom (1). Expresia luciferázy následne slúži ako pomôcka pri rozlišovaní medzi kožnými senzibilizátormi a látkami nespôsobujúcimi senzibilizáciu.
2. Skúška IL-8 Luc sa hodnotila v rámci validačnej štúdie (2) uskutočnenej organizáciou JaCVAM (Japanese Centre for the Validation of Alternatives Methods), **ministerstvom hospodárstva, obchodu a priemyslu (METI)** a organizáciou (**JSAAE Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments**) a následne bola predmetom nezávislého partnerského preskúmania (3) pod záštitou organizácie JaCVAM a ministerstva zdravotníctva, práce a sociálneho zabezpečenia (MHLW) s podporou **medzinárodnej spolupráce v oblasti alternatívnych testovacích metód (ICATM)**. Na základe zváženia všetkých dostupných dôkazov a vstupov regulačných orgánov a zainteresovaných strán sa skúška IL-8 Luc považuje za užitočnú pri rozlišovaní medzi senzibilizátormi a látkami nespôsobujúcimi senzibilizáciu v rámci integrovaných prístupov k testovaniu a hodnoteniu (IATA) na účely klasifikácie a označovania nebezpečnosti. Príklady použitia údajov zo skúšky IL-8 Luc v kombinácii s inými informáciami sú uvedené v literatúre (4) (5) (6).
3. Preukázalo sa, že skúška IL-8 Luc je prenosná do laboratórií, ktoré majú skúsenosti v oblasti bunkových kultúr a meraní luciferázy. Vnútrolaboratórna reprodukovateľnosť bola 87,7 % a reprodukovateľnosť medzi laboratóriami bola 87,5 % (2). Z údajov získaných v rámci validačnej štúdie (2) a iných publikovaných prác (1) (6) vyplýva, že v porovnaní so skúškou LLNA sa pomocou skúšky IL-8 Luc vyhodnotilo 118 zo 143 chemikálií ako pozitívnych alebo negatívnych a 25 chemikálií ako nejednoznačných. Presnosť skúšky IL-8 Luc z hľadiska odlíšenia kožných senzibilizátorov (kategória 1 podľa GHS OSN/CLP) od látok nespôsobujúcich senzibilizáciu („bez kategórie“ podľa GHS OSN/CLP) je 86 % (101/118) s citlivosťou 96 % (92/96) a špecifickosťou 41 % (9/22). Pri vylúčení látok nepatriacich do oblasti použiteľnosti opísanej ďalej (odsek 5) sa pomocou skúšky IL-8 Luc vyhodnotilo 113 zo 136 chemikálií ako pozitívnych alebo negatívnych

a 23 chemikálií ako nejednoznačných. Presnosť skúšky IL-8 Luc je 89 % (101/113) s citlivosťou 96 % (92/96) a špecifickosťou 53 % (9/17). Na základe údajov o ľuďoch, ako ich uvádza Urbisch a kol. (7), sa pomocou skúšky IL-8 Luc vyhodnotilo 76 z 90 chemikálií ako pozitívnych alebo negatívnych a 14 chemikálií ako nejednoznačných. Presnosť skúšky je 80 % (61/76), citlivosť 93 % (54/58) a špecifickosť 39 % (7/18). Pri vylúčení látok nepatriacich do oblasti použiteľnosti sa pomocou skúšky IL-8 Luc vyhodnotilo 71 z 84 chemikálií ako pozitívnych alebo negatívnych a 13 chemikálií ako nejednoznačných. Presnosť je 86 % (61/71) s citlivosťou 93 % (54/58) a špecifickosťou 54 % (7/13). V prípade skúšky IL-8 Luc je výskyt falošne negatívnych prognóz pravdepodobnejší pri chemikáliách s nízkou/miernou potenciou z hľadiska kožnej senzibilizácie (podkategória 1B podľa GHS OSN/CLP) než pri chemikáliách s vysokou potenciou (podkategória 1A podľa GHS OSN/CLP) (6). Celkovo je z týchto informácií zrejmý význam skúšky IL-8 Luc pri identifikácii nebezpečenstva kožnej senzibilizácie. Presnosť, ktorá sa uvádza v prípade skúšky IL-8 Luc ako samostatného testu, slúži len ako usmernenie, keďže tento test by sa mal posudzovať v spojení s inými zdrojmi informácií v kontexte IATA a v súlade s ustanoveniami odsekov 7 a 8 všeobecného úvodu. Okrem toho by sa pri hodnotení testov na zistenie kožnej senzibilizácie bez použitia zvierat malo pamätať na to, že test LLNA a iné testy na zvieratách nemusia v plnej miere odzrkadľovať situáciu u ľudí.

4. Na základe v súčasnosti dostupných údajov sa ukázalo, že skúšku IL-8 Luc je možné použiť v prípade testovaných chemikálií zahŕňajúcich viacero organických funkčných skupín, reakčných mechanizmov, potencií kožnej senzibilizácie (stanovených štúdiami *in vivo*) a fyzikálno-chemických vlastností (2) (6).
5. Hoci sa pri skúške IL-8 Luc používa ako rozpúšťadlo X-VIVO™ 15, správne sa pomocou nej vyhodnotili chemikálie s hodnotou $\text{Log } K_{ow} > 3,5$ a chemikálie s rozpustnosťou vo vode pri koncentrácii približne 100 µg/ml podľa výpočtu v softvéri EPI Suite™ a výkonnosť tejto skúšky pri detekcii senzibilizátorov so slabou rozpustnosťou vo vode je lepšia, než keď sa pri skúške IL-8 Luc použije ako rozpúšťadlo dimetylsulfoxid (DMSO) (2). V prípade negatívnych výsledkov pre testované chemikálie, ktoré nie sú rozpustné pri koncentrácii 20 mg/ml, však môže dochádzať k falošne negatívnym výsledkom v dôsledku ich nerozpustnosti v rozpúšťadle X-VIVO™ 15. Negatívne výsledky pre tieto chemikálie sa preto nemajú brať do úvahy. Vo validačnej štúdii sa zistila vysoká miera falošnej negativity v prípade anhydridov. Okrem toho môžu z dôvodu obmedzenej metabolickej kapacity bunkovej línie (8) a experimentálnych podmienok vykazovať v rámci skúšky negatívne výsledky aj pro-haptény (látky vyžadujúce metabolickú aktiváciu) a pre-haptény (látky aktivované atmosférickou oxidáciou). Napriek tomu, hoci negatívne výsledky získané pri predpokladaných pre-hapténoch/pro-hapténoch je potrebné interpretovať

obozretne, sa pomocou skúšky IL-8 Luc správne vyhodnotilo 11 z 11 pre-hapténov, 6 zo 6 pro-hapténov a 6 z 8 pre-hapténov/pro-hapténov v rámci množiny údajov skúšky IL-8 Luc (2). Na základe súčasného komplexného preskúmania troch testov, pri ktorých sa nevyužívajú zvieratá, (DPRA, KeratinoSens™ a h-CLAT) na detekciu pre-hapténov a pro-hapténov (9) a na základe skutočnosti, že bunky THP-G8 použité v skúške IL-8 Luc predstavujú bunkovú líniu odvodenú od THP-1, ktorá sa používa v teste h-CLAT, skúška IL-8 Luc môže prispieť aj k zvýšeniu citlivosti testov, pri ktorých sa nevyužívajú zvieratá, na detekciu pre-hapténov a pro-hapténov v kombinácii s inými testmi. V prípade doteraz testovaných povrchovo aktívnych látok sa bez ohľadu na ich typ (napr. kationové, aniónové alebo neiónové) zaznamenali (falošne) pozitívne výsledky. A nakoniec, chemikálie, pri ktorých dochádza k interferencii s luciferázou, môžu zneprehľadniť jej aktivitu/meranie, čím dochádza k zdanlivej inhibícii alebo k zvýšenej luminiscencii (10). V iných skúškach s reportérovými génmi luciferázy boli napríklad zaznamenané interferencie fytoestrogénu v koncentráciách nad 1 μM s luminiscenčnými signálmi z dôvodu nadmernej aktivácie reportérového génu luciferázy. Preto je potrebné dôkladne preskúmať expresiu luciferázy dosahovanú pri vysokých koncentráciách fytoestrogénov alebo zlúčenín, pri ktorých existuje podozrenie na vyvolanie aktivácie reportérového génu luciferázy podobne ako pri fytoestrogénoch (11). Na základe toho sú z oblasti použiteľnosti tejto skúšky vylúčené povrchovo aktívne látky, anhydridy a chemikálie, pri ktorých dochádza k interferencii s luciferázou. V prípade, že existujú dôkazy o nepoužiteľnosti skúšky IL-8 Luc na iné špecifické kategórie testovaných chemikálií, by sa tento test nemal pri týchto špecifických kategóriách použiť.

6. Ako bolo opísané vyššie, skúška IL-8 Luc umožňuje rozlišovanie medzi kožnými senzibilizátormi a látkami nespôsobujúcimi senzibilizáciu. Na to, aby bolo možné určiť, či výsledky skúšky IL-8 Luc môžu v kombinácii s ďalšími zdrojmi informácií prispieť k posudzovaniu potencie, však bude potrebná ďalšia práca, pokiaľ možno založená na údajoch týkajúcich sa človeka.
7. Vymedzenie pojmov je uvedené v dodatku 3.1.

PRINCÍP TESTU

8. V skúške IL-8 Luc sa využíva bunková línia THP-1 ľudskej monocytovej leukémie, ktorá pochádza z organizácie ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Virgínia, USA). Pomocou tejto bunkovej línie vytvorila katedra dermatológie na lekárskej fakulte univerzity v Tohoku reportérovú bunkovú líniu IL-8 odvodenú od THP-1 s označením THP-G8, v ktorej sa nachádza gén luciferázy SLO (stabilná luciferáza emitujúca oranžové

svetlo) riadený promótorom IL-8 a gén luciferázy SLR (stabilná luciferáza emitujúca červené svetlo) riadený promótorom glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázy (GAPDH) (1). Je tak možné kvantitatívne meranie indukcie génu luciferázy pomocou detekcie luminiscencie z osvedčených substrátov luciferázy, ktoré vytvárajú svetlo a slúžia ako indikátor pôsobenia IL-8 a GAPDH v bunkách po expozícii chemikáliám spôsobujúcim senzibilizáciu.

9. Dvojfarebný skúšobný systém obsahuje luciferázu emitujúcu oranžové svetlo (SLO; $\lambda_{\max} = 580 \text{ nm}$) (12) pre génovú expresiu promótoru IL-8, ako aj luciferázu emitujúcu červené svetlo (SLR; $\lambda_{\max} = 630 \text{ nm}$) (13) pre génovú expresiu promótoru vnútornej kontroly, GAPDH. Tieto dva druhy luciferázy emitujú svetlo odlišnej farby pri reakcii s d-luciferínom svetlušky svätojánskej a ich luminiscencia sa meria súčasne v rámci jednokrakovej reakcie rozkladom emisie zo skúšobnej zmesi pomocou optického filtra (14) (dodatok 3.2).
10. Bunky THP-G8 sa 16 hodín ošetrujú pomocou testovanej chemikálie. Potom sa zmeria aktivita luciferázy SLO (SLO-LA) odrážajúca pôsobenie promótoru IL-8 a aktivita luciferázy SLR (SLR-LA) odrážajúca pôsobenie promótoru GAPDH. SLO-LA sa označuje ako IL8LA a SLR-LA ako GAPLA, aby boli skratky jednoducho zrozumiteľné. V tabuľke 1 sa uvádza opis výrazov súvisiacich s aktivitou luciferázy v skúške IL-8 Luc. Namerané hodnoty slúžia na výpočet normalizovanej hodnoty IL8LA (nIL8LA), ktorá predstavuje pomer IL8LA ku GAPLA, na výpočet indukcie nIL8LA (Ind-IL8LA), ktorá predstavuje pomer aritmetických priemerov štvornásobne nameraných hodnôt nIL8LA buniek THP-G8 ošetrovaných testovanou chemikáliou a hodnôt nIL8LA neošetrovaných buniek THP-G8, a na výpočet inhibície GAPLA (Inh-GAPLA), ktorá predstavuje pomer aritmetických priemerov štvornásobne nameraných hodnôt GAPLA buniek THP-G8 ošetrovaných testovanou chemikáliou a hodnôt GAPLA neošetrovaných buniek THP-G8 a slúži ako indikátor cytotoxicity.

Tabuľka 1: Opis výrazov súvisiacich s aktivitou luciferázy v skúške IL-8 Luc

Skratky	Vymedzenie pojmu
GAPLA	aktivita luciferázy SLR odrážajúca pôsobenie promótoru GAPDH
IL8LA	aktivita luciferázy SLO odrážajúca pôsobenie promótoru IL-8
nIL8LA	IL8LA/GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA buniek THP-G8 ošetrovaných chemikáliami/nIL8LA neošetrovaných buniek
Inh-GAPLA	GAPLA buniek THP-G8 ošetrovaných chemikáliami/GAPLA neošetrovaných buniek
CV05	Najnižšia koncentrácia chemikálie, pri ktorej sa hodnota Inh-GAPLA

stáva < 0,05.

11. K dispozícii sú normy výkonnosti (PS) (15) na uľahčenie validácie upravených testov *in vitro* luciferázy IL-8, ktoré sú podobné skúške IL-8 Luc, a umožnenie včasnej zmeny usmernenia OECD 442E na vykonávanie testov na účely začlenenia týchto testov. Vzájomné uznávanie údajov (MAD) podľa dohody OECD bude možné garantovať len pri testoch validovaných podľa týchto noriem výkonnosti v prípade, že OECD tieto testy preskúmala a začlenila do usmernenia 442E na vykonávanie testov (16).

PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI

12. Pred rutinným používaním testu opísaného v tomto dodatku k testovacej metóde B.71 by mali laboratóriá preukázať technickú spôsobilosť použitím 10 látok na preukázanie spôsobilosti uvedených v dodatku 3.3 v súlade so správnymi postupmi metód *in vitro* (17). Používatelia testu majú okrem toho viesť historickú databázu údajov vytvorených na základe kontrol reaktivity (pozri odsek 15) a pozitívnych kontrol a kontrol s aplikáciou rozpúšťadla/kontrol s nosičom (pozri odseky 21 – 24) a na základe týchto údajov potvrdiť, že sa v priebehu času zachováva reprodukovateľnosť testu v ich laboratóriu.

POSTUP

13. Ku skúške IL-8 Luc sú k dispozícii štandardné operačné postupy, ktoré sa majú používať pri vykonávaní tohto testu (18). Laboratóriá, ktoré majú v úmysle vykonávať test, môžu získať rekombinantnú bunkovú líniu THP-G8 z laboratória GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonsko, po podpísaní dohody o prenose materiálu (MTA) v súlade s podmienkami šablóny OECD. V nasledujúcich odsekoch sú opísané hlavné zložky a postupy skúšky.

Príprava buniek

14. Na vykonávanie skúšky IL-8 Luc sa používa bunková línia THP-G8 z laboratória GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonsko (pozri odseky 8 a 13). Po prijatí sa bunky namnožia (2 až 4 pasáže) a skladujú sa zmrazené ako homogénna zásoba. Bunky z tejto zásoby možno rozmnožovať až po maximálny počet 12 pasáží alebo maximálne počas 6 týždňov. Rastové médium, ktoré sa používa na rozmnožovanie, je kultivačné médium RPMI-1640, ktoré obsahuje 10 % bovinné fetálne sérum (FBS), roztok antibiotík/antimykotík (100 jednotiek/ml penicilínu G, 100 µg/ml streptomycínu a 0,25 µg/ml amfotericínu B v 0,85 % fyziologickom roztoku) (napr. GIBCO kat. č. 15240-062), 0,15 µg/ml puromycínu (napr. CAS: 58-58-2) a 300 µg/ml G418 (napr. CAS: 108321-42-2).

15. Pred použitím na testovanie sa bunky kvalifikujú uskutočnením kontroly reaktivity. Túto kontrolu je potrebné uskutočniť 1 – 2 týždne alebo 2 – 4 pasáže po rozmrazení pomocou 4-nitrobenzyl bromidu (4-NBB) (CAS: 100-11-8, čistota $\geq 99\%$) ako pozitívnej kontroly a pomocou kyseliny mliečnej (LA) (CAS: 50-21-5, čistota $\geq 85\%$) ako negatívnej kontroly. 4-NBB má vyvolať pozitívnu reakciu na Ind-IL8LA ($\geq 1,4$), zatiaľ čo LA má vyvolať negatívnu reakciu na Ind-IL8LA ($< 1,4$). V rámci skúšky sa použijú len bunky, ktoré vyhovujú pri kontrole reaktivity. Táto kontrola sa má uskutočniť podľa postupov opísaných v odsekoch 22 – 24.
16. Na účely testovania sa bunky THP-G8 nasadia s hustotou 2 až 5×10^5 buniek/ml a 48 až 96 hodín sa kultivujú ako predkultúra v kultivačných bankách. V deň testu sa bunky zozbierané z kultivačných baniek premyjú pomocou RPMI-1640 s obsahom 10 % FBS bez antibiotík a následne sa resuspendujú pomocou RPMI-1640 s obsahom 10 % FBS bez antibiotík s koncentráciou 1×10^6 buniek/ml. Bunky sa ďalej rozdelia na 96-jamkovú čiernu mikrotitračnú platničku s plochým dnom (napr. Costar kat. č. 3603) s objemom 50 μ l (5×10^4 buniek/jamka).

Príprava testovanej chemikálie a kontrolných látok

17. Testovaná chemikália a kontrolné látky sa pripravujú v deň testovania. V prípade skúšky IL-8 Luc sa testované chemikálie rozpustia v komerčne dostupnom rastovom médiu X-VIVO™ 15 bez obsahu séra (Lonza, 04-418Q) tak, aby sa dosiahla konečná koncentrácia 20 mg/ml. X-VIVO™ 15 sa pridá k 20 mg testovanej chemikálie (bez ohľadu na rozpustnosť chemikálie) v skúmavke mikroadstredivky, aby sa dosiahol objem 1 ml, a následne sa intenzívne premiešava a pretrepáva na rotátore s maximálnou rýchlosťou 8 ot./min. počas 30 minút pri teplote okolia približne 20 °C. Ak sú tuhé chemikálie naďalej nerozpustné, skúmavka sa ďalej previbruje ultrazvukom, až kým sa chemikália úplne nerozpustí alebo stabilne nerozmieša. V prípade testovaných chemikálií rozpustných v X-VIVO™ 15 sa roztok rozriedi faktorom 5 pomocou X-VIVO™ 15 a slúži ako zásobný roztok X-VIVO™ 15 s testovanou chemikáliou (4 mg/ml). V prípade testovaných chemikálií nerozpustných v X-VIVO™ 15 sa zmes znova pretrepáva na rotátore najmenej 30 minút a potom sa 5 minút odstredí pri 15 000 ot./min. ($\approx 20\,000\text{ g}$). Výsledný supernatant slúži ako zásobný roztok X-VIVO™ 15 s testovanou chemikáliou. Použitie iných rozpúšťadiel, napríklad DMSO, vody alebo rastového média, je potrebné vedecky odôvodniť. Podrobný postup rozpustenia chemikálií sa uvádza v dodatku 3.5. Roztoky X-VIVO™ 15 opísané v odsekoch 18 – 23 sa zmiešajú v objemovom pomere 1:1

s bunkovými suspenziami pripravenými v 96-jamkovej čiernej mikrotitračnej platničke s plochým dnom (pozri odsek 16).

18. Účelom prvého testovacieho cyklu je stanoviť cytotoxickú koncentráciu a preskúmať potenciál kožnej senzibilizácie chemikálií. Pomocou X-VIVO™ 15 sa vytvoria sériové riedenia zásobných roztokov X-VIVO™ 15 s testovanými chemikáliami s faktorom riedenia 2 (pozri dodatok 3.5) pomocou 96-jamkového skúšobného bloku (napr. Costar kat. č. EW-01729-03). Ďalej sa rozriedený roztok v objeme 50 µl/jamka pridá do 50 µl bunkovej suspenzie v 96-jamkovej čiernej mikrotitračnej platničke s plochým dnom. V prípade testovaných chemikálií rozpustných v X-VIVO™ 15 tak budú konečné koncentrácie testovaných chemikálií v rozsahu od 0,002 do 2 mg/ml (dodatok 3.5). V prípade testovaných chemikálií nerozpustných v X-VIVO™ 15 pri koncentrácii 20 mg/ml sa stanovia len faktory riedenia v rozsahu 2 až 2^{10} , hoci skutočné konečné koncentrácie testovaných chemikálií zostávajú neisté a závisia od nasýtenej koncentrácie testovaných chemikálií v zásobnom roztoku X-VIVO™ 15.
19. V následných testovacích cykloch (t. j. druhý, tretí a štvrtý replikát) sa zásobný roztok X-VIVO™ 15 pripraví s koncentráciou, ktorá je štvornásobne vyššia ako koncentrácia pri životaschopnosti buniek 05 (CV05; najnižšia koncentrácia, pri ktorej je hodnota Inh-GAPLA < 0,05) v prvom pokuse. Ak Inh-GAPLA neklesne pod 0,05 pri najvyššej koncentrácii v prvom testovacom cykle, zásobný roztok X-VIVO™ 15 sa pripraví s najvyššou koncentráciou prvého testovacieho cyklu. Koncentrácia CV05 sa vypočíta ako podiel koncentrácie zásobného roztoku v prvom testovacom cykle a faktora riedenia pre CV05 (X) [faktor riedenia CV05 (X); faktor riedenia, ktorý sa požaduje na zriedenie zásobného roztoku na CV05] (pozri dodatok 3.5). V prípade testovaných látok nerozpustných v X-VIVO pri koncentrácii 20 mg/ml sa hodnota CV05 určí ako koncentrácia zásobného roztoku $\times 1/X$. Pri testovacích cykloch 2 až 4 sa druhý zásobný roztok pripraví ako $4 \times CV50$ (dodatok 3.5).
20. Sériové riedenia druhých zásobných roztokov X-VIVO™ 15 sa vytvoria s faktorom riedenia 1,5 pomocou 96-jamkového skúšobného bloku. Ďalej sa rozriedený roztok v objeme 50 µl/jamka pridá do 50 µl bunkovej suspenzie v jamkách 96-jamkovej čiernej mikrotitračnej platničky s plochým dnom. Každá koncentrácia jednotlivých testovaných chemikálií sa testuje v 4 jamkách. Vzorky sa potom premiešajú na trepačke mikrotitračných platničiek a inkubujú sa 16 hodín pri teplote 37 °C a pri 5 % CO₂. Potom sa zmeria aktivita luciferázy podľa opisu uvedeného ďalej.
21. Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla je zmes X-VIVO™ 15 v objeme 50 µl/jamka a bunkovej suspenzie v RPMI-1640 s obsahom 10 % FBS v objeme 50 µl/jamka.

22. Odporúčaná pozitívna kontrola je 4-NBB. Pripraví sa 20 mg 4-NBB v skúmavke mikroodstredivky s objemom 1,5 ml, do ktorej sa pridá X-VIVO™ 15 do objemu 1 ml. Skúmavka sa intenzívne premiešava a pretrepáva na rotátore maximálnou rýchlosťou 8 ot./min. najmenej 30 minút. Po centrifugácii pri 20 000 g počas 5 minút sa supernatant zriedi faktorom 4 s X-VIVO™ 15 a 500 µl zriedeného supernatantu sa preniesie do jamky na 96-jamkovom skúšobnom bloku. Zriedený supernatant sa ďalej riedi s X-VIVO™ 15 faktormi 2 a 4 a 50 µl tohto roztoku sa pridá do 50 µl bunkovej suspenzie THP-G8 v jamkách 96-jamkovej čiernej mikrotitračnej platničky s plochým dnom (dodatok 3.6). Každá koncentrácia pozitívnej kontroly sa testuje v 4 jamkách. Platnička sa premieša na trepačke mikrotitračných platničiek a inkubuje sa 16 hodín v inkubátore s atmosférou s obsahom CO₂ (37 °C, 5 % CO₂). Potom sa zmeria aktivita luciferázy podľa opisu v odseku 29.
23. Odporúčaná negatívna kontrola je LA. Pripraví sa 20 mg LA v skúmavke mikroodstredivky s objemom 1,5 ml, do ktorej sa pridá X-VIVO™ 15 do objemu 1 ml (20 mg/ml). 20 mg/ml roztoku LA sa zriedi faktorom 5 s X-VIVO™ 15 (4 mg/ml); 500 µl tohto roztoku LA s koncentráciou 4 mg/ml sa preniesie do jamky na 96-jamkovom skúšobnom bloku. Tento roztok sa zriedi faktorom 2 s X-VIVO™ 15 a potom sa znova zriedi faktorom 2, aby vznikli roztoky s koncentráciou 2 mg/ml a 1 mg/ml. 50 µl týchto 3 roztokov a kontroly s nosičom (X-VIVO™ 15) sa pridá do 50 µl bunkovej suspenzie THP-G8 v jamkách 96-jamkovej čiernej mikrotitračnej platničky s plochým dnom. Každá koncentrácia negatívnej kontroly sa testuje v 4 jamkách. Platnička sa premieša na trepačke mikrotitračných platničiek a inkubuje sa 16 hodín v inkubátore s atmosférou s obsahom CO₂ (37 °C, 5 % CO₂). Potom sa zmeria aktivita luciferázy podľa opisu v odseku 29.
24. Použiť možno iné vhodné pozitívne alebo negatívne kontroly, ak sú k dispozícii historické údaje na odvodenie kritérií prijateľnosti porovnateľných testovacích cyklov.
25. Treba dbať na to, aby sa zabránilo vyparovaniu prchavých testovaných chemikálií a krížovej kontaminácii testovanými chemikáliami medzi jamkami, napr. hermetickým uzatvorením mikrotitračnej platničky pred inkubáciou s testovanými chemikáliami.
26. V prípade testovaných chemikálií a kontroly s aplikáciou rozpúšťadla sa vyžadujú 2 až 4 testovacie cykly na odvodenie pozitívnej alebo negatívnej prognózy (pozri tabuľku 2). Každý testovací cyklus sa vykoná v iný deň s čerstvým zásobným roztokom X-VIVO™ 15 s testovanými chemikáliami a s nezávisle odobratými bunkami. Bunky môžu pochádzať z rovnakej pasáže.

Merania aktivity luciferázy

27. Luminiscencia sa meria pomocou luminometra pre 96-jamkovú mikrotitračnú platničku, ktorý je vybavený optickými filtermi, napr. radu Phelios (ATTO, Tokio, Japonsko), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Nemecko) a ARVO (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA). Luminometer je potrebné pre každý test kalibrovať, aby sa zabezpečila reprodukovateľnosť (19). Na účely tejto kalibrácie sú k dispozícii rekombinantné luciferázy emitujúce oranžové a červené svetlo.
28. Do jednotlivých jamiek na mikrotitračnej platničke, ktorá obsahuje bunkovú suspenziu ošetrovanú alebo neošetrovanú chemikáliou, sa preniesie 100 μ l zahriateho reagentu Tripluc® na skúšku s luciferázou (Tripluc). Mikrotitračná platnička sa 10 minút pretrepáva pri teplote okolia približne 20 °C. Mikrotitračná platnička sa umiestni do luminometra s cieľom zmerať aktivitu luciferázy. Bioluminiscencia sa meria počas 3 sekúnd bez prítomnosti (F0) a počas 3 sekúnd v prítomnosti (F1) optického filtra. Použitie alternatívnych nastavení je potrebné odôvodniť, napr. v závislosti od použitého modelu luminometra.
29. Parametre jednotlivých koncentrácií sa vypočítajú z nameraných hodnôt, napr. IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, stredná hodnota $\pm$ SD IL8LA, stredná hodnota $\pm$ SD GAPLA, stredná hodnota $\pm$ SD nIL8LA, stredná hodnota $\pm$ SD Ind-IL8LA, stredná hodnota $\pm$ SD Inh-GAPLA a 95 % interval spoľahlivosti Ind-IL8LA. Vymedzenia parametrov použitých v tomto odseku sa uvádzajú v dodatku I, resp. IV.
30. Pred meraním sa rozlišovanie farieb vo viacfarebných reportérových skúškach vo všeobecnosti dosahuje pomocou detektorov (luminometra a snímača mikrotitračných platničiek), ktoré sú vybavené optickými filtermi, napríklad filtermi s ostrým ohraničením (prepúšťajúcimi dlhé alebo krátke vlnové dĺžky) alebo filtermi s pásmovým priepustom. Pred testovaním je potrebné kalibrovať koeficienty prenosu filtrov pre jednotlivé bioluminiscenčné signálne farby podľa dodatku 3.2.

ÚDAJE A PREZENTOVANIE VÝSLEDKOV

Hodnotenie údajov

31. Z hľadiska kritérií na rozhodnutie o klasifikácii látky ako pozitívnej alebo negatívnej sa vyžaduje, aby v každom testovacom cykle platilo, že:
- prognóza skúšky IL-8 Luc sa považuje za pozitívnu, ak má testovaná chemikália hodnotu Ind-IL8LA $\geq 1,4$ a dolný limit 95 % intervalu spoľahlivosti Ind-IL8LA $\geq 1,0$,
 - prognóza skúšky IL-8 Luc sa považuje za negatívnu, ak má testovaná chemikália hodnotu Ind-IL8LA $< 1,4$ a/alebo dolný limit 95 % intervalu spoľahlivosti Ind-IL8LA $< 1,0$.

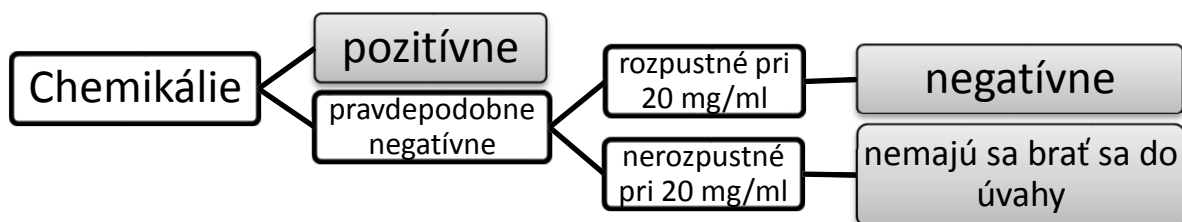
Prognostický model

32. Testované chemikálie, pri ktorých sa dosiahnu dva pozitívne výsledky spomedzi 1., 2., 3. alebo 4. testovacieho cyklu, sa považujú za pozitívne, zatiaľ čo chemikálie, pri ktorých sa dosiahnu tri negatívne výsledky spomedzi 1., 2., 3. alebo 4. testovacieho cyklu sa považujú za pravdepodobne negatívne (tabuľka 2). Spomedzi pravdepodobne negatívnych chemikálií sa chemikálie rozpustené v X-VOVO™ 15 pri koncentrácii 20 mg/ml považujú za negatívne, zatiaľ čo chemikálie nerozpustné v X-VOVO™ 15 pri koncentrácii 20 mg/ml sa nemajú brať do úvahy (obrázok 1).

Tabuľka 2: Kritériá na identifikovanie pozitívnych a pravdepodobne negatívnych látok

1. testovací cyklus	2. testovací cyklus	3. testovací cyklus	4. testovací cyklus	Konečná prognóza
pozitivně	pozitivně	–	–	pozitivně
	negativně	pozitivně	–	pozitivně
		negativně	pozitivně	pozitivně
		negativně	pravděpodobně negativně	
negativně	pozitivně	pozitivně	–	pozitivně
		negativně	pozitivně	pozitivně
		negativně	pravděpodobně negativně	
	negativně	pozitivně	pozitivně	pozitivně
		negativně	pravděpodobně negativně	
		negativně	–	pravděpodobně negativně

Obrázok 1: Prognostický model pre konečné rozhodnutie



Kritériá prijateľnosti

33. Pri použití skúšky IL-8 Luc majú byť splnené tieto kritériá prijateľnosti:

- Hodnota Ind-IL8LA má byť vyššia ako 5,0 najmenej pri jednej koncentrácii pozitívnej kontroly, 4-NBB, v každom testovacom cykle.
- Hodnota Ind-IL8LA má byť nižšia ako 1,4 pri každej koncentrácii negatívnej kontroly, kyseliny mliečnej, v každom testovacom cykle.
- Zamietnu sa údaje z mikrotitračných platničiek, pri ktorých hodnota GAPLA kontrolných jamiek s bunkami a reagentom Tripluc, ale bez chemikálií predstavuje menej ako päťnásobok hodnoty jamky obsahujúcej len testovacie rastové médium (RPMI-1640 s obsahom 10 % FBS v objeme 50 µl/jamka a X-VIVO™ 15 v objeme 50 µl/jamka).
- Zamietnu sa údaje z mikrotitračných platničiek, pri ktorých je hodnota Inh-GAPLA všetkých koncentrácií testovaných alebo kontrolných chemikálií nižšia ako 0,05. V takom prípade je potrebné zopakovať prvý test tak, aby najvyššia konečná koncentrácia opakovaného testu predstavovala najnižšiu konečnú koncentráciu predchádzajúceho testu.

Správa o teste

34. Správa o teste obsahuje tieto informácie:

Testované chemikálie

Jednozložkové látky:

- identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,
- fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode, molekulová hmotnosť a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu,
- čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,
- úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie), ak sa uplatňuje,
- rozpustnosť v X-VIVO™ 15. V prípade chemikálií nerozpustných v X-VIVO™ 15 sa uvádza, či sa po centrifugácii pozoruje zrážanie alebo flotácia,
- testované koncentrácie,
- podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,
- odôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča pre každú testovanú chemikáliu, ak sa nepoužilo X-VIVO™ 15.

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

- čo najpodrobnejšia charakterizácia, napr. prostredníctvom chemickej identity (pozri vyššie), čistoty, kvantitatívneho výskytu a relevantných fyzikálno-chemických vlastností (pozri vyššie) zložiek v dostupnom rozsahu,
- fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu,
- molekulová hmotnosť alebo relatívna molekulová hmotnosť v prípade zmesí/polymérov známeho zloženia alebo iné informácie potrebné na vykonanie štúdie,
- úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie), ak sa uplatňuje,
- rozpustnosť v X-VIVO™ 15. V prípade chemikálií nerozpustných v X-VIVO™ 15 sa uvádza, či sa po centrifugácii pozoruje zrážanie alebo flotácia,
- testované koncentrácie,
- podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,
- odôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča pre každú testovanú chemikáliu, ak sa nepoužilo X-VIVO™ 15.

Kontroly

Pozitívna kontrola:

- identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, čísla CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec a/alebo iné identifikátory,
- fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode, molekulová hmotnosť a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v dostupnom rozsahu a podľa potreby,
- čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,
- úprava pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie), ak sa uplatňuje,
- testované koncentrácie,
- podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,
- v uplatniteľnom prípade odkaz na historické výsledky pre pozitívne kontroly dokazujúce vhodné kritériá prijateľnosti.

Negatívna kontrola:

- identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, čísla CAS a/alebo iné identifikátory,
- čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď.,
- fyzický vzhľad, molekulová hmotnosť a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti v prípade, že sa použijú iné negatívne kontroly ako tie uvedené v usmernení na vykonávanie testov, a to v dostupnom rozsahu,
- podmienky skladovania a stabilita v dostupnom rozsahu,
- odôvodnenie výberu rozpúšťadla pre každú testovanú chemikáliu.

Podmienky testu

- meno a adresa objednávateľa, testovacieho zariadenia a vedúceho štúdie,
- opis použitého testu,
- použitá bunková línia, podmienky jej skladovania a zdroj (napr. zariadenie, z ktorého bola získaná),
- číslo šarže a pôvod FBS, názov dodávateľa, číslo šarže 96-jamkovej čiernej mikrotitračnej platničky s plochým dnom a číslo šarže reagentu Tripluc,
- počet pasáží a hustota buniek použitá pri testovaní,
- metóda stanovenia počtu buniek používaná na naočkovanie pred testovaním a opatrenia, ktorými sa zaručí rovnomerné rozdelenie buniek,

- použitý luminometer (napr. model) vrátane jeho nastavenia, použitý substrát luciferázy a preukázanie adekvátnych meraní luminiscencie založených na kontrolnom teste opísanom v dodatku 3.2,
- postup použitý na preukázanie spôsobilosti laboratória vykonávať daný test (napr. testovaním chemikálií na preukázanie spôsobilosti) alebo na preukázanie opakovateľného vykonávania testu v priebehu času.

Testovací postup

- počet replikátov a uskutočnených testovacích cyklov,
- koncentrácie testovaných chemikálií, postup ich použitia a expozičný čas (ak sa líšia od odporúčaných),
- opis použitých kritérií hodnotenia a rozhodovania,
- opis použitých kritérií prijateľnosti štúdie,
- opis všetkých zmien v testovacom postupe.

Výsledky

- merania hodnôt IL8LA a GAPLA,
- výpočty hodnôt nIL8LA, Ind-IL8LA a Inh-GAPLA,
- 95 % interval spoľahlivosti hodnoty Ind-IL8LA,
- graf zobrazujúci krivky závislosti odozvy od dávky z hľadiska indukcie aktivity luciferázy a životaschopnosti,
- v uplatniteľnom prípade opis všetkých relevantných pozorovaní.

Rozbor výsledkov

- rozbor dosiahnutých výsledkov pri skúške IL-8 Luc,
- posúdenie výsledkov skúšky v kontexte IATA, ak sú k dispozícii iné relevantné informácie.

Záver

LITERATÚRA

- (1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci* 124:359 – 69.
- (2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. K dispozícii na adrese: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (3) OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. K dispozícii na adrese: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (4) OECD (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. K dispozícii na adrese: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol* 69:371 – 9.
- (6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 29:1816 – 30.
- (7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol* 71:337 – 51.

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

- (17) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. K dispozícii na adrese: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf.
- (18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, K dispozícii na adrese: http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.
- (19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. *Photochem Photobiol* 86:1046 – 9.
- (20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OECD, Paris, France.
- (21) United Nations (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. K dispozícii na adrese: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

Dodatok 3.1

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: miera zhody výsledkov testu s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o mieru výkonnosti testu a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa zameniteľne s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testu (16).

AOP (dráha nepriaznivého účinku): sled udalostí od chemickej štruktúry cieľovej chemikálie alebo skupiny podobných chemikálií cez molekulárnu iniciačnú udalosť až po výsledok *in vivo*, ktorý je predmetom záujmu (20).

Chemikália: látka alebo zmes.

CV05: životaschopnosť buniek 05, t. j. minimálna koncentrácia, pri ktorej majú chemikálie hodnotu Inh-GAPLA nižšiu ako 0,05.

FInSLO-LA: skratka používaná na označenie hodnoty Ind-IL8LA v správe o validácii a predchádzajúcich publikáciách týkajúcich sa skúšky IL-8 Luc. Pozri vymedzenie pojmu Ind-IL8LA.

GAPLA: aktivita luciferázy v prípade stabilnej luciferázy emitujúcej červené svetlo (SLR) ($\lambda_{\max} = 630 \text{ nm}$), ktorú reguluje promótor GAPDH a ktorá preukazuje životaschopnosť buniek a počet životaschopných buniek.

Nebezpečnosť: inherentná vlastnosť činidla, prípadne situácia, ktorá môže vyvolať nepriaznivé účinky pri expozícii organizmu, systému alebo (sub)populácie účinkom daného činidla.

IATA (integrovaný prístup k testovaniu a hodnoteniu): štruktúrovaný prístup používaný na identifikáciu (potenciálnej) nebezpečnosti, charakterizáciu nebezpečnosti (z hľadiska potencie) a/alebo hodnotenie bezpečnosti (potenciál/potencia a expozícia) chemikálie alebo skupiny chemikálií, ktorý strategicky integruje a porovnáva všetky relevantné údaje v záujme prijatia regulačného rozhodnutia o potenciálnej nebezpečnosti a/alebo riziku a/alebo potrebe vykonania ďalších cielených, t. j. minimálnych testov.

II-SLR-LA: skratka používaná na označenie hodnoty Inh-GAPLA v správe o validácii a predchádzajúcich publikáciách týkajúcich sa skúšky IL-8 Luc. Pozri vymedzenie pojmu Inh-GAPLA.

IL-8 (interleukín-8): cytokín odvodený od endotelových buniek, fibroblastov, keratinocytov, makrofágov a monocytov, ktorý spôsobuje chemotaxiu neutrofilov a T-lymfocytov.

IL8LA: aktivita luciferázy v prípade stabilnej luciferázy emitujúcej oranžové svetlo (SLO) ($\lambda_{\max} = 580 \text{ nm}$), ktorú reguluje promótor IL-8.

Ind-IL8LA: násobná indukcia IL8LA. Získava sa ako podiel hodnoty nIL8LA buniek THP-G8 ošetrovaných chemikáliami a hodnoty buniek THP-G8 nevystavených stimulácii a vyjadruje indukciu pôsobenia promótoru IL-8 spôsobenú chemikáliami.

Inh-GAPLA: inhibícia hodnoty GAPLA. Získava sa ako podiel hodnoty GAPLA buniek THP-G8 ošetrovaných chemikáliami a hodnoty GAPLA neošetrovaných buniek THP-G8 a vyjadruje cytotoxicitu chemikálií.

Minimálna hranica indukcie (MIT): najnižšia koncentrácia, pri ktorej chemikália spĺňa kritériá klasifikácie ako pozitívnej látky.

Zmes: zmes alebo roztok zložený z dvoch alebo viacerých látok.

Jednozložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je hlavná zložka zastúpená v koncentrácii najmenej 80 hm. %.

Viaczložková látka: látka definovaná svojím kvantitatívnym zložením, v ktorej je viac ako jedna z hlavných zložiek zastúpená v koncentrácii $\geq 10 \text{ hm. \%}$ a $< 80 \text{ hm. \%}$. Viaczložková látka je výsledkom výrobného procesu. Rozdiel medzi zmesou a viaczložkovou látkou spočíva v tom, že zmes sa získava zmiešaním dvoch alebo viacerých látok bez toho, aby došlo k chemickej reakcii. Viaczložková látka je výsledkom chemickej reakcie.

nIL8LA: aktivita luciferázy SLO odrážajúca pôsobenie promótoru IL-8 (IL8LA) normalizovaná na základe aktivity luciferázy SLR odrážajúcej pôsobenie promótoru GAPDH (GAPLA). Vyjadruje pôsobenie promótoru IL-8 po zohľadnení životaschopnosti buniek alebo počtu buniek.

nSLO-LA: skratka používaná na označenie hodnoty nIL8LA v správe o validácii a predchádzajúcich publikáciách týkajúcich sa skúšky IL-8 Luc. Pozri vymedzenie pojmu nIL8LA.

Pozitívna kontrola: replikát obsahujúci všetky zložky testovacieho systému a ošetrovaný látkou, ktorá je známa tým, že vyvoláva pozitívnu reakciu. Aby bolo možné vyhodnotiť variabilitu reakcie na pozitívnu kontrolu v čase, nesmie byť rozsah pozitívnej reakcie nadmerne veľký.

Pre-haptény: chemikálie, ktoré sa stávajú senzibilizátormi prostredníctvom abiotickej transformácie.

Pro-haptény: chemikálie, pri ktorých sa vyžaduje enzymatická aktivácia na to, aby vznikol potenciál kožnej senzibilizácie.

Relevantnosť: opis vzťahu testu k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a toho, či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej sa testom správne meria alebo predpovedá biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) testu (16).

Spôľahlivosť: miera rozsahu, v rámci ktorého sa môže test počas istého časového obdobia reprodukovateľne vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Hodnotí sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti a vnútrolaboratórnej opakovateľnosti (16).

Testovací cyklus: testovací cyklus pozostáva z jednej alebo viacerých testovaných chemikálií testovaných súbežne s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla/kontrolou s nosičom a s pozitívnou kontrolou.

Citlivosť: podiel všetkých pozitívnych/aktívnych chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testu, ktorý poskytuje kategorizačné výsledky. Ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testu (16).

SLO-LA: skratka používaná na označenie hodnoty IL8LA v správe o validácii a predchádzajúcich publikáciách týkajúcich sa skúšky IL-8 Luc. Pozri vymedzenie pojmu IL8LA.

SLR-LA: skratka používaná na označenie hodnoty GAPLA v správe o validácii a predchádzajúcich publikáciách týkajúcich sa skúšky IL-8 Luc. Pozri vymedzenie pojmu GAPLA.

Kontrola s aplikáciou rozpúšťadla/kontrola s nosičom: neošetrená vzorka obsahujúca všetky zložky testovacieho systému okrem testovanej chemikálie, ale vrátane použitého rozpúšťadla/nosiča. Slúži na stanovenie základnej reakcie vzoriek ošetrovaných testovanou chemikáliou rozpustenou alebo stabilne rozmiešanou v rovnakom rozpúšťadle/nosiči. Keď sa táto vzorka testuje so súbežnou kontrolou s rastovým médiom, preukáže sa aj to, či rozpúšťadlo/nosič a testovací systém na seba navzájom pôsobia.

Špecifickosť: podiel všetkých negatívnych/neaktívnych chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testu, ktorý poskytuje kategorizačné výsledky. Ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testu (16).

Látka: chemický prvok a jeho zlúčeniny v prírodnom stave alebo získané akýmkoľvek výrobným postupom vrátane všetkých prísad potrebných na udržanie ich stability a všetkých nečistôt pochádzajúcich z použitého postupu, ktorý však nezahŕňa žiadne rozpúšťadlá, ktoré možno oddeliť bez ovplyvnenia stability látky alebo zmeny jej zloženia.

Povrchovo aktívna látka: takisto nazývaná surfaktant, je látka, ako napríklad detergent, ktorá dokáže znížiť povrchové napätie kvapaliny a tak jej umožniť penenie alebo prenikanie

do tuhých látok. Nazýva sa aj zvlhčujúce činidlo (TG437).

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto metódy.

THP-G8: reportérová bunková línia IL-8, ktorá sa používa v skúške IL-8 Luc. Ľudská bunková línia THP-1 podobná makrofágom bola transfektovaná pomocou génu luciferázy SLO riadeného promótorom IL-8 a génu luciferázy SLR riadeného promótorom GAPDH.

Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií OSN (GHS OSN): systém, ktorým sa navrhuje klasifikácia chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a úrovní fyzikálnej, zdravotnej a environmentálnej nebezpečnosti a ich označovanie zodpovedajúcimi komunikačnými prvkami, ako sú piktogramy, výstražné slová, výstražné upozornenia, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov, s cieľom poskytnúť informácie o nepriaznivých účinkoch daných chemikálií v záujme ochrany osôb (vrátane zamestnávateľov, pracovníkov, prepravcov, spotrebiteľov a subjektov reakcie na núdzové situácie) a životného prostredia (21).

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

Platná testovacia metóda: test, ktorý sa na daný účel považuje za dostatočne relevantný a spoľahlivý a ktorý je založený na vedecky podložených zásadách. Test nie je nikdy platný v absolútnom zmysle, ale len vo vzťahu k vymedzenému účelu.

Dodatok 3.2**PRINCÍP MERANIA AKTIVITY LUCIFERÁZY A STANOVENIE KOEFICIENTOV PRENOSU OPTICKÉHO FILTRA PRE SLO A SLR**

Systém viacnásobnej reportérovej skúšky – Tripluc – možno použiť s luminometrom pre mikrotitračnú platničku so systémom detekcie viacerých farieb, ktorý umožňuje použitie optického filtra [napr. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)]. Optický filter použitý pri meraní je filter prepúšťajúci dlhé alebo krátke vlnové dĺžky v rozsahu 600 – 620 nm alebo filter s pásmovým priepustom v rozsahu 600 – 700 nm.

Meranie luciferáz s dvomi farbami pomocou optického filtra

V tomto príklade sa používa model Phelios AB-2350 (ATTO). Tento luminometer je vybavený 600 nm filtrom prepúšťajúcim dlhé vlnové dĺžky (LP) (R60 HOYA Co., 600 nm LP, filter 1) na rozklad luminiscencie SLO ($\lambda_{\max} = 580$ nm) a SLR ($\lambda_{\max} = 630$ nm).

S cieľom stanoviť koeficienty prenosu pre 600 nm filter LP najskôr pomocou čistených enzýmov luciferázy SLO a SLR zmerajte i) intenzitu bioluminiscencie SLO a SLR bez filtra (F0); ii) intenzitu bioluminiscencie SLO a SLR pri prechode cez 600 nm filter LP (filter 1) a iii) vypočítajte koeficienty prenosu 600 nm filtra LP pre SLO a SLR uvedené ďalej.

Koeficienty prenosu		Skratka	Definícia
SLO	koeficienty prenosu filter 1	$\square O_{R60}$	koeficient prenosu filtra pre SLO
SLR	koeficienty prenosu filter 1	$\square R_{R60}$	koeficient prenosu filtra pre SLR

Ďalej je opísaná i) intenzita svetla bez filtra (úplný optický prenos) F0 a ii) intenzita svetla pri prechode cez 600 nm filter LP (filter 1) F1, pričom intenzita SLO v testovacej vzorke je vymedzená ako O a intenzita SLR je vymedzená ako R.

$$F0 = O + R$$

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

Tieto vzorce možno preformulovať takto:

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

Pomocou vypočítaných faktorov priepustnosti (κO_{R60} a κR_{R60}) a nameraných hodnôt F0 a F1 možno vypočítať hodnoty O a R takto:

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

Materiály a metódy na určenie faktora priepustnosti

1. Reagenty

Jednotlivé čistené enzýmy luciferázy:

lyofilizovaný čistený enzým SLO,

lyofilizovaný čistený enzým SLR,

(ktoré sa na účely validácie získali z laboratória GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonsko s využitím bunkovej línie THP-G8).

Skúšobný reagent:

reagent Tripluc® na skúšku s luciferázou (napríklad od spoločnosti TOYOBO kat. č. MRA-301).

Rastové médium: pre skúšku s luciferázou (30 ml, skladované pri teplote 2 – 8 °C).

Reagent	Konc.	Konečná koncentrácia v rastovom médiu	Požadované množstvo
RPMI-1640	–	–	27 ml
FBS	–	10 %	3 ml

2. Príprava enzymatického roztoku

Rozpustíte lyofilizovaný čistený enzým luciferázy v skúmavke pridaním 200 µl Tris/HCl alebo Hepes/HCl s koncentráciou 10 ~ 100 mM (pH 7,5 ~ 8,0) doplneného glycerolom s koncentráciou 10 % (hm./obj.), rozdeľte enzymatický roztok na 10 µl alikvotné časti v jednorazových skúmavkách s objemom 1,5 ml a uskladnite ich

v mrazničke pri teplote -80°C . Zmrazený enzymatický roztok možno používať až 6 mesiacov. Pri použití do každej skúmavky obsahujúcej enzymatické roztoky (zriedený enzymatický roztok) pridajte 1 ml rastového média pre skúšku s luciferázou (RPMI-1640 s 10 % FBS) a uchovávajte ich na ľade, aby sa predišlo deaktivácii.

3. Meranie bioluminiscencie

Reagent Tripluc® na skúšku s luciferázou rozmrazte a uchovávajte pri izbovej teplote vo vodnom kúpeli alebo pri teplote okolia. Luminometer zapnite 30 minút pred začiatkom merania, aby došlo k stabilizácii fotonásobiča. Preneste 100 μl zriedeného enzymatického roztoku do čiernej 96-jamkovej mikrotitračnej platničky (s plochým dnom) (referenčnú vzorku SLO do jamiek B1, B2, B3, referenčnú vzorku SLR do jamiek D1, D2, D3). Potom pomocou pipety preneste 100 μl zahriateho reagentu Tripluc do každej jamky na mikrotitračnej platničke, ktorá obsahuje zriedený enzymatický roztok. Pomocou trepačky mikrotitračných platničiek pretrepávajte mikrotitračnú platničku 10 minút pri izbovej teplote (približne 25°C). Ak sa v roztokoch v jamkách objavia bubliny, odstráňte ich. Umiestnite mikrotitračnú platničku do luminometra a odmerajte aktivitu luciferázy. Bioluminiscencia sa meria počas 3 sekúnd bez prítomnosti (F0) a počas 3 sekúnd v prítomnosti (F1) optického filtra.

Koeficient prenosu optického filtra sa vypočítal takto:

Koeficient prenosu [SLO (κ_{OR60})] = $(B1 \text{ s F1} + B2 \text{ s F1} + B3 \text{ s F1}) / (B1 \text{ s F0} + B2 \text{ s F0} + B3 \text{ s F0})$

Koeficient prenosu [SLR (κ_{R60})] = $(D1 \text{ s F1} + D2 \text{ s F1} + D3 \text{ s F1}) / (D1 \text{ s F0} + D2 \text{ s F0} + D3 \text{ s F0})$

Vypočítané faktory prenosu sa používajú pre všetky merania uskutočnené pomocou toho istého luminometra.

Kontrola kvality zariadenia

Použijú sa postupy opísané v protokole skúšky IL-8 Luc (18).

Dodatok 3.3**LÁTKY NA PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI**

Pred rutinným použitím testu opísaného v tomto dodatku k testovacej metóde B.71 by mali laboratória preukázať technickú spôsobilosť tým, že získajú očakávanú prognózu výsledku skúšky IL-8 Luc v prípade 10 chemikálií odporúčaných v tabuľke 1 a získajú hodnoty, ktoré patria do príslušného referenčného rozsahu pre najmenej 8 z 10 látok na preukázanie spôsobilosti (vybraných tak, aby reprezentovali rozsah reakcií z hľadiska nebezpečenstva kožnej senzibilizácie). Medzi ďalšie výberové kritériá patrilo to, aby boli látky komerčne dostupné a aby boli dostupné referenčné údaje *in vivo* s vysokou kvalitou, ako aj údaje *in vitro* s vysokou kvalitou vygenerované pomocou skúšky IL-8 Luc. Pre skúšku IL-8 Luc sú k dispozícii aj publikované referenčné údaje (6) (1).

Tabuľka 1: Odporúčané látky na preukazovanie technickej spôsobilosti pri skúške IL-8 Luc

Látky preukázanie spôsobilosti	na	Číslo CAS	Skupenstvo	Rozpustnosť v X-VIVO 15 pri 20 mg/ml	Prognóza <i>in vivo</i> ¹	Prognóza skúšky IL-8 Luc ²	Referenčný rozsah (µg/ml) ³	
							CV05 ⁴	IL-8 Luc MIT ⁵
2,4-dinitrochlórbenzén		97-00-7	tuhé	nerozpustné	senzibilizátor (extrémny)	pozitívne	2,3 – 3,9	0,5 – 2,3
formaldehyd		50-00-0	kvapalné	rozpustné	senzibilizátor (silný)	pozitívne	9 – 30	4 – 9
2-merkaptobenzotiazol		149-30-4	tuhé	nerozpustné	senzibilizátor (mierny)	pozitívne	250 – 290	60 – 250
etyléndiamín		107-15-3	kvapalné	rozpustné	senzibilizátor (mierny)	pozitívne	500 – 700	0,1 – 0,4
etylénglykol-dimetakrylát		97-90-5	kvapalné	nerozpustné	senzibilizátor (slabý)	pozitívne	> 2 000	0,04 – 0,1
4-alylanizol (estragol)		140-67-0	kvapalné	nerozpustné	senzibilizátor (slabý)	pozitívne	> 2 000	0,01 – 0,07
streptomycín sulfát		3810-74-0	tuhé	rozpustné	nespôsobuje senzibilizáciu	negatívne	> 2 000	> 2 000
glycerol		56-81-5	kvapalné	rozpustné	nespôsobuje senzibilizáciu	negatívne	> 2 000	> 2 000
izopropanol		67-63-0	kvapalné	rozpustné	nespôsobuje senzibilizáciu	negatívne	> 2 000	> 2 000

Skratky: Číslo CAS = číslo v registri služby CAS (Chemical Abstracts Service)

¹ Potencia *in vivo* je odvodená pomocou kritérií navrhnutých organizáciou ECETOC (19).

² Na základe hodnôt pozorovaných v minulosti (1) (6).

³ Hodnoty CV05 a IL-8 Luc MIT sa vypočítali na základe rozpustnosti vo vode podľa softvéru EPI Suite™.

⁴ CV05: minimálna koncentrácia, pri ktorej majú chemikálie hodnotu Inh-GAPLA nižšiu ako 0,05.

⁵ MIT: najnižšia koncentrácia, pri ktorej chemikálie spĺňa kritériá klasifikácie ako pozitívnej látky.

Dodatok 3.4**INDEXY A KRITÉRIÁ POSUDZOVANIA****nIL8LA (nSLO-LA)**

J-té opakovanie ($j = 1 - 4$) i-tej koncentrácie ($i = 0 - 11$) sa meria pre IL8LA (SLO-LA), resp. GAPLA (SLR-LA). Normalizovaná hodnota IL8LA sa označuje ako nIL8LA (nSLO-LA) a je vymedzená ako:

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

Je to základná jednotka merania v tejto skúške.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Ind-IL8LA, t. j. násobné zvýšenie spriemerovanej hodnoty nIL8LA (nSLO-LA) pre opakovanie pri i-tej koncentrácii, ktoré sa porovnáva s hodnotou pri koncentrácii 0, predstavuje hlavnú meranú hodnotu v tejto skúške. Tento pomer je vyjadrený týmto vzorcom:

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

Podľa návrhu vedúceho laboratória zodpovedá hodnota 1,4 pozitívnemu výsledku testovanej chemikálie. Táto hodnota je stanovená na základe skúmania historických údajov vedúceho laboratória. Tím pre správu údajov následne používal túto hodnotu vo všetkých fázach validačnej štúdie. Hlavný výsledok, Ind-IL8LA, predstavuje pomer dvoch aritmetických priemerov, ako sa uvádza v rovnici.

95 % interval spoľahlivosti (95 % CI)

Na vyjadrenie presnosti hlavnej výslednej hodnoty možno vykonať odhad 95 % intervalu spoľahlivosti (95 % CI) na základe uvedeného pomeru. Keď je dolný limit 95 % CI ≥ 1 , označuje to, že hodnota nIL8LA s i-tou koncentráciou je významne vyššia ako príslušná hodnota s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla. Na stanovenie 95 % CI existuje niekoľko spôsobov. V rámci tejto štúdie sa použila metóda známa pod označením Fiellerova teoréma. Táto teoréma 95 % intervalu spoľahlivosti sa získala z tohto vzorca:

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

keď

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

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

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

$t_{0.975(v)}$ predstavuje 97,5. percentil centrálnej distribúcie t s hodnotou v stupňa voľnosti, keď

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

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

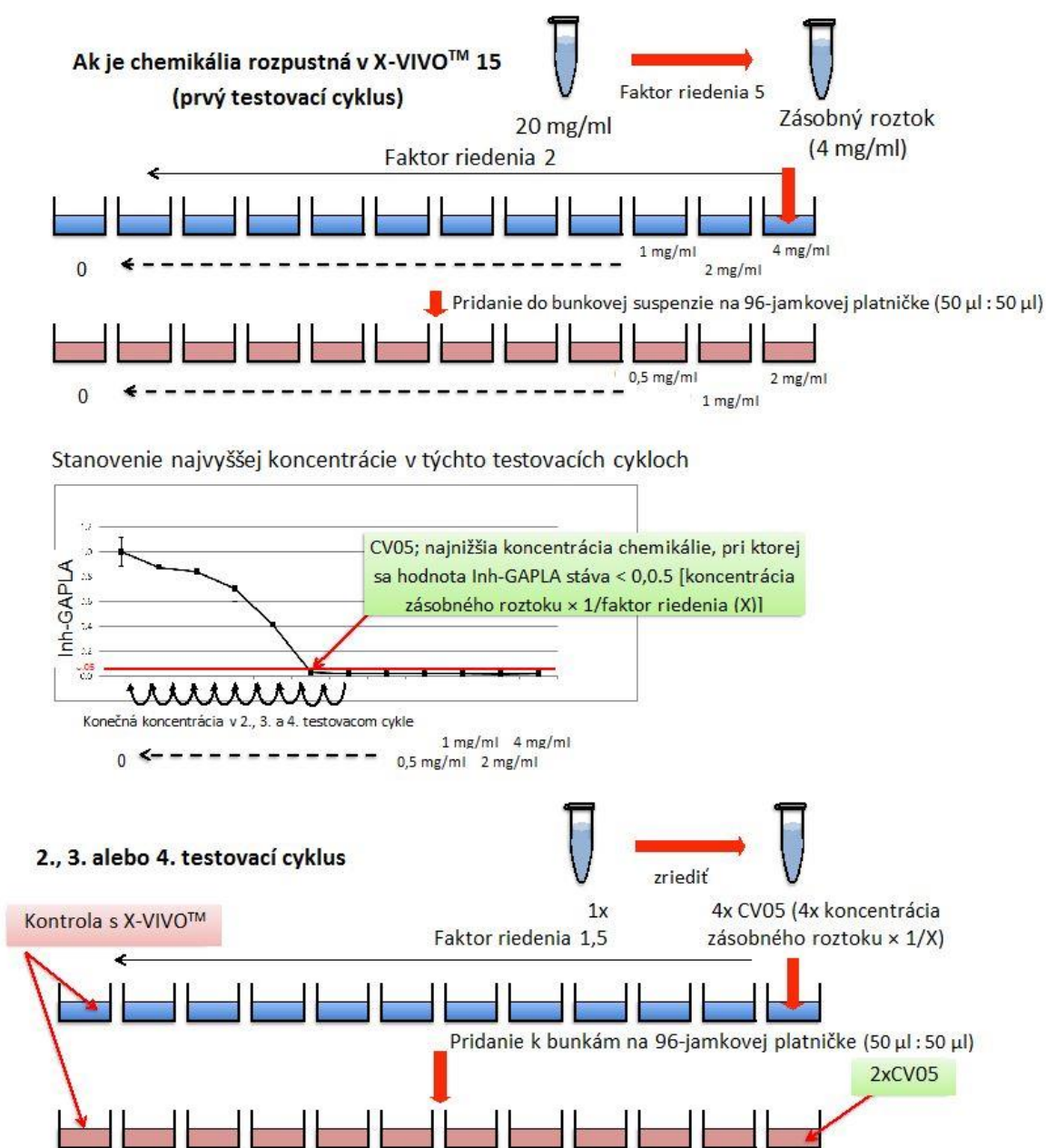
Hodnota Inh-GAPLA predstavuje pomer spriemerovanej hodnoty GAPLA (SLR-LA) pre opakovanie i -tej koncentrácie v porovnaní s hodnotou pre kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla a vyjadruje sa ako

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

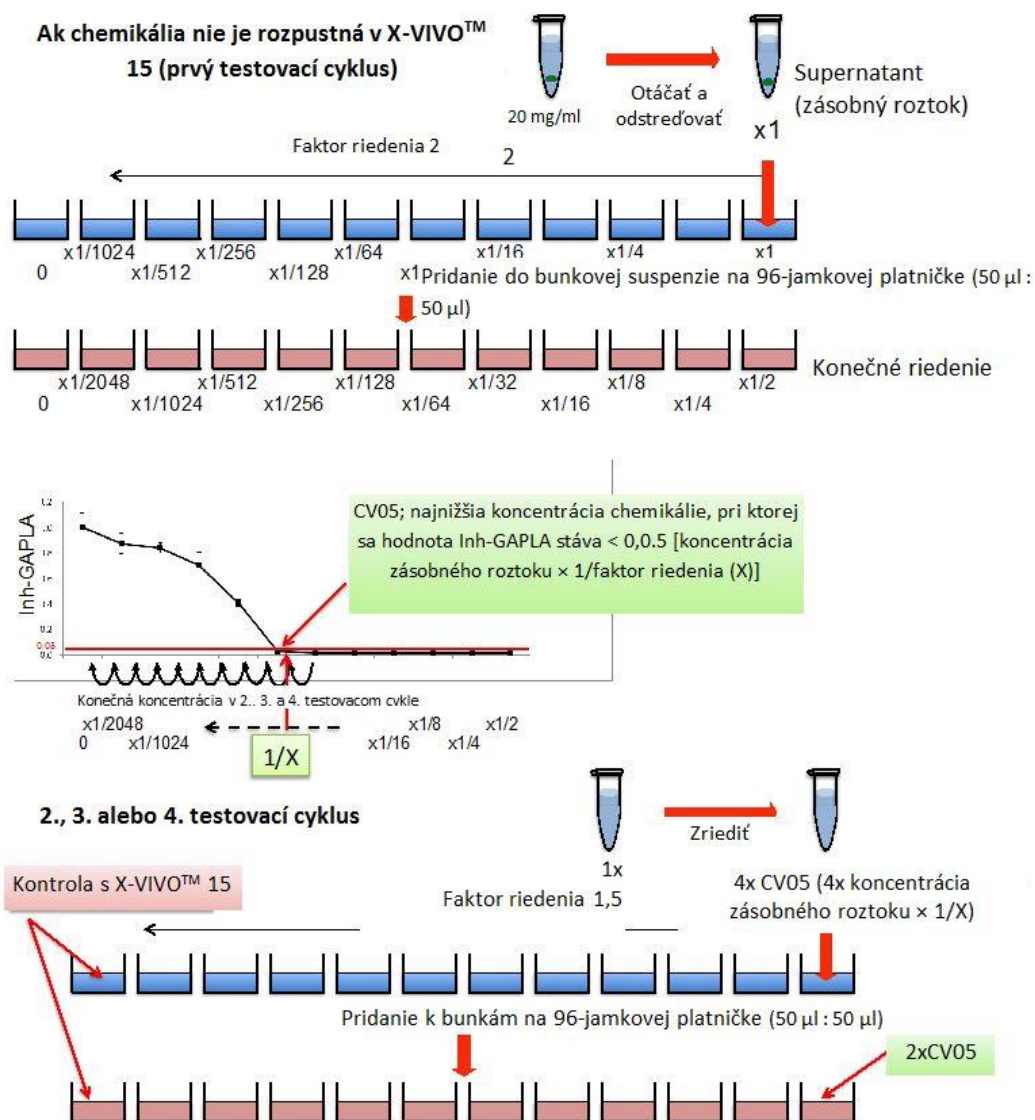
Keďže hodnota GAPLA je menovateľ hodnoty $nIL8LA$, veľmi malá hodnota spôsobuje veľkú zmenu hodnoty $nIL8LA$. Hodnoty $Ind-IL8LA$ s mimoriadne malou hodnotou Inh-GAPLA (menej ako 0,05) sa môžu považovať sa prejav nízkej presnosti.

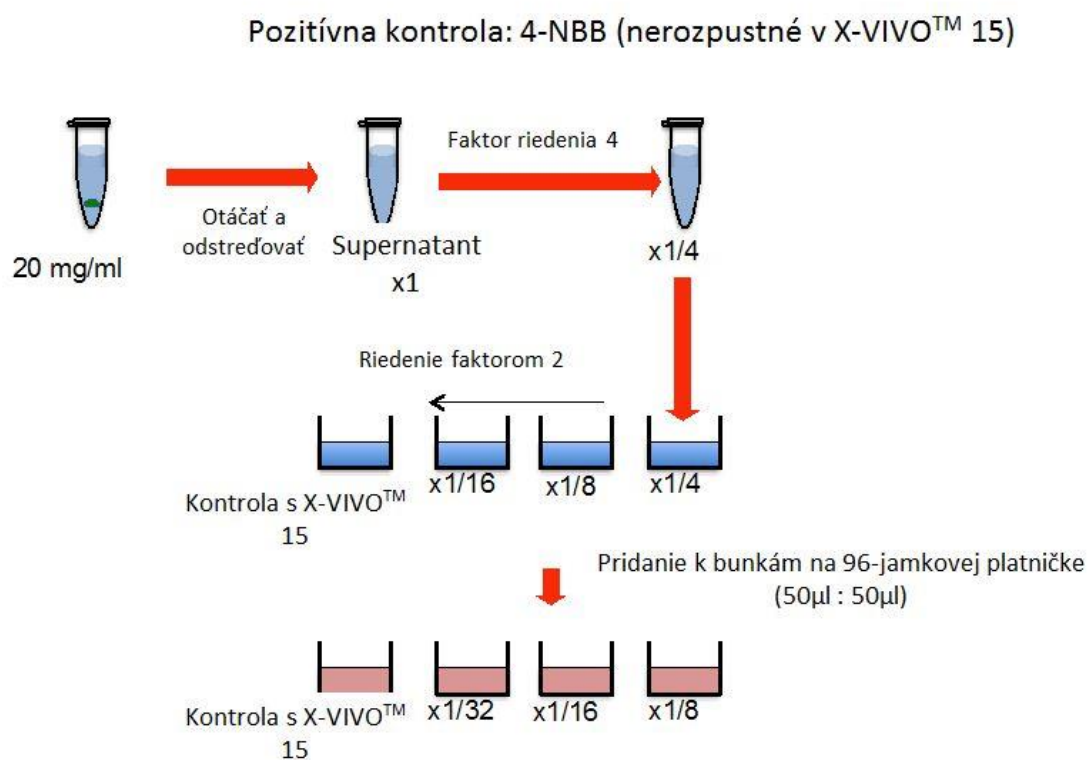
Dodatok 3.5**SCHÉMA METÓD NA ROZPUSTENIE CHEMIKÁLIÍ PRE SKÚŠKU IL-8 LUC**

a) pre chemikálie rozpustné v X-VIVO™ 15 pri koncentrácii 20 mg/ml



b) pre chemikálie nerozpustné v X-VIVO™ 15 pri koncentrácii 20 mg/ml



Dodatok 3.6**SCHÉMA METÓDY NA ROZPUSTENIE 4-NBB PRE POZITÍVNU KONTROLU V SKÚŠKE IL-8 LUC.**

“

9. V časti C sa dopĺňajú tieto kapitoly:

„C.52 ROZŠÍRENÝ JEDNOGENERAČNÝ REPRODUKČNÝ TEST NA RYŽOVNÍČKE JAPONSKEJ (MEOGRT)

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov (TG) 240 (2015). V rámci rozšíreného jednogeneračného reprodukčného testu na ryžovníčke japonskej (MEOGRT) sa opisuje komplexná testovacia metóda založená na expozícii rýb počas viacerých generácií s cieľom poskytnúť relevantné údaje z hľadiska ekologickej nebezpečnosti a posúdenia rizika chemikálií vrátane tých, pri ktorých existuje podozrenie, že predstavujú endokrinné disruptory (EDC). Expozícia v rámci testu MEOGRT pokračuje až do vyliahnutia (do dvoch týždňov po oplodnení) v druhej generácii (F2). Na odôvodnenie užitočnosti rozšírenia testu o obdobie po vyliahnutí generácie F2 by bolo potrebné ďalšie skúmanie. V súčasnosti neexistujú dostatočné informácie, na základe ktorých by boli dostupné relevantné podmienky alebo kritériá odôvodňujúce rozšírenie testu o ďalšie obdobie v rámci generácie F2. Táto testovacia metóda sa však môže aktualizovať po posúdení nových informácií a údajov. Za určitých okolností môže byť potenciálne užitočné napríklad usmernenie o rozšírení testu o ďalšie obdobie v rámci generácie F2 tak, aby zahŕňal reprodukciu (napr. v prípade chemikálií s vysokým biokoncentračným potenciálom alebo indikácií medzigeneračných účinkov v iných taxónoch). Pomocou tejto testovacej metódy možno hodnotiť potenciálne chronické účinky chemikálií vrátane potenciálnych endokrinných disruptorov na ryby. V rámci metódy sa kladie hlavný dôraz na potenciálne účinky relevantné z hľadiska populácie (konkrétne škodlivé vplyvy na prežitie, vývoj, rast a reprodukciu) pri výpočte hodnôt koncentrácie, pri ktorej sa nepozorujú účinky (NOEC), alebo účinnej koncentrácie (EC_x), hoci je potrebné poznamenať, že prístupy s využitím účinnej koncentrácie EC_x sú zriedka vhodné pre rozsiahle štúdie tohto typu, v ktorých môže byť nepraktický rastúci počet testovacích koncentrácií, ktoré majú slúžiť na určenie požadovanej hodnoty EC_x , čo môže vzhľadom na veľký počet použitých zvierat viesť aj k značným obavám z hľadiska dobrých životných podmienok zvierat. V prípade chemikálií, pri ktorých sa nevyžaduje posúdenie v prebehu viacerých generácií, alebo chemikálií, ktoré nie sú potenciálnymi endokrinnými disruptormi, môžu byť vhodnejšie iné testovacie metódy (1). Ryžovníčka japonská je vhodným druhom na použitie v tejto testovacej metóde vzhľadom na krátky životný cyklus a možnosti určiť jej genetické pohlavie (2), čo sa považuje za rozhodujúcu zložku v tejto testovacej metóde. Špecifické metódy a sledované parametre z hľadiska pozorovania, ktoré sú opísané v tejto metóde, sa vzťahujú len na ryžovníčku japonskú. V prípade iných

malých druhov rýb (napr. danio pruhované) je možné prispôsobenie podobnému testovaciemu protokolu.

2. Touto testovacou metódou sa meria viacero biologických sledovaných parametrov. Hlavný dôraz sa kladie na relevantné parametre z hľadiska potenciálnych škodlivých účinkov na populáciu vrátane prežitia, vývoja výrazných znakov, rastu a reprodukcie. S cieľom poskytnúť mechanistické informácie a prepojenie medzi výsledkami z iných druhov terénnych a laboratórnych štúdií, v ktorých existujú dôkazy *a posteriori*, že chemikália vykazuje pôsobenie ako potenciálny endokrinný disruptor (napr. androgénne alebo estrogénové pôsobenie v iných testoch a skúškach), sa ďalej môžu získať ďalšie užitočné informácie meraním mRNA *vitelogenínu* (*vgt*) (alebo bielkoviny vitelogenínu, VTG), fenotypových sekundárnych pohlavných znakov (SSC) v súvislosti s genetickým pohlavím, ako aj posudzovaním histopatológie. Je potrebné poznamenať, že ak pri testovanej chemikálii alebo jej metabolitoch neexistuje podozrenie, že predstavujú endokrinné disruptory, nemusí byť potrebné merať tieto sekundárne sledované parametre a vhodnejšie môžu byť štúdie, ktoré sú menej náročné z hľadiska zdrojov a zvierat (1). Vymedzenie pojmov použitých v tejto testovacej metóde sa uvádza v dodatku 1.

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

3. Vzhľadom na obmedzený počet testovaných chemikálií a laboratórií, ktoré sa zúčastnili na validácii tejto pomerne zložitej štúdie, sa predpokladá, že sa táto testovacia metóda prehodnotí a v prípade potreby zreviduje na základe získaných skúseností, keď bude k dispozícii dostatočný počet štúdií na posúdenie vplyvu novej koncepcie štúdie. Údaje možno použiť na úrovni 5 koncepčného rámca OECD na testovanie a hodnotenie endokrinných disruptorov (3). Testovacia metóda sa začína tým, že sa dospelá ryba (generácia F0) vystaví počas reprodukčnej fázy testovanej chemikálii. Expozícia pokračuje počas vývoja a reprodukcie v generácii F1 a liahnutia v generácii F2, vďaka čomu možno pomocou skúšky vyhodnotiť štrukturálne aj aktivačné endokrinné dráhy. Pri interpretácii sledovaných parametrov súvisiacich s endokrinným systémom možno použiť analýzu váhy dôkazov.
4. Súčasťou testu má byť dostatočný počet jedincov, aby sa zabezpečila dostatočná kapacita na vyhodnotenie sledovaných parametrov súvisiacich s reprodukciou (pozri dodatok 3), pričom zároveň sa má zabezpečiť, aby sa použil len minimálny potrebný počet zvierat z dôvodu zabezpečenia dobrých životných podmienok zvierat. Vzhľadom na veľký počet použitých pokusných zvierat je dôležité dôkladne zvážiť potrebu tohto testu v súvislosti s existujúcimi údajmi, ktoré už môžu obsahovať relevantné informácie o mnohých

sledovaných parametroch testu MEOGRT. V tejto súvislosti môže do určitej miery pomôcť rámec OECD pre testovanie toxicity na rybách (1).

5. Táto testovacia metóda bola vyvinutá hlavne na rozlišovanie medzi účinkami jednotlivých látok. Ak sa však vyžaduje testovanie zmesi, je potrebné zvážiť, či poskytne prijateľné výsledky na určený regulačný účel.
6. Pred začiatkom testu je dôležité mať k dispozícii informácie o fyzikálno-chemických vlastnostiach testovanej chemikálie, najmä na to, aby bolo možné pripraviť stabilné chemické roztoky. Je potrebné mať k dispozícii aj primerane citlivú analytickú metódu na overenie koncentrácií testovanej chemikálie.

PRINCÍP TESTU

7. Test sa začína trojtýždňovou expozíciou pohlavne dospelých samcov a samíc (najmenej 12 týždňov po oplodnení) v chovných pároch, počas ktorej dochádza k distribúcii testovanej chemikálie do organizmu rodičovskej generácie (F0) podľa jej toxikokinetických vlastností. Čo najbližšie k prvému dňu štvrtého týždňa sa zozbierajú vajíčka na začatie chovu generácie F1. Počas chovu generácie F1 (celkovo 15 týždňov) sa posudzuje liahnivosť a miera prežitia. Okrem toho sa 9 – 10 týždňov po oplodnení posudzujú vzorky rýb z hľadiska vývojových sledovaných parametrov a neresenie sa vyhodnocuje počas troch týždňov v období 12 až 14 týždňov po oplodnení. Generácia F2 sa začína chovať po treťom týždni posudzovania reprodukcie a chová sa až do dokončenia liahnutia.

KRITÉRIA PLATNOSTI TESTU

8. Uplatňujú sa tieto kritériá platnosti testu:
 - koncentrácia rozpusteného kyslíka má počas testu dosahovať ≥ 60 % hodnoty rozpustnosti vzdušného kyslíka,
 - stredná teplota vody počas celého trvania štúdie má byť v rozsahu 24 až 26 °C. Krátke odchýlky od strednej hodnoty v jednotlivých akváriách nemajú prekročiť 2 °C,
 - priemerná plodivosť kontrol v každej z generácií (F0 a F1) má byť vyššia ako 20 vajíčok na pár a deň. Fertilita všetkých vajíčok nakladených počas posudzovania má byť vyššia ako 80 %. Okrem toho má 16 z odporúčaných 24 kontrolných chovných párov (> 65 %) naklásať viac ako 20 vajíčok na pár a deň,
 - liahnivosť vajíčok pri kontrolách má byť ≥ 80 % (priemer) (v každej z generácií F1 a F2),

- miera prežitia po vyliahnutí má byť v kontrolách (F1) do 3 týždňov po oplodnení $\geq 80 \%$ (priemer) a od 3 týždňov po oplodnení do usmrtenia pri generácii F1 (t. j. 15 týždňov po oplodnení) má byť $\geq 90 \%$ (priemer),
- malo by byť preukázateľné, že koncentrácia testovanej chemikálie v roztoku bola uspokojivo udržiavaná v rozsahu $\pm 20 \%$ stredných nameraných hodnôt.

Hoci teplota vody nepredstavuje kritérium platnosti, replikáty v rámci testovanej skupiny sa nemajú medzi sebou štatisticky odlišovať a rovnako ani testované skupiny v rámci testu sa nemajú medzi sebou štatisticky odlišovať (na základe denných meraní teploty a s vylúčením krátkych odchýlok).

9. Hoci sa pri skupinách s vyššou expozíciou môže pozorovať znížená reprodukcia, prinajmenšom v tretej najvyššej skupine a vo všetkých nižších skupinách generácie F0 by mala byť dostatočná reprodukcia na naplnenie násadových inkubátorov. Navyše má byť dostatočná miera prežitia embryí v skupinách s tretou najvyššou expozíciou a nižšími expozíciami v generácii F1, aby bolo možné vyhodnotiť sledované parametre pri odbere vzoriek pred dosiahnutím dospelosti (pozri odseky 36 a 38 a dodatok 9). Okrem toho má byť prinajmenšom minimálna miera prežitia po vyliahnutí ($\sim 20 \%$) v skupine s druhou najvyššou expozíciou v generácii F1. Tieto požiadavky nepredstavujú samy osebe kritériá platnosti, ale odporúčania na to, aby bolo možné vypočítať spoľahlivé hodnoty NOEC.
10. Ak sa zistí odchýlka od kritérií platnosti testu, dôsledky by sa mali posudzovať s ohľadom na spoľahlivosť výsledkov testu a tieto odchýlky a úvahy by mali byť zahrnuté do správy o teste.

OPIS METÓDY

Prístroje

11. Bežné laboratórne vybavenie a najmä tieto zariadenia:

- a) zariadenia na meranie kyslíka a pH;
- b) zariadenie na stanovenie tvrdosti a alkality vody;
- c) vhodné zariadenie na reguláciu teploty a podľa možnosti na kontinuálne monitorovanie;
- d) nádrže z chemicky inertného materiálu a s vhodným objemom vo vzťahu k odporúčanej veľkosti násady a chovnej hustote (pozri dodatok 3);
- e) vhodné presné váhy (t. j. s presnosťou $\pm 0,5$ mg).

Voda

12. Použiteľná voda na testovanie je každá voda, v ktorej testovací druh vykazuje vhodné dlhotrvajúce prežívanie a rast. Má mať konštantnú kvalitu počas celého trvania testu. S cieľom zaistiť, že voda na riedenie neovplyvní výsledky testu neprimeraným spôsobom (napríklad tvorbou komplexov testovanej chemikálie) alebo že nebude mať nepriaznivý vplyv na reprodukčnú schopnosť násady rýb, mali by sa z nej v pravidelných intervaloch odoberať vzorky na analýzu. Ak je známe, že voda má relatívne stálu kvalitu, stačí, ak sa v nej bude napríklad raz za šesť mesiacov merať obsah ťažkých kovov (napríklad Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), hlavných aniónov a kationov (napríklad Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), pesticídov, celkový obsah organického uhlíka a nerozpustných pevných látok. Niektoré chemické vlastnosti vody vhodnej na riedenie sú uvedené v dodatku 2. pH vody má byť v rozsahu od 6,5 do 8,5, ale počas jednotlivého testu má byť v rozsahu $\pm 0,5$ jednotky pH.

Expozičný systém

13. Konštrukcia a materiály použité na expozičný systém nie sú špecifikované. Na konštrukciu testovacieho systému sa použije sklo, nehrdzavejúca oceľ alebo iný chemicky inertný materiál, ktorý sa nekontaminoval počas predchádzajúcich testov. Na účely tohto testu môže vhodný expozičný systém obsahovať kontinuálny prietokový systém (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13).

Testované roztoky

14. Zásobný roztok testovanej chemikálie sa dopravuje do expozičného systému pomocou vhodného čerpadla. Prietok zásobného roztoku sa kalibruje v súlade s analytickým potvrdením testovaných roztokov pred začiatkom expozície a počas testu sa pravidelne kontroluje z hľadiska objemu. Testovaný roztok v jednotlivých komorách sa primerane obnovuje (napr. najmenej 5 obnovení objemu/deň až 16 obnovení objemu/deň alebo prietok do 20 ml/min.) v závislosti od stability testovanej chemikálie a kvality vody.
15. Testované roztoky vybraných koncentrácií sa pripravujú riedením zásobného roztoku. Zásobný roztok sa má podľa možnosti pripraviť jednoduchým miešaním alebo pretrepávaním testovanej chemikálie vo vode na riedenie mechanickým prostriedkom (napr. miešadlom a/alebo ultrazvukom). Na dosiahnutie vhodne koncentrovaného zásobného roztoku možno použiť saturačné kolóny/systémy alebo pasívne dávkovacie metódy (14). Je potrebné vyvinúť všetko úsilie na to, aby sa zabránilo použitiu rozpúšťadiel alebo nosičov, pretože: 1. určité rozpúšťadlá môžu samy osebe spôsobovať toxicitu a/alebo nežiaduce alebo neočakávané reakcie; 2. testovanie chemikálií nad hranicou ich rozpustnosti vo vode (k čomu môže často dôjsť pri použití rozpúšťadiel) môže viesť k nepresnému stanoveniu účinných koncentrácií; 3. použitie rozpúšťadiel

v dlhodobejších testoch môže spôsobiť vznik značného stupňa biofilmu v súvislosti s mikrobiálnou aktivitou, ktorý môže mať vplyv na podmienky prostredia, ako aj na schopnosť udržať expozičné koncentrácie; a 4. v prípade, že neexistujú historické údaje, z ktorých vyplýva, že rozpúšťadlo neovplyvňuje výsledok štúdie, pri použití rozpúšťadiel sa vyžaduje použitie kontroly s aplikáciou rozpúšťadla, čo má dôsledky z hľadiska dobrých životných podmienok zvierat, keďže sú na uskutočnenie testu potrebné ďalšie zvieratá. V prípade ťažko testovateľných chemikálií možno rozpúšťadlo použiť ako poslednú možnosť, pričom na stanovenie najlepšej metódy je potrebné prečítať si usmerňovací dokument OECD č. 23 o testovaní toxicity ťažko testovateľných látok a zmesí vo vodnom prostredí (15). Rozpúšťadlo sa vyberie na základe chemických vlastností testovanej chemikálie a dostupnosti historických údajov o používaní rozpúšťadla. Ak sa použijú nosiče s rozpúšťadlom, okrem (negatívnych) kontrol bez aplikácie rozpúšťadla (len voda na riedenie) je potrebné vyhodnotiť aj primerané kontroly s aplikáciou rozpúšťadla. V prípade, že sa nemožno vyhnúť použitiu rozpúšťadla a vyskytne sa mikrobiálna aktivita (vznik biofilmu), počas celého testu sa odporúča v jednotlivých nádržiach (najmenej raz za týždeň) zaznamenávať vznik biofilmu/podávať správy o jeho vzniku. Koncentrácia rozpúšťadla má byť v ideálnom prípade v kontrole s aplikáciou rozpúšťadla a vo všetkých testovacích vzorkách konštantná. Ak sa neudržiava konštantná koncentrácia rozpúšťadla, v kontrole s aplikáciou rozpúšťadla sa má použiť najvyššia koncentrácia rozpúšťadla v testovacej vzorke. V prípadoch, keď sa použije nosič s rozpúšťadlom, nemajú maximálne koncentrácie rozpúšťadla prekročiť 100 µl/l alebo 100 mg/l (15) a odporúča sa udržiavať koncentráciu rozpúšťadla čo najnižšiu (napr. < 20 µl/l), aby sa predišlo potenciálnemu účinku rozpúšťadla na merané sledované parametre (16).

Pokusné zvieratá

Výber a chov rýb

16. Pokusným druhom je ryžovníčka japonská (*Oryzias latipes*) vzhľadom na krátky životný cyklus a možnosť určiť genetické pohlavie. Hoci možno podobnému testovaciemu protokolu prispôbiť iné malé druhy rýb, špecifické metódy a sledované parametre z hľadiska pozorovania, ktoré sú opísané v tejto testovacej metóde, sa vzťahujú len na ryžovníčku japonskú (pozri odsek 1). Pri ryžovníčke japonskej možno jednoducho dosiahnuť rozmnožovanie sa v zajatí, existujú zverejnené metódy na jej chov (17) (18) (19) a sú k dispozícii údaje z krátkodobých testov letality, testov skorých štádií života a úplného životného cyklu (5) (6) (8) (9) (20). Pri všetkých rybách sa dodržiava fotoperiódá so 16 hodinami svetla a 8 hodinami tmy. Ako krmivo pre ryby sa používajú živé naupliá žiabronôžky soľnej (rod *Artemia*), ktoré možno v prípade potreby doplniť

komerčne dostupným vločkovým krmivom. Komerčne dostupné vločkové krmivo treba pravidelne analyzovať, aby sa zistilo, či neobsahuje kontaminanty.

17. Pokiaľ sa dodržiavajú vhodné postupy chovu, nevyžaduje sa špecifický chovný protokol. Ryžovníčku japonskú možno napríklad chovať v 2-litrových nádržiach s 240 rybami v larválnom štádiu na nádrž do 4 týždňov po oplodnení, potom ju možno chovať v 2-litrových nádržiach s 10 rybami na nádrž do 8 týždňov po oplodnení, pričom následne sa vytvoria chovné páry, ktoré sa prenesú do 2-litrových nádrží.

Aklimatizácia a výber rýb

18. Testované ryby sa vyberajú zo zásoby jedného laboratória, pričom sa pred testom najmenej dva týždne aklimatizujú v podobných podmienkach kvality vody a osvetlenia, aké sa používajú v teste, (poznámka: toto aklimatizačné obdobie nepredstavuje obdobie *in situ* pred expozíciou). Odporúča sa, aby sa testované ryby získali z chovu v rámci laboratória, keďže preprava predstavuje pre dospelé ryby stres a môže ovplyvňovať spoľahlivé trenie. Ryby sa krmia naupliami žiabronôžky soľnej dvakrát denne počas obdobia chovu a počas vychytávacej fázy, pričom sa táto potrava dopĺňa komerčne dostupným vločkovým krmivom. Na začatie tohto testu s cieľom zabezpečiť primeranú replikáciu sa vyžaduje najmenej 42 chovných párov (54 chovných párov, ak sa vyžaduje kontrola s aplikáciou rozpúšťadla, sčasti pre nedostatok historických údajov, ktoré by podporovali len použitie kontroly s aplikáciou rozpúšťadla). Pri každom chovnom páre generácie F0 sa má navyše overiť zloženie chromozómov XX-XY (t. j. normálne zloženie pohlavných chromozómov v každom pohlaví), aby sa predišlo možnému začleneniu samcov spontánne obsahujúcich chromozómy XX (pozri odsek 39).
19. Počas aklimatizačnej fázy sa zaznamenáva mortalita chovných rýb a po 48-hodinovom období ustálenia sa uplatnia tieto kritériá:
 - mortalita vyššia ako 10 % chovnej populácie počas siedmich dní pred prenosom do testovacieho systému: celá násada sa vyradí,
 - mortalita v rozsahu 5 % až 10 % chovnej populácie počas siedmich dní pred prenosom do testovacieho systému: aklimatizácia počas ďalších siedmich dní, o ktoré sa predĺži dvojtýždňové aklimatizačné obdobie. Ak je počas týchto dodatočných siedmich dní mortalita vyššia ako 5 %, celá násada sa vyradí,
 - mortalita nižšia ako 5 % populácie počas siedmich dní pred prenosom do testovacieho systému: násada sa akceptuje.

20. Počas dvojtýždňového aklimatizačného obdobia pred testom a počas obdobia expozície nemajú byť ryby liečené na choroby a pokiaľ je to možné, liečbe chorôb je potrebné sa úplne vyhnúť. V štúdii sa nemajú používať ryby s klinickými príznakmi choroby. Uchováva sa záznam o pozorovaniach a akejkolvek profylaktickej a terapeutickej liečbe chorôb počas obdobia chovu pred testom.
21. Vychytávací fáza sa začína s pohlavne dimorfnými dospelými rybami s geneticky odlišným pohlavím z laboratórnej zásoby pohlavne dospelých zvierat chovaných pri teplote 25 ± 2 °C. Pri týchto rybách sa má počas týždňa pred expozíciou preukázať plodnosť (t. j. tým, že majú životaschopné potomstvo). V rámci celej skupiny rýb použitých v teste sa hmotnosť jednotlivých jedincov podľa pohlavia na začiatku testu má udržiavať v rozsahu ± 20 % aritmetického priemeru hmotností toho istého pohlavia. Na odhad priemernej hmotnosti sa pred testom odváži podvzorka rýb. Vybraté ryby majú mať najmenej 12 týždňov po oplodnení, pričom samice majú mať hmotnosť ≥ 300 mg a samce ≥ 250 mg.

KONCEPCIA TESTU

Testované koncentrácie

22. Odporúča sa použiť päť koncentrácií chemikálie plus kontroly. Pri výbere rozsahu testovacích koncentrácií je potrebné zvážiť všetky zdroje informácií vrátane kvantitatívnych vzťahov štruktúry a aktivity (QSAR), prevzatých údajov z analogických zdrojov, výsledkov testov na rybách, napríklad skúšok akútnej mortality (kapitola C.1 tejto prílohy), krátkodobej reprodukčnej skúšky na rybách (kapitola C.48 tejto prílohy) a iných testovacích metód, napríklad kapitoly C.15, C.37, C.41, C.47 alebo C.49 tejto prílohy (21) (22) (23) (24) (25) (26), ak sú k dispozícii, alebo v prípade potreby z testu na zistenie rozsahu, ktorý prípadne zahŕňa reprodukčnú fázu. V prípade potreby sa test na zistenie rozsahu môže uskutočniť pri podmienkach (kvalita vody, testovací systém, násada zvierat) podobných tým, ktoré sa používajú v konečnom teste. Ak sa vyžaduje použitie rozpúšťadla a nie sú k dispozícii historické údaje, pomocou testu na zistenie rozsahu možno zistiť vhodnosť rozpúšťadla. Najvyššia testovaná koncentrácia by nemala presiahnuť úroveň rozpustnosti vo vode, 10 mg/l alebo 1/10 96h-LC50 (27). Najnižšia koncentrácia by mala predstavovať desať- až stonásobne nižší faktor, než je najvyššia koncentrácia. Vďaka použitiu piatich koncentrácií možno v tomto teste merať nielen vzťah medzi dávkou a odozvou, ale aj získať hodnoty najnižšej koncentrácie s pozorovaným účinkom (LOEC) a NOEC, ktoré sú potrebné na posúdenie rizika v niektorých regulatórnych programoch alebo v niektorých jurisdikciách. Faktor rozstupu medzi nominálnymi koncentraciami

testovanej chemikálie medzi susediacimi úrovňami aplikovanej dávky je vo všeobecnosti $\leq 3,2$.

Replikáty v rámci testovaných skupín a kontrol

23. Je potrebné použiť minimálne šesť testovacích komôr s replikátmi na každú testovanú koncentráciu (pozri dodatok 7). Počas reprodukčnej fázy (s výnimkou generácie F0) sa na účely posúdenia plodivosti štruktúra replikátov zdvojuje a každý replikát obsahuje len jeden chovný pár (pozri odsek 42).
24. Okrem testovacích koncentrácií sa použije kontrola s vodou na riedenie a v prípade potreby kontrola s aplikáciou rozpúšťadla. Na zabezpečenie primeranej štatistickej váhy je potrebné použiť dvojnásobný počet komôr s replikátmi pre kontroly (t. j. v prípade kontrol sa má použiť najmenej dvanásť replikátov). Počas reprodukčnej fázy sa zdvojnásobuje počet replikátov v rámci kontrol (t. j. minimálne 24 replikátov, pričom každý replikát obsahuje len jeden páriaci sa pár). Po reprodukcii nemajú kontrolné replikáty obsahovať viac než 20 embryí (rýb).

POSTUP

Začiatok testu

25. Reprodukčne aktívne dospelé ryby, ktoré sa použijú na začatie generácie F0 v rámci testu, sa vyberú na základe dvoch kritérií: vek (zvyčajne viac ako 12 týždňov po oplodnení, odporúča sa však neprekročiť 16 týždňov po oplodnení) a hmotnosť (má byť ≥ 300 mg v prípade samíc a ≥ 250 mg v prípade samcov).
26. Páry zložené zo samíc a samcov spĺňajúcich uvedené špecifikácie sa premiestnia ako samostatné páry do jednotlivých nádrží replikátov, t. j. na začiatku testu bude dvanásť replikátov v rámci kontrol a šesť replikátov v skupinách s aplikovanou chemikáliou. Týmto nádržiam sa náhodne priradí testovaná skupina (napr. T1 – T5 a kontrola) a replikát (napr. A – L pri kontrolách a A – F pri skupinách s aplikovanou chemikáliou) a potom sa umiestnia do expozičného systému s príslušným prítokom do jednotlivých nádrží.

Podmienky expozície

27. Úplný súhrn parametrov a podmienok testu sa uvádza v dodatku 3. Dodržiavaním týchto špecifikácií sa majú v prípade kontrolných rýb dosiahnuť hodnoty sledovaných parametrov, ktoré sú podobné hodnotám uvedeným v dodatku 4.

28. Počas testu je potrebné merať koncentráciu rozpusteného kyslíka, pH a teplotu najmenej v jednej testovacej nádobe v každej testovanej skupine a v kontrole. S výnimkou teploty sa tieto merania uskutočňujú počas obdobia expozície najmenej raz týždenne. Priemerná teplota vody v rámci testu počas celého trvania štúdie má byť v rozsahu 24 až 26 °C. Teplota sa meria každý deň počas celého obdobia expozície. pH vody má byť v rozsahu od 6,5 do 8,5, ale počas jednotlivého testu má byť v rozsahu $\pm 0,5$ jednotky pH. Replikáty v rámci testovanej skupiny sa nemajú medzi sebou štatisticky odlišovať a rovnako ani testované skupiny v rámci testu sa nemajú medzi sebou štatisticky odlišovať (na základe denných meraní teploty a s vylúčením krátkych odchýlok).

Dĺžka expozície

29. V rámci testu dochádza k trojtýždňovej expozícii pohlavne dospelých rýb od generácie F0. V 4. týždni približne na 24. testovací deň sa vytvorí generácia F1, chovné páry generácie F0 sa humánnym spôsobom usmrčia a zaznamená sa ich hmotnosť a dĺžka (pozri odsek 34). Za tým nasleduje expozícia generácie F1 počas ďalších 14 týždňov (spolu 15 týždňov v prípade generácie F1) a expozícia generácie F2 počas dvoch týždňov až do vyliahnutia. Celkový čas trvania testu je primárne 19 týždňov (t. j. do vyliahnutia generácie F2). Harmonogram testu sa uvádza v tabuľke 2 a ďalej je podrobne vysvetlený v dodatku 9.

Kŕmny režim

30. Ryby možno kŕmiť žiabronôžkou soľnou rodu *Artemia* (24-hodinové naupliá) *ad libitum*, pričom sa táto potrava podľa potreby dopĺňa komerčne dostupným vločkovým krmivom. Komerčne dostupné vločkové krmivo treba pravidelne analyzovať, aby sa zistilo, či neobsahuje kontaminanty, napríklad organochlórové pesticídy, polycyklické aromatické uhľovodíky (PAU), polychlórované bifenyly (PCB). Je potrebné predísť podávaniu potravy so zvýšenou úrovňou látok s endokrinným pôsobením (t. j. fytoestrogénov), ktoré by mohli narušiť reakciu v rámci testu. Neskonsumovaná potrava a fekálny materiál sa odstraňujú z testovacích nádob podľa potreby, napríklad dôkladným vyčistením dna každej nádrže odsávaním. Bočné steny a dno každej nádrže je potrebné čistiť raz alebo dvakrát týždenne (napr. oškrabaním špachtľou). Príklad harmonogramu kŕmenia sa uvádza v dodatku 5. Dávka potravy závisí od počtu rýb na replikát. Dávka potravy sa preto znižuje, ak v replikáte dochádza k mortalite.

Analytické stanovenie a merania

31. Pred začiatkom obdobia expozície treba zabezpečiť riadne fungovanie systému prísunu chemikálie. Stanoviť by sa mali všetky potrebné analytické metódy vrátane dostatočných vedomostí o stabilite chemikálie v testovacom systéme. Počas testu sa koncentrácie

testovanej chemikálie stanovujú vo vhodných intervaloch, podľa možnosti aspoň raz týždenne v jednom replikáte v každej testovanej skupine so striedaním medzi replikátmi v tej istej testovanej skupine každý týždeň.

32. Počas testu by sa mali kontrolovať prietoky riediaceho a zásobného roztoku v príslušných intervaloch (napr. minimálne trikrát týždenne). Odporúča sa, aby výsledky vychádzali z nameraných koncentrácií. V prípade, že koncentrácia testovanej chemikálie v roztoku bola uspokojivo udržiavaná v rozsahu $\pm 20\%$ priemerných nameraných hodnôt počas celého testu, výsledky môžu vychádzať buď z nominálnych, alebo z nameraných hodnôt. V prípade chemikálií, pri ktorých dochádza k výraznej akumulácii v rybách, sa testovacie koncentrácie môžu znížiť nepriamo úmerne s rastom rýb. V takých prípadoch sa odporúča, aby sa miera obnovovania testovaného roztoku v každej komore prispôbila tak, aby sa testovacie koncentrácie udržiavali čo najkonštantnejšie.

Pozorovanie a merané sledované parametre

33. Medzi merané sledované parametre patrí plodivosť, fertilita, liahnutie, rast a prežívanie na účely hodnotenia možných účinkov na úrovni populácie. Denne sa uskutočňujú aj pozorovania správania a akékoľvek nezvyčajné správanie sa zaznamená. Medzi ostatné mechanistické sledované parametre patria úrovne hepatickej mRNA *vtg* alebo bielkoviny VTG na základe imunologického testu (28), pohlavné fenotypové markery, ako sú charakteristické papily análnej plutvy pri samcoch, histologické hodnotenie gonádálneho pohlavia a histopatologické hodnotenie obličky, pečene a gonády (pozri zoznam sledovaných parametrov v tabuľke 1). Všetky tieto špecifické sledované parametre sa hodnotia z hľadiska určenia genetického pohlavia jedinca na základe prítomnosti alebo neprítomnosti génu *dmy* určujúceho samčie pohlavie pri ryžovníčke japonskej (pozri odsek 41). Okrem to sa hodnotí aj čas do trenia. Jednoduché fenotypové pomery pohlaví možno navyše odvodiť na základe informácií o počte papíl análnej plutvy, na základe čoho sa stanoví, či je jedinec ryžovníčky japonskej fenotypovo samec alebo samica. Pri tejto testovacej metóde sa neočakáva schopnosť rozpoznať mierne odchýlky od očakávaného pomeru pohlaví, keďže pri pomerne malom počte rýb na replikát sa nedosiahne dostatočná štatistická váha. Počas histopatologického posúdenia sa hodnotí aj gonáda a uskutočnia sa omnoho dôkladnejšie analýzy na posúdenie gonádového fenotypu v kontexte genetického pohlavia.
34. Hlavným účelom tejto testovacej metódy je posúdiť potenciálne relevantné účinky testovanej chemikálie z hľadiska populácie. Mechanistické sledované parametre (VTG, sekundárne pohlavné znaky a určité účinky na gonády z hľadiska histopatológie) môžu pomôcť pri stanovení, či je niektorý účinok sprostredkovaný endokrinným pôsobením. Na

tieto mechanistické sledované parametre však môže mať vplyv aj systémová toxicita a iné toxicity. Následne možno podrobne posúdiť aj histopatológiu pečene a obličky s cieľom lepšie porozumieť reakciám pri mechanistických sledovaných parametroch. Ak sa však tieto podrobné hodnotenia neuskutočnia, je potrebné zaznamenať a uviesť v správe výrazné abnormality, ktoré sa mimochodom zistia počas histopatologického hodnotenia.

Humánne usmrcovanie rýb

35. Pri ukončení expozície generácií F0 a F1, keď sa vykonáva výber podvzorky rýb pred dosiahnutím dospelosti, sa tieto ryby usmrčia vhodným množstvom anestetického roztoku [napr. trikaín metán sulfonát, MS-222 (CAS 886-86-2), 100 – 500 mg/l] tlmeného pridaním 300 mg/l NaHCO₃ (bikarbonát sodný, CAS 144-55-8) na zníženie podráždenia slizníc. Ak sa na rybách prejavujú príznaky značného utrpenia (vo veľmi závažnej miere a je možné spoľahlivo predpokladať smrť) a zvieratá sa považujú za moribundné, je potrebné im podať anestetikum a usmrtiť ich a na účely analýzy údajov ich považovať za uhynuté. Ak sa ryba usmrtila v dôsledku morbiditu, zaznamená sa to a uvedie v správe. Ryba sa môže uchovať na účely histopatologickej analýzy (fixácia ryby na účely novej histopatológie) v závislosti od toho, kedy počas štúdie dôjde k jej usmrteniu.

Manipulácia s vajíčkami a rybami v larválnom štádiu

Odber vajíčok od chovných párov na rozmnožovanie nasledujúcej generácie

36. Odber vajíčok sa uskutočňuje v prvý deň (alebo v prípade potreby v prvých dvoch dňoch) 4. testovacieho týždňa pri prechode z generácie F0 na F1 a 18. testovacieho týždňa pri prechode z generácie F1 na F2. 18. testovací týždeň zodpovedá dospelým rybám generácie F1 15 týždňov po oplodnení. Je dôležitý deň pred odberom vajíčok z každej nádrže odstrániť všetky vajíčka, aby sa zabezpečilo, že odobraté vajíčka od chovného páru sú z jedného trenia. Samice ryžovníčky japonskej niekedy po trení nosia vajíčka v blízkosti močopohlavného otvoru, až kým ich nemôžu naklásať na substrát. Ak sa v nádrži nenachádza substrát, vajíčka možno nájsť buď prichytené k samici, alebo na dne nádrže. V závislosti od umiestnenia možno vajíčka opatrne odobrať zo samice alebo odsáť z dna nádrže vo 4. testovacom týždni generácie F0 a v 18. testovacom týždni generácie F1. Všetky vajíčka odobraté v rámci testovanej skupiny sa zoskupia pred rozdelením do inkubačných komôr.
37. Vlákna, ktoré držia vajíčka vylúčené pri trení pohromade, sa odstraňujú. Od každého chovného páru sa odoberú oplodnené vajíčka (do 20) (1 pár na replikát), zoskupia sa v rámci testovanej skupiny a systematicky sa rozdelia do vhodných inkubačných komôr (dodatky 6 a 7). Pomocou kvalitného stereoskopického mikroskopu možno pozorovať

charakteristické črty skorého štádia oplodnenia/vývoja, napríklad vystúpenie zárodkového obalu (choriónu), prebiehajúce delenie buniek alebo vznik blastuly. Inkubačné komory možno umiestniť buď v samostatných inkubačných akváriách pripravených pre jednotlivé testované skupiny (v takom prípade je v nich potrebné merať parametre kvality vody a koncentrácie testovanej chemikálie), alebo v akváriu s replikátom, v ktorom budú umiestnené vyliahnuté larvy (napr. eleuteroembryo). Ak sa vyžaduje druhý deň odberu (23. testovací deň), všetky vajíčka z oboch dní sa zoskupia a potom sa systematicky rozdelia do jednotlivých replikátov testovanej skupiny.

Starostlivosť o vajíčka do vyliahnutia

38. Oplodnené vajíčka sa priebežne premiešavajú, napr. v inkubátore na vajíčka, pomocou vzduchových bublín alebo vertikálnym nakláňaním inkubátora na vajíčka. Denne sa kontroluje a zaznamenáva mortalita oplodnených vajíčok (embryí). Mŕtve vajíčka sa z inkubátorov odstránia (dodatok 9). Na 7. deň po oplodnení sa premiešavanie zastaví alebo obmedzí, aby sa oplodnené vajíčka usadili na dne inkubátora. Tým sa podporí liahnutie, ku ktorému dôjde zvyčajne v priebehu jedného alebo dvoch nasledujúcich dní. V každej skupine s aplikovanou chemikáliou a kontrole sa spočítajú plôdiky (mladé larvy; eleuteroembryo) (zlúčia sa podľa replikátov). Oplodnené vajíčka, ktoré sa nevyliahnú za dvojnásobok mediánu dňa liahnutia v kontrole (zvyčajne 16 alebo 18 dní po oplodnení), sa považujú za neživotaschopné a vyradia sa.
39. Do každej nádrže s replikátom sa preniesie 12 plôdikov. Plôdiky z inkubačných komôr sa zoskupia a systematicky rozdelia do nádrží s replikátom (dodatok 7). Možno to uskutočniť náhodným výberom plôdika zo zlúčenej testovanej skupiny a postupným pridávaním jedného plôdika bez rozlišovania do akvária s replikátom. Každá z nádrží má obsahovať rovnaký počet ($n = 12$) vyliahnutých lariev (v každej najviac 20 lariev). Ak nie je k dispozícii dostatok plôdikov na naplnenie všetkých replikátov testovanej skupiny, odporúča sa zabezpečiť, aby sa v čo najväčšom počte replikátov nachádzalo 12 plôdikov. S plôdikmi možno bezpečne manipulovať pomocou sklenej pipety s veľkým priemerom. Všetky ďalšie plôdiky sa humánne usmrťia pomocou anestetika. Počas niekoľkých týždňov pred vytvorením chovných párov sa zaznamená deň, keď sa pri každom replikáte pozoruje prvé trenie.

Vytvorenie chovných párov

Odobratie odrezkov plutiev a stanovenie genotypového pohlavia

40. Stanovenie genotypového pohlavia prostredníctvom odrezkov plutiev sa uskutočňuje 9 až 10 týždňov po oplodnení (t. j. 12. až 13. testovací týždeň pri generácii F1). Všetkým rybám

v nádrži sa podá anestetikum (pomocou schválenej metódy, napr. IACUC) a z dorzálnej alebo ventrálnej časti chvostovej plutvy každej ryby sa odoberie malá vzorka tkaniva na určenie genotypového pohlavia jedinca (29). Ryby z replikátu sa môžu v nádrži s replikátom umiestniť do malých klieťok, pokiaľ možno jednotlivo. Prípadne možno do každej klieťky umiestniť dve ryby, ak ich možno od seba odlíšiť. Jednou možnou metódou je pri odbere vzorky tkaniva odlišne narezat' chvostovú plutvu (napr. pri jednej rybe z dorzálnej a pri druhej z ventrálnej strany).

41. Genotypové pohlavie ryžovníčky japonskej sa určuje na základe identifikovaného a sekvenovaného génu (*dmy*), ktorý sa nachádza v chromozóme Y. Prítomnosť génu *dmy* znamená, že ide o jedinca s chromozómami XY bez ohľadu na fenotyp, zatiaľ čo chýbajúci gén *dmy* znamená, že ide o jedinca s chromozómami XX bez ohľadu na fenotyp (30) (31). Z každého odrezku sa extrahuje deoxyribonukleová kyselina (DNA) a prítomnosť alebo neprítomnosť génu *dmy* možno určiť metódami polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) [pozri dodatok 9 v kapitole C.41 tejto prílohy alebo dodatok 3 a 4 v referencii (29)].

Stanovenie chovných párov

42. Pomocou informácií o genotypovom pohlaví sa vytvoria chovné páry s chromozómami XX-XY bez ohľadu na externý fenotyp, ktorý môže byť zmenený v dôsledku expozície testovanej chemikálie. Deň po stanovení genotypového pohlavia každej ryby sa náhodne vyberú dve ryby s chromozómami XX a dve ryby s chromozómami XY z každého replikátu a vytvoria sa dva chovné páry s chromozómami XX-XY. Ak sa v replikáte nenachádzajú dve ryby s chromozómami XX alebo dve ryby s chromozómami XY, vhodná ryba je potrebné získať z iných replikátov v rámci testovanej skupiny. Prioritou je mať odporúčaný počet replikovaných chovných párov (12) v každej testovanej skupine a v kontrolách (24). Pri vytváraní chovných párov sa vylúčia ryby so zrejmyými abnormalitami (problémy s plávacím mechúrom, deformity chrbtice, mimoriadne odlišnosti vo veľkosti atď.). Počas reprodukčnej fázy generácie F1 obsahuje každá nádrž s replikátom len jeden chovný pár.

Odber vzoriek rýb pred dosiahnutím dospelosti a posúdenie sledovaných parametrov

Odber vzoriek rýb, ktoré nepatria do chovných párov

43. Po vytvorení chovných párov sa ryby, ktoré nie sú vybraté na ďalší chov, humánne usmrtia na účely merania sledovaných parametrov pred dosiahnutím dospelosti v 12. – 13. testovacím týždni (F1). Je mimoriadne dôležité, aby sa s týmito rybami zaobchádzalo tak, aby bolo možné k jednotlivým rybám priradiť genotypové pohlavie určené na účely výberu chovného páru. Všetky získané údaje sa analyzujú v kontexte genotypového pohlavia

konkrétnej ryby. Každá ryba sa používa na merania rôznych sledovaných parametrov vrátane: stanovenia miery prežitia mladých rýb/rýb pred dosiahnutím dospelosti [7. – 12/13. testovací týždeň (F1)], rastu do dĺžky (štandardnú dĺžku možno merať, ak sa skrátila chvostová plutva v dôsledku odberu vzoriek na analýzu genetického pohlavia. Celkovú dĺžku možno merať, ak sa na stanovenie génu *dmy* použila len časť chvostovej plutvy, dorzálna alebo ventrálna) a telesnej hmotnosti (t. j. vlhká hmotnosť, vysušené do sucha), pečenej hodnoty mRNA *vtg* (alebo VTG) a papíl análnej plutvy (pozri tabuľky 1 a 2). Na výpočet priemerného rastu v testovanej skupine sú potrebné aj hmotnosti a dĺžky chovných párov.

Odber vzoriek tkaniva a meranie vitelogenínu

44. Vykoná sa pitva pečene a pečeň sa uloží pri teplote $\leq -70\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do uskutočnenia meraní mRNA *vtg* (alebo VTG). Chvost ryby vrátane análnej plutvy sa uchová vo vhodnom fixačnom prostriedku (napr. Davidsonovom) alebo sa odfotografuje tak, aby bolo možné neskôr spočítať papily análnej plutvy. V prípade potreby sa v tomto čase môže odobrať a zakonzervovať vzorka iných tkanív (t. j. gonády). Koncentrácia VTG v pečeni sa má kvantifikovať pomocou homológnej techniky ELISA (pozri odporúčané postupy pre ryžovníčku japonskú v dodatku 6 v kapitole C.48 tejto prílohy). Prípadne existujú metódy na kvantifikáciu mRNA *vtg*, t. j. na extrakciu mRNA génu *vtg I* zo vzorky pečene a kvantifikáciu počtu kópií génu *vtg I* (na ng celkovej mRNA) pomocou kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie, ktoré stanovila Agentúra Spojených štátov na ochranu životného prostredia (29). Namiesto stanovenia počtu kópií génu *vtg* v kontrolných a testovaných skupinách možno pomocou metódy, ktorá je menej náročná z hľadiska zdrojov a má nižšiu technickú náročnosť, stanoviť relatívnu (násobnú) zmenu expresie *vtg I* z kontrolných a testovaných skupín.

Sekundárne pohlavné znaky

45. Za normálnych okolností len pohlavne dospelé samce ryžovníčky japonskej majú papily, ktoré sa vyvíjajú na spojených platničkách určitých lúčov análnej plutvy ako sekundárne pohlavné znaky, čím slúžia ako potenciálny biologický marker účinkov narúšajúcich endokrinný systém. Metóda na určenie počtu papíl análnej plutvy (počtu spojených platničiek s papilami) sa uvádza v dodatku 8. Na účely výpočtu jednoduchého pomeru pohlaví na replikát možno jedince kategorizovať ako samce alebo samice z hľadiska externého fenotypu aj na základe počtu papíl análnej plutvy na jedinca. Ryžovníčka japonská s akýmkoľvek počtom papíl análnej plutvy väčším ako nula sa považuje za samca a jedinec s nulovým počtom papíl análnej plutvy sa považuje za samicu.

Posúdenie plodivosti a fertility

46. Plodivosť a fertilita sa posudzujú v 1. až 3. testovacom týždni v generácii F0 a v 15. až 17. testovacom týždni v generácii F1. Počas 21 za sebou nasledujúcich dní sa odoberajú vajíčka od každého chovného páru. Vajíčka sa každé ráno opatrne odoberú od samíc zachytených v sieťach a/alebo sa odsajú z dna akvária. Pri každom chovnom páre v jednotlivých replikátoch sa denne zaznamenáva plodivosť a fertilita. Plodivosť sa vymedzuje ako počet vajíčok nakladených pri trení a fertilita sa funkčne vymedzuje ako počet oplodnených a životaschopných vajíčok v čase počítania. Spočítanie sa má uskutočniť čo najskôr po odbere vajíčok.
47. Plodivosť replikátu sa zaznamenáva denne ako počet vajíčok na chovný pár, ktorý sa analyzuje odporúčanými štatistickými postupmi na základe priemerov replikátov. Fertilita replikátu je súčet počtu oplodnených vajíčok vyprodukovaných chovným párom, ktorý sa vydelením súčtu počtu vajíčok vyprodukovaných daným párom. Štatisticky sa fertilita analyzuje ako pomer na replikát. Liahnivosť replikátu je podiel počtu plôdikov a počtu nasadených embryí (zvyčajne 20). Štatisticky sa liahnivosť analyzuje ako pomer na replikát.

Odber vzoriek dospelých rýb a posúdenie sledovaných parametrov

Odber vzoriek rýb, ktoré patria do chovných párov

48. Po 17. testovacom týždni (t. j. po tom, ako sa úspešne začala generácia F2) sa dospelé ryby z generácie F1 humánne usmrtia a vyhodnotia sa rôzne sledované parametre (pozri tabuľky 1 a 2). Vytvorí sa obrazový záznam análnej plutvy na posúdenie papíl análnej plutvy (pozri dodatok 8) a/alebo sa chvost priamo za močopohlavným otvorom odstráni a zafixuje, aby bolo možné neskôr stanoviť počet papíl. V tomto čase možno odobrať a archivovať vzorku časti chvostovej plutvy, aby bolo v prípade potreby možné overiť genetické pohlavie (*dmy*). V prípade potreby sa môže odobrať vzorka tkaniva na účely zopakovania analýzy *dmy*, aby bolo možné overiť genetické pohlavie konkrétnej ryby. Pred ponorením celého tela do vhodného fixačného prostriedku (napr. Davidsonov fixačný prostriedok) sa telová dutina otvorí, aby bola možná perfúzia pomocou daného fixačného prostriedku. Ak sa však pred fixáciou vykoná vhodný krok na zabezpečenie priepustnosti, nie je potrebné otvorenie telovej dutiny.

Histopatológia

49. Každá ryba sa histologicky posudzuje z hľadiska výskytu patologických javov v gonadálnom tkanive (30) (29). Ako sa uvádza v odseku 33, na ostatné mechanistické sledované parametre vyhodnocované v rámci tejto skúšky (t. j. VTG, sekundárne pohlavné

znaky a určité gonadálne účinky z hľadiska histopatológie) môže mať vplyv systémová toxicita alebo iné toxicity. Následne možno podrobne posúdiť aj histopatológiu pečene a obličky s cieľom lepšie porozumieť reakciám pri mechanistických sledovaných parametroch. Ak sa však tieto podrobné hodnotenia neuskutočnia, je potrebné zaznamenať a uviesť v správe výrazné abnormality, ktoré sa mimochodom zistia počas histopatologického hodnotenia. Je možné zvážiť postup smerom k nižším úrovniam, a to od testovanej skupiny s najvyššou dávkou (v porovnaní s kontrolou) po testovanú skupinu s dávkou nespôsobujúcou žiadny účinok, odporúča sa však zohľadniť usmernenie v oblasti histopatológie (29). Všetky vzorky sa zvyčajne spracujú/pripravajú sa z nich rezy a ďalej ich vyhodnocuje patológ. Ak sa použije prístup založený na postupe smerom k nižším úrovniam, je potrebné uviesť, že pri postupe RSCABS (Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices) sa vychádza z očakávania, že so zvyšujúcimi sa úrovňami dávky sa bude zvyšovať aj biologický účinok (patologický jav). Pri skúmaní len jednej vysokej dávky bez medziľahlých dávok tak nebude možné dosiahnuť dostatočnú štatistickú váhu. Ak na stanovenie toho, že táto vysoká dávka nemá žiaden účinok, nie je potrebná štatistická analýza, môže byť tento prístup prijateľný. Z tohto hodnotenia sa odvodzuje aj gonádový fenotyp.

Ďalšie pozorovania

50. Na základe testu MEOGRT sa získavajú údaje, pomocou ktorých možno súčasne vyhodnotiť (napr. v analýze váhy dôkazov) aspoň dva všeobecné typy dráh nepriaznivého účinku (AOP), ktoré vedú k reprodukčnej poruche: a) dráhy sprostredkované endokrinným systémom zahŕňajúce narušenie endokrinnnej osi hypotalamus – hypofýza – gonády (HPG) a b) dráhy, ktoré spôsobujú zníženie prežívania, rastu (dĺžka a hmotnosť) a reprodukcie prostredníctvom toxicity nesprostredkovanej endokrinným systémom. Súčasťou tohto testu sú aj sledované parametre, ktoré sa zvyčajne merajú v testoch chronickej toxicity, ako je test úplného životného cyklu a test skorých štádií života, a možno ich použiť na posúdenie nebezpečenstva, ktoré predstavujú spôsoby toxického účinku nesprostredkované endokrinným systémom aj dráhy toxicity sprostredkovanej endokrinným systémom. Počas testu sa denne uskutočňujú pozorovania správania a akékoľvek nezvyčajné správanie sa zaznamená. Okrem toho sa zaznamená mortalita a vypočíta sa miera prežitia po selekcii rýb (6./7. testovací týždeň), miera prežitia od selekcie po odber vzoriek jedincov pred dosiahnutím dospelosti (9 – 10 týždňov po oplodnení) a miera prežitia od vytvorenia párov po výber vzorky dospelých rýb.

Tabuľka 1: Prehľad sledovaných parametrov testu MEOGRT*

Vývojové	Sledovaný parameter	Generácia
----------	---------------------	-----------

štádium		
embryo (2 týždne po oplodnení)	liahnutie (% a čas do liahnutia)	F1, F2
mladý jedinec (4 týždne po oplodnení)	miera prežitia	F1
jedinec pred dosiahnutím dospelosti (9 alebo 10 týždňov po oplodnení)	miera prežitia	F1
	rast (dĺžka a hmotnosť)	
	vitelogenín (mRNA alebo bielkovina)	
	sekundárne pohlavné znaky (papily análnej plutvy)	
	pomer pohlaví z externého hľadiska	
	čas do prvého trenia	
dospelý jedinec (12 – 14 týždňov po oplodnení)	rozmnožovanie (plodivosť a fertilita)	F0, F1
dospelý jedinec (15 týždňov po oplodnení)	miera prežitia	F1
	rast (dĺžka a hmotnosť)	
	Sekundárne pohlavné znaky (papily análnej plutvy)	
	Histopatológia (gonáda, pečeň, oblička)	

*Tieto sledované parametre sa majú štatisticky analyzovať

HARMONOGRAM

51. Test je uvedený v harmonograme testu MEOGRT znázornenom v tabuľke 2. Súčasťou testu MEOGRT sú 4 týždne expozície dospelých jedincov generácie F0 a 15 týždňov expozície jedincov generácie F1, ako aj obdobie expozície druhej generácie (F2) až do vyliahnutia (2 týždne po oplodnení). Súhrn činností v priebehu testu MEOGRT sa uvádza v dodatku 9.

Tabuľka 2: Harmonogram expozície a merania sledovaných parametrov v teste MEOGRT.

Harmonogram expozície a sledovaných parametrov v teste MEOGRT																				
F0	1	2	3	4																
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
F2																		1	2	
Testovací	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
Označenie vývojového štádia					embryo				larva				mladý jedinec				jedinec pred dosiahnutím		dospelý jedinec	
Sledované parametre																				
plodivosť	F ₀														F ₁					
plodnosť	F ₀														F ₁					
liahnutie					F ₁														F ₂	
miera prežitia						F ₁						F ₁						F ₁		
rast				F ₀								F ₁						F ₁		
vitelogenín												F ₁								
sekundárne pohlavné znaky												F ₁						F ₁		
histopatológia																		F ₁		
Testovací týždeň	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
V koncepcii pokusu sa používa 7 skupín replikátov ○ 5 pre skupiny s aplikovanou chemikáliou ○ 2 pre kontrolné skupiny (4 v prípade použitia rozpúšťadla) Koncepcia v rámci skupiny ○ 12 replikátov na účely reprodukcie, patológie dospelých jedincov a sekundárnych pohlavných znakov (10. až 18 týždeň) ○ 6 replikátov na účely liahnutia, miery prežitia, Vtg a, pri jedincoch pred dosiahnutím dospelosti, sekundárnych pohlavných znakov a rastu (1. až 9. týždeň) Vtg: vitelogenín																				

- V koncepcii pokusu sa používa 7 skupín replikátov
 - 5 pre skupiny s aplikovanou chemikáliou
 - 2 pre kontrolné skupiny (4 v prípade použitia rozpúšťadla)
 - Koncepcia v rámci skupiny
 - 12 replikátov na účely reprodukcie, patológie dospelých jedincov a sekundárnych pohlavných znakov (10. až 18 týždeň)
 - 6 replikátov na účely liahnutia, miery prežitia, Vtg a, pri jedincoch pred dosiahnutím dospelosti, sekundárnych pohlavných znakov a rastu (1. až 9. týždeň)
- Vtg: vitelogenín

PREZENTOVANIE ÚDAJOV

Štatistická analýza

52. Keďže sa genotypové pohlavie určuje pre všetky testované ryby, údaje je potrebné analyzovať samostatne z hľadiska každého genotypového pohlavia (t. j. samce XY a samice XX). V opačnom prípade sa výrazne zníži štatistická váha analýzy. Pri štatistických analýzach údajov by sa podľa možnosti malo vychádzať z postupov uvedených v dokumente OECD Súčasné prístupy k štatistickej analýze údajov o ekotoxícite: usmernenie k uplatňovaniu (32). V dodatku 10 sa uvádza ďalšie usmernenie k štatistickej analýze.

53. Koncepcia testu a výber štatistických testov by mali poskytovať dostatočnú váhu na detekciu zmien biologického významu v sledovaných parametroch, pri ktorých sa má uvádzať hodnota NOEC (32). Uvedenie príslušných účinných koncentrácií a parametrov

môže závisieť od regulačného rámca. Je potrebné identifikovať percentuálnu zmenu v každom sledovanom parametri, ktorú je dôležité zistiť alebo odhadnúť. Koncepcia pokusu by sa mala prispôbiť tak, aby to bolo možné. Nie je pravdepodobné, že rovnaká percentuálna zmena bude platiť pre všetky sledované parametre, a nie je pravdepodobné ani to, že sa podarí navrhnuť uskutočniteľný pokus, ktorý bude spĺňať tieto kritériá pre všetky sledované parametre, preto je v záujme správneho naplánovania pokusu dôležité zamerať sa na sledované parametre, ktoré sú dôležité pre daný pokus. V dodatku 10 je k dispozícii štatistický vývojový diagram a usmernenie s cieľom pomôcť pri spracovaní údajov a pri výbere najvhodnejšieho štatistického testu alebo modelu, ktorý sa použije. Možno použiť aj iné štatistické prístupy za predpokladu, že sú vedecky podložené.

54. V každom súbore replikátov bude potrebné analyzovať variabilitu použitím analýzy rozptylu alebo kontingenčnej tabuľky a na základe tejto analýzy použiť dostatočne vhodné metódy štatistickej analýzy. Na to, aby bolo možné mnohonásobné porovnávanie medzi výsledkami pre jednotlivé koncentrácie a pre kontroly, sa pri spojitých reakciách odporúča postup na základe trendu (napr. Jonckheerov-Terpstrov test trendu). V prípade, že údaje nezodpovedajú monotónnej závislosti reakcie od koncentrácie, mal by sa použiť Dunnettov alebo Dunnov test (podľa potreby po vhodnej transformácii údajov).
55. Z hľadiska plodivosti sa počty vajíčok zaznamenávajú denne, ale možno ich analyzovať ako celkové počty vajíčok alebo ako opakované meranie. V dodatku 10 sa uvádzajú podrobnosti o spôsobe analýzy tohto sledovaného parametra. Pre histopatologické údaje, ktoré sú v podobe skóre závažnosti, bol vytvorený nový štatistický test RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) (33).
56. Je potrebné uviesť všetky sledované parametre pozorované v testovaných skupinách s aplikovaním testovanej chemikálie, ktoré sa významne líšia od príslušných kontrol.

Úvahy v súvislosti s analýzou údajov

Používanie úrovní narušenia skupiny s určitou koncentráciou chemikálie

57. Pri rozhodovaní, či replikát alebo celá skupina s určitou koncentráciou chemikálie vykazuje zjavnú toxicitu a mala by sa vylúčiť z analýzy, sa zohľadňuje viacero faktorov. Zjavná toxicita je vymedzená > 4 mortalitami v ktoromkoľvek z replikátov v období od 3 do 9 týždňov po oplodnení, ktoré nemožno vysvetliť technickou chybou. Iné príznaky zjavnej toxicity zahŕňajú krvácanie, abnormálne správanie, abnormálne vzory plávania, anorexiu a akékoľvek iné klinické známky choroby. V prípade subletálnych toxických príznakov môžu byť potrebné kvalitatívne hodnotenia, ktoré by sa vždy mali vykonať

porovnaním s kontrolnou skupinou s vodou na riedenie (len čistá voda). Ak sa zjavná toxicita vyskytuje pri testovaných skupinách s najvyššou dávkou, odporúča sa, aby sa tieto skupiny vylúčili z analýzy.

Kontroly s aplikáciou rozpúšťadla

58. O použití rozpúšťadla by sa malo uvažovať až ako o poslednej možnosti, ak sa zvažili všetky ostatné možnosti aplikovania chemikálie. Ak sa použije rozpúšťadlo, mala by sa zároveň vykonať analýza kontroly s vodou na riedenie. Po skončení testu by sa malo vykonať hodnotenie potenciálnych vplyvov rozpúšťadla. To sa dosiahne štatistickým porovnaním kontrolnej skupiny s aplikáciou rozpúšťadla a kontrolnej skupiny s vodou na riedenie. Medzi najrelevantnejšie sledované parametre na posúdenie v rámci tejto analýzy patria faktory rastu (hmotnosť), keďže na ne môžu mať vplyv celkové toxicity. Ak sa zistia štatisticky významné rozdiely v týchto sledovaných parametroch medzi kontrolnou skupinou s vodou na riedenie a kontrolnou skupinou s aplikáciou rozpúšťadla, je potrebné na základe najlepšieho odborného úsudku určiť, či nedošlo k narušeniu platnosti testu. Ak sa tieto dve kontroly líšia, testované skupiny vystavené chemikálii sa majú porovnať s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla, pokiaľ nie je známe, že sa uprednostňuje porovnanie s kontrolou s vodou na riedenie. Ak neexistuje štatisticky významný rozdiel medzi týmito dvomi kontrolnými skupinami, odporúča sa, aby sa testované skupiny vystavené testovanej chemikálii porovnali so zoskupenými kontrolami (kontrolné skupiny s aplikáciou rozpúšťadla a s vodou na riedenie), pokiaľ nie je známe, že sa uprednostňuje porovnanie buď len s kontrolnou skupinou s vodou na riedenie, alebo len s kontrolnou skupinou s aplikáciou rozpúšťadla.

Správa o teste

59. Správa o teste obsahuje tieto informácie:

Testovaná chemikália: fyzikálny charakter a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti,

- údaje na identifikáciu chemikálie.

Jednozložkové látky:

- fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

- identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď. (vrátane obsahu organického uhlíka, ak to je vhodné).

Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

- charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek.

Testovaný druh:

- vedecký názov, kmeň, ak je dostupný, zdroj a metóda zberu oplodnených vajíčok a následnej manipulácie.

Podmienky testu:

- fotoperiódou,
- koncepcia testu (napr. veľkosť a materiál komory a objem vody, počet testovacích komôr a replikátov, počet plôdikov na replikát),
- metóda prípravy zásobných roztokov a frekvencia obnovy (ak bol použitý solubilizačný prostriedok, mal by sa uviesť spolu s jeho koncentráciou),
- metóda dávkovania testovanej chemikálie (napr. čerpadlá, riediace systémy),
- miera výťažnosti metódy a nominálne testované koncentrácie, kvantifikačný limit, priemery nameraných hodnôt a ich štandardné odchýlky v testovacích nádobách a metóda, ktorou boli dosiahnuté, a dôkaz, že sa namerané hodnoty týkajú koncentrácií testovanej chemikálie v skutočnom roztoku,
- vlastnosti vody na riedenie: pH, tvrdosť vody, teplota, koncentrácia rozpusteného kyslíka, úroveň zvyškového chlóru (ak boli merané), celkový obsah organického uhlíka (ak bol meraný), nerozpustené pevné látky (ak boli merané), salinita v testovacom médiu (ak bola meraná) a akékoľvek iné vykonané merania,
- nominálne testované koncentrácie, priemery nameraných hodnôt a ich štandardné odchýlky,
- kvalita vody v testovacích nádobách: pH, teplota (meraná denne) a koncentrácia rozpustného kyslíka,
- podrobné informácie o kŕmení (napr. druh potravy, zdroj, dávkované množstvo a frekvencia).

Výsledky:

- dôkaz, že kontroly splnili celkové kritériá validity,
 - tieto údaje týkajúce sa kontroly (vrátane kontroly s aplikáciou rozpúšťadla, ak sa použila) a testovaných skupín: liahnutie (liahnivosť a čas do vyliahnutia) v generáciách F1 a F2, miera prežitia po vyliahnutí v generácii F1, rast (dĺžka a telesná hmotnosť) v generácii F1, genotypové pohlavie a pohlavná diferenciácia (napr. sekundárne pohlavné znaky na základe papíl análnej plutvy a gonadálnej histológie) v generácii F1, fenotypové pohlavie v generácii F1, sekundárne pohlavné znaky (papily análnej plutvy) v generácii F1, mRNA *vtg* (alebo bielkovina VTG) v generácii F1, histopatologické posúdenie (gonáda, pečeň a oblička) v generácii F1 a reprodukcia (plodivosť a fertilita) v generácii F0, F1 (pozri tabuľky 1 a 2),
 - prístup uplatnený pri štatistickej analýze (regresná analýza alebo analýza rozptylu) a spracovaní údajov (použitie štatistické testy alebo modely),
 - koncentrácia bez pozorovaného účinku (NOEC) pre každú posudzovanú reakciu,
 - najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom (LOEC) (pri $p = 0,05$) pre každú posudzovanú reakciu; v prípade potreby hodnota EC_x pre každú posudzovanú reakciu vrátane intervalov spoľahlivosti (napr. 90 % alebo 95 %) a grafu zavedeného modelu použitého na jej výpočet, sklon krivky závislosti veličiny od koncentrácie, vzorec regresného modelu, odhadované parametre modelu a ich štandardné chyby,
 - akákoľvek odchýlka od tejto testovacej metódy a odchýlky od kritérií prijateľnosti a úvahy o možných dôsledkoch v súvislosti s výsledkom testu.
60. V prípade výsledkov merania sledovaných parametrov sa uvádzajú priemerné hodnoty a ich štandardné odchýlky (na základe replikátov aj koncentrácií, ak je to možné).

LITERATURA

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

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

- (19) Gormley K and Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 330 – 338.
- (20) Kapitola C.15 tejto prílohy, Ryby, krátkodobý test toxicity na embryách a vývojovom štádiu plodového vaku.
- (21) Kapitola C.37 tejto prílohy, 21-dňový test na rybách: Krátkodobý skrining estrogénneho a androgénneho pôsobenia a inhibícia aromatázy.
- (22) Kapitola C.41 tejto prílohy, Test pohlavného vývinu rýb.
- (23) Kapitola C.48 tejto prílohy, Krátkodobý reprodukčný test na rybách.
- (24) Kapitola C.47 tejto prílohy, Test toxicity v ranom štádiu vývoja rýb.
- (25) Kapitola C.49 tejto prílohy, Test akútnej toxicity na rybích embryách (FET).
- (26) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. *Chemosphere* 92: 1067 – 1076.
- (27) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50: 301 – 308.
- (28) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (29) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Scharl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. *Genetics* 163: 245 – 251.
- (30) Shinomiya, A, Otake H, Togashi K, Hamaguchi S and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, *Zoological Science* 21: 613 – 619.
- (31) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

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

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Chemikália: látka alebo zmes.

ELISA: enzýmové imunosorbentové stanovenie.

Plodivosť = počet vajíčok.

Fertilita = počet životaschopných vajíčok/plodivosť.

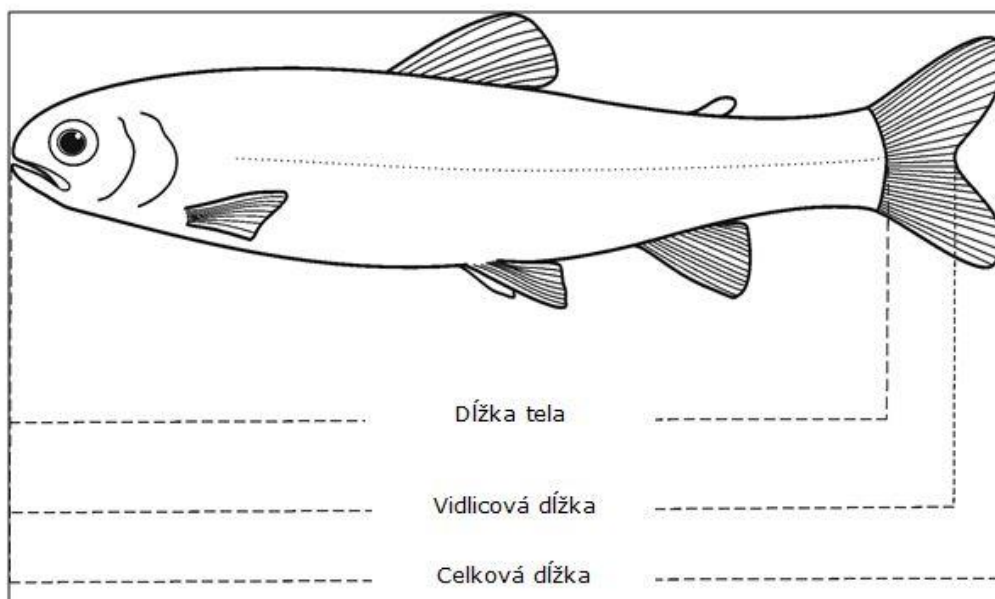
Vidlicová dĺžka (FL) označuje dĺžku od špičky rypáka po koniec stredných lúčov chvostových plutiev a používa sa pri rybách, pri ktorých je ťažké rozoznať, kde sa končí chrbtica (www.fishbase.org).

Liahnivosť = počet plôdikov/počet embryí nasadených do inkubátora.

IACUC: Výbor pre inštitucionálnu starostlivosť o zvieratá a ich používanie.

Dĺžka tela (SL) označuje dĺžku ryby meranú od špičky rypáka po zadný koniec posledného stavca alebo po zadný koniec stredu bočnej časti hypurálnej kosti. Jednoducho povedané, v tomto rozmere nie je zahrnutá dĺžka chvostovej plutvy. (www.fishbase.org)

Celková dĺžka (TL) označuje dĺžku od špičky rypáka po koniec dlhšieho laloka chvostovej plutvy, spravidla meranú s lalokmi stlačenými pozdĺž stredovej čiary. Meria sa dĺžka priamky, teda nie so zakrivením tela (www.fishbase.org).



Obrázok 1: Opis rôznych používaných dĺžok

EC_x: (účinná koncentrácia pre x % účinok) je koncentrácia, ktorá počas daného obdobia expozície vyvolá x % účinok na testované organizmy v porovnaní s kontrolnou skupinou. Napríklad EC₅₀ je koncentrácia, pri ktorej sa odhaduje, že počas vymedzeného obdobia expozície vyvolá účinok na sledovaný ukazovateľ testu v 50 % exponovanej populácie.

Prietokový test je test s neustálym prietokom testovaných roztokov cez testovací systém počas trvania expozície.

Os HPG: os hypothalamus – hypofýza – gonády.

IUPAC: Medzinárodná únia pre čistú a aplikovanú chémiu.

Veľkosť násady: vlhká hmotnosť rýb na objem vody.

Najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom (LOEC) je najnižšia testovaná koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej je účinok chemikálie štatisticky významný (pri $p < 0,05$) v porovnaní s kontrolou. Škodlivý účinok všetkých testovaných koncentrácií vyšších ako hodnota LOEC by však mal byť rovnaký alebo väčší ako účinky pozorované pri hodnote LOEC. Ak nie sú splnené tieto dve podmienky, je potrebné poskytnúť úplné vysvetlenie, akým spôsobom sa zvolila hodnota LOEC (a teda aj NOEC). Usmernenie sa uvádza v dodatkoch 5 a 6.

Stredná letálna koncentrácia (LC₅₀): predstavuje koncentráciu testovanej chemikálie,

ktorá sa odhadne ako letálna pre 50 % testovaných organizmov počas trvania testu.

Koncentrácia bez pozorovaného účinku (NOEC) je testovaná koncentrácia chemikálie ihneď pod LOEC, ktorá pri porovnaní s kontrolou nemá štatisticky významný účinok ($p < 0,05$) počas daného obdobia expozície.

SMILES: zjednodušený systém zadávania molekulárnych štruktúr.

Chovná hustota: počet rýb na objem vody.

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

VTG: vitelogenín. Je to fosfolipoglykoproteín, slúžiaci ako prekursor proteínov vaječného žltka, ktorý sa normálne vyskytuje v telách pohlavne aktívnych samíc všetkých vajcorodých druhov.

WPF: týždne po oplodnení.

Dodatok 2**NIEKTORÉ CHEMICKÉ VLASTNOSTI VODY VHODNEJ NA RIEDENIE**

Látka	Koncentračný limit
Tuhé častice	5 mg/l
Celkový obsah organického uhlíka	2 mg/l
Neionizovaný amoniak	1 µg/l
Zvyškový chlór	10 µg/l
Celkový obsah organofosforových pesticídov	50 ng/l
Celkový obsah organochlórových pesticídov a polychlórovaných bifenylov	50 ng/l
Celkový obsah organického chlóru	25 ng/l
Hliník	1 µg/l
Arzén	1 µg/l
Chróm	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Meď	1 µg/l
Železo	1 µg/l
Olovo	1 µg/l
Nikel	1 µg/l
Zinok	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Ortuť	100 ng/l
Striebro	100 ng/l

Dodatok 3**PODMIENKY TESTU MEOGRT**

- | | |
|---|---|
| 1. Odporúčaný druh | ryžovníčka japonská (<i>Oryzias latipes</i>) |
| 2. Typ testu | s nepretržitým prietokom |
| 3. Teplota vody | Nominálna testovacia teplota je 25 °C. Priemerná teplota v každej nádrži počas celého testu je 24 – 26 °C. |
| 4. Kvalita osvetlenia | Fluorescenčné svietidlá (so širokým spektrom a dosahujúce ~150 lúmenov/m ²) (~150 luxov).

16 hodín svetla a 8 hodín tmy |
| 6. Veľkosť násady | F0: 2 dospelé jedince/replikát; F1: začína sa maximálne s 20 vajíčkami (embryami)/replikát, so znížením na 12 embryí/replikát pri vyliahnutí, potom 2 dospelé jedince (chovný pár s chromozómami XX-XY) 9 – 10 týždňov po oplodnení v reprodukčnej fáze |
| 7. Minimálny využiteľný objem testovacej komory | 1,8 l (napr. rozmery testovacej komory: 18 × 9 × 15 cm) |
| 8. Výmeny objemu testovaných roztokov | od minimálne 5 obnovení objemu/deň do 16 obnovení objemu/deň (alebo prietok do 20 ml/min.) |
| 9. Vek testovaných organizmov na začiatku | F0: > 12 týždňov po oplodnení, odporúča sa však neprekročiť 16 týždňov po oplodnení |
| 10. Počet organizmov na replikát | F0: 2 ryby (pár samec – samica); F1: maximálne 20 rýb (vajíček)/replikát (získané z chovných párov v generáciách F0 a F1). |
| 11. Počet testovaných skupín | 5 skupín s aplikovanou testovanou chemikáliou plus príslušné kontroly |
| 12. Počet replikátov na testovanú skupinu | minimálne 6 replikátov na skupinu s aplikovanou chemikáliou a minimálne 12 na kontrolu a na kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla, ak sa používa (v reprodukčnej fáze generácie F1 sa počet replikátov zdvojnásobuje) |
| 13. Počet organizmov na test | minimálne 84 rýb v generácii F0 a 504 v generácii F1. (Ak sa používa kontrola s aplikáciou rozpúšťadla, počet rýb v generácii F0 je 108 a v generácii F1 je 648.) Počítaná jednotka predstavuje štádium po eleuteroembryu. |

14. Kŕmny režim	Ryby sa kŕmia žiabronôžkou soľnou rodu <i>Artemia</i> (24-hodinové naupliá) <i>ad libitum</i> , pričom sa táto potrava podľa potreby dopĺňa komerčne dostupným vločkovým krmivom (príklad harmonogramu kŕmenia na zabezpečenie primeraného rastu a vývoja a podporu spoľahlivej reprodukcie sa nachádza v dodatku 6).
15. Prevzdušňovanie	žiadne, pokiaľ sa koncentrácia rozpusteného kyslíka nebude blížiť k $< 60 \%$ hodnoty rozpustnosti vzdušného kyslíka
16. Voda na riedenie	čistá povrchová, studňová alebo rekonštituovaná voda alebo odchlórovaná voda z vodovodu
17. Obdobie expozície	primárne 19 týždňov (od generácie F0 po vyľiahnutie generácie F2)
18. Biologické sledované parametre (primárne)	liahnivosť (F1 a F2); miera prežitia [F1, od vyľiahnutia do 4 týždňov po oplodnení (koniec štádia larvy/začiatok štádia mladej ryby), od 4 do 9 (alebo 10) týždňov po oplodnení (od začiatku štádia mladej ryby po štádium ryby pred dosiahnutím dospelosti) a od 9 do 15 týždňov po oplodnení (štádium pred dosiahnutím dospelosti až po usmrtenie dospelej ryby)]; rast (F1, dĺžka a hmotnosť 9 a 15 týždňov po oplodnení); sekundárne pohlavné znaky (F1, papily análnej plutvy 9 a 15 týždňov po oplodnení); vitelogenín (F1, mRNA <i>vtg</i> alebo bielkovina VTG 15 týždňov po oplodnení); fenotypové pohlavie (F1, prostredníctvom histológie gonády 15 týždňov po oplodnení); reprodukcia (F0 a F1, plodivosť a fertilita počas 21 dní); čas do trenia (F1) a histopatológia (F1, gonáda, pečeň a oblička 15 týždňov po oplodnení)
19. Kritériá platnosti testu	Koncentrácia rozpusteného kyslíka $\geq 60 \%$ hodnoty rozpustnosti vzdušného kyslíka; priemerná teplota vody počas celého testu 24 – 26 °C; úspešná reprodukcia $\geq 65 \%$ samičiek v kontrolách; priemerná denná plodivosť ≥ 20 vajíčok v kontrolách; liahnivosť $\geq 80 \%$ (priemer) v kontrolách (v každej z generácií F1 a F2); miera prežitia po vyľiahnutí do 3 týždňov po oplodnení $\geq 80 \%$ (priemer) a od 3 týždňov po oplodnení do usmrtenia v rámci danej generácie $\geq 90 \%$ (priemer) v kontrolách (F1), koncentrácie testovanej chemikálie v roztoku sa majú uspokojivo udržiavať v rozsahu $\pm 20 \%$ priemerných nameraných hodnôt.

Dodatok 4

USMERNENIE K TYPICKÝM HODNOTÁM KONTROL

Je potrebné poznamenať, že hodnoty týchto kontrol vychádzajú z obmedzeného počtu validačných štúdií a môžu podliehať zmenám na základe ďalších skúseností.

Rast

Hmotnosť a dĺžka sa merajú pri všetkých rybách vybratých do vzorky 9 (alebo 10) a 15 týždňov po oplodnení. Pri postupe podľa tohto protokolu sa dosiahne 9 týždňov po oplodnení očakávaná vlhká hmotnosť 85 – 145 mg pri samcoch a 95 – 150 mg pri samiciach. Očakávaná hmotnosť 15 týždňov po oplodnení je 250 – 330 mg pri samcoch a 280 – 350 mg pri samiciach. Hoci pri jednotlivých rybách môžu existovať značné odchýlky od týchto rozsahov, priemerné hmotnosti kontrol, ktoré by boli výrazne mimo týchto rozsahov, najmä ak by boli pod spodnou hranicou, by naznačovali problémy v súvislosti s kŕmením, riadením teploty, kvalitou vody, chorobami alebo kombináciu týchto faktorov.

Liahnutie

Úspešnosť liahnutia v kontrolách je zvyčajne okolo 90 %, nie sú však zriedkavé ani hodnoty dosahujúce len 80 %. Úspešnosť liahnutia nižšia ako 75 % môže naznačovať nedostatočné premiešavanie vyvíjajúcich sa vajíčok alebo nedostatočnú starostlivosť pri manipulácii s vajíčkami, napríklad ak sa včas neodstraňujú mŕtve vajíčka, čo vedie k napadnutiu hubami.

Miera prežitia

Miery prežitia od vyliahnutia do 3 týždňov po oplodnení a po 3 týždňoch po oplodnení sú v prípade kontrol zvyčajne 90 % alebo viac, v skorých štádiách života však ani miery prežitia dosahujúce v prípade kontrol len 80 % nepredstavujú dôvod na znepokojenie. Miery prežitia nižšie ako 80 % by v prípade kontrol boli dôvodom na obavy a môžu naznačovať nedostatočné čistenie akvárií, čo vedie k stratám rýb v larválnom štádiu v dôsledku chorôb alebo udusení z dôvodu nízkych úrovní rozpusteného kyslíka. K mortalite môže dôjsť aj v dôsledku zranenia počas čistenia nádrže alebo stratou rýb v larválnom štádiu cez odtokový systém nádrže.

Gén vitelogenínu

Zatiaľ čo sa absolútne úrovne génu *vitelogenínu* (*vgt*), vyjadrené ako počet kópií/ng celkovej mRNA, môžu medzi laboratóriami výrazne líšiť v dôsledku použitých postupov alebo prístrojového vybavenia, pomer *vgt* má byť pri kontrolných samiciach približne

dvestokrát vyšší v porovnaní s kontrolnými samcami. Nie je nezvyčajné, ak tento pomer dosahuje 1 000- až 2 000-násobok, pomery nižšie ako 200 sú však podozrivé a môžu naznačovať problémy s kontamináciou vzorky alebo problémy s postupom a/alebo použitými reagentmi.

Sekundárne pohlavné znaky

Normálny rozsah sekundárnych pohlavných znakov, ktorý sa vymedzuje ako celkový počet segmentov v plutvových lúčoch papíl análnej plutvy, v prípade samcov predstavuje 40 – 80 segmentov 9 – 10 týždňov po oplodnení. 15 týždňov po oplodnení má byť tento počet v rozsahu 80 – 120 v prípade kontrolných samcov a 0 v prípade kontrolných samíc. Z nevysvetliteľných dôvodov dochádza v zriedkavých prípadoch k tomu, že pri niektorých samcoch nie sú 9 týždňov po oplodnení prítomné papily, ale keďže sa papily vyvinú pri všetkých kontrolných samcoch do 15. týždňa po oplodnení, je to s najväčšou pravdepodobnosťou spôsobené oneskoreným vývojom. Prítomnosť papíl pri kontrolných samiciach naznačuje, že sa v populácii vyskytujú samce s chromozómami XX.

Samce s chromozómami XX

Bežný všeobecný výskyt samcov s chromozómami XX v rámci kultúry je zvyčajne približne 4 % alebo menej pri teplote 25 °C, pričom miera výskytu sa zvyšuje pri vyššej teplote. Je potrebné vykonať kroky s cieľom minimalizovať podiel samcov s chromozómami XX v populácii. Keďže sa zdá, že pri výskyte samcov s chromozómami XX zohráva úlohu genetická zložka a ide preto o dedičný jav, monitorovanie kultivačnej násady a zabezpečenie toho, aby sa samce s chromozómami XX nepoužívali na rozmnožovanie kultivačnej násady, predstavuje účinný prostriedok na zníženie výskytu samcov s chromozómami XX v populácii.

Aktivita trenia

Denne je potrebné monitorovať aktivitu trenia v kontrolných replikátoch pred uskutočnením merania plodivosti. S cieľom potvrdiť aktivitu trenia možno kontrolné páry kvalitatívne posudzovať vizuálne. 12 – 14 týždňov po oplodnení by malo dochádzať k treniu pri väčšine kontrolných párov. Nízky počet párov, ktoré sa trú, v tomto čase naznačuje možné problémy so zdravím, s imunitou alebo dobrými životnými podmienkami rýb.

Plodivosť

Zdravé a správne kŕmené jedince ryžovníčky japonskej vo veku 12 – 14 týždňov po oplodnení sa vo všeobecnosti trú denne, pričom každý deň vyprodukujú 15 až 50 vajícok. Z hľadiska produkcie vajícok má 16 z odporúčaných 24 kontrolných chovných párov (> 65 %) naklásať viac ako 20 vajícok na pár a deň, pričom tento počet môže dosiahnuť až 40 vajícok za deň. Nižšie než uvedené množstvo môže naznačovať, že páry, ktoré sa trú, sú nezrelé, podvyživené alebo choré.

Fertilita

Percentuálny podiel oplodnených vajíčok v prípade kontrolných párov, ktoré sa trú, je zvyčajne vyšší než 90 %, pričom nie sú nezvyčajné hodnoty dosahujúce 95 % a vyššie. Miery fertility nižšie ako 80 % v prípade kontrolných vajíčok sú podozrivé a môžu naznačovať nezdravé jedince alebo nevhodné kultivačné podmienky.

Dodatok 5

PRÍKLAD HARMONOGRAMU KŔMENIA

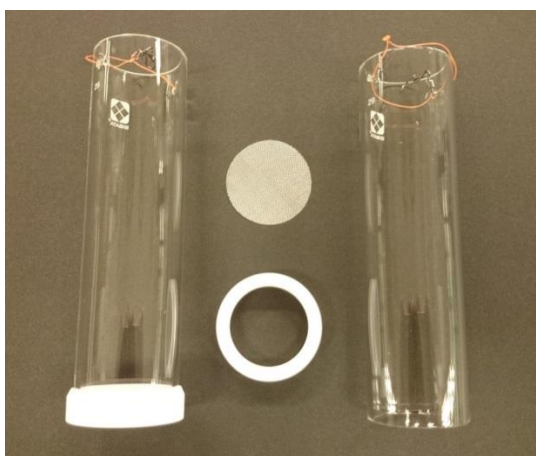
Príklad harmonogramu kŕmenia na zabezpečenie primeraného rastu a vývoja a podporu spoľahlivej reprodukcie sa uvádza v tabuľke 1. Odchýlky od tohto harmonogramu kŕmenia môžu byť prijateľné, odporúča sa však ich testovanie s cieľom overiť dosiahnutie prijateľného rastu a reprodukcie. Na to, aby bolo možné dodržať navrhovaný harmonogram kŕmenia, je potrebné pred začiatkom testu stanoviť suchú hmotnosť žiabronôžky soľnej na objem suspenzie žiabronôžky soľnej. Možno to dosiahnuť odvážením vymedzeného objemu suspenzie žiabronôžky soľnej, ktorá sa nechala 24 hodín schnúť pri teplote 60 °C na vopred odvážených miskách. Na zohľadnenie hmotností solí v suspenzii sa identický objem rovnakého soľného roztoku, aký sa použil v suspenzii, takisto vysuší, odváži a odpočíta od hmotnosti vysušenej suspenzie žiabronôžky soľnej. Alternatívne možno žiabronôžku soľnú prefiltrovať a prepláchnuť destilovanou vodou pred sušením, vďaka čomu nebude potrebné merať hmotnosť zvyškového obsahu solí. Tieto informácie slúžia na prepočítanie údajov v tabuľke zo suchej hmotnosti žiabronôžky soľnej na objem suspenzie žiabronôžky soľnej, ktorá predstavuje kŕmnu dávku na jednu rybu. Okrem toho sa odporúča, aby sa týždenne vážili alikvoty suspenzie žiabronôžky soľnej s cieľom overiť suchú hmotnosť žiabronôžky soľnej podávanej ako krmivo.

Tabuľka 1: Príklad harmonogramu kŕmenia

Čas (po vyliahnutí)	Žiabronôžka sol'ná (suchá hmotnosť v mg/ryba/deň)
1. deň	0,5
2. deň	0,5
3. deň	0,6
4. deň	0,7
5. deň	0,8
6. deň	1,0
7. deň	1,3
8. deň	1,7
9. deň	2,2
10. deň	2,8
11. deň	3,5
12. deň	4,2
13. deň	4,5
14. deň	4,8
15. deň	5,2
16. – 21. deň	5,6
4. týždeň	7,7
5. týždeň	9,0
6. týždeň	11,0
7. týždeň	13,5
8. týždeň – usmrtenie	22,5

Dodatok 6**PRÍKLADY KOMORY NA INKUBÁCIU VAJÍČOK****Príklad A**

Tento inkubátor sa skladá z rozdelenej sklenej odstredivkovej skúmavky pripojenej pomocou objímky z nehrdzavejúcej ocele a upevnenej na mieste pomocou vrchného skrutkovacieho odstredivkového uzáveru. Cez uzáver prechádza tenká trubica zo skla alebo z nehrdzavejúcej ocele, ktorej koniec sa nachádza v blízkosti zaobleného dna a ktorá slúži na jemné vpúšťanie vzduchu, aby dochádzalo k nadnášaniu vajíčok a zníženiu prenosu saprofytických hubových infekcií medzi vajíčkami, pričom sa takisto uľahčuje chemická výmena medzi inkubátorom a chovnou nádržou.

Príklad B

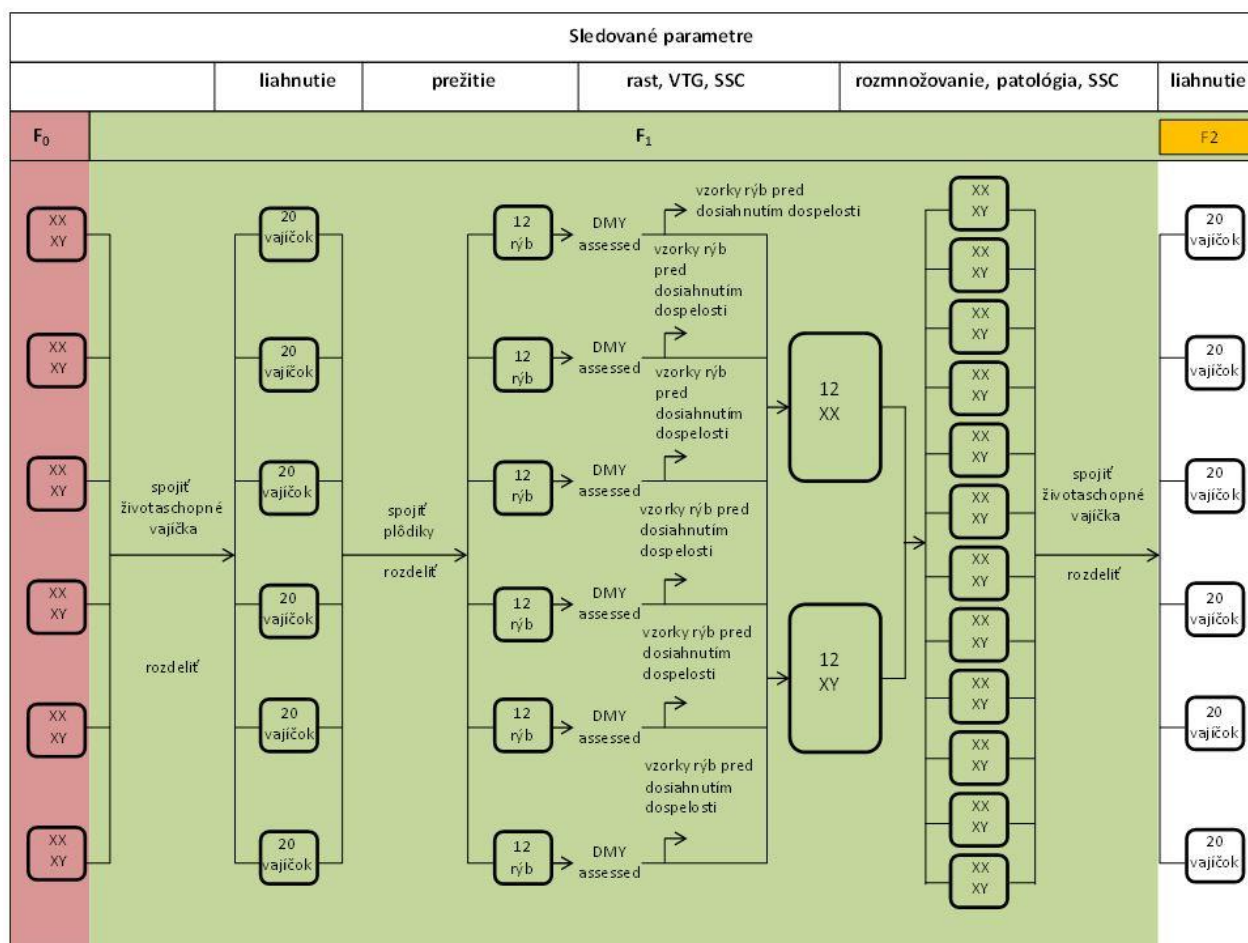


Tento inkubátor sa skladá zo skleného valca (s priemerom 5 cm a dĺžkou 10 cm) a mriežky z nehrdzavejúceho drôtu (rozmery mriežky: $\varnothing$ 0,25 a 32), ktorá je upevnená k spodnej časti valca pomocou krúžku z PTFE. Tieto inkubátory sú zavesené v nádržiach na zdvíhacej tyči a vertikálne sa pretrepávajú (s amplitúdou približne 5 cm) v cykle vhodnom pre vajíčka ryžovníčky japonskej (približne každé 4 sekundy).

Dodatok 7

SCHEMATICKÝ DIAGRAM ZOSKUPOVANIA A NASADZOVANIA REPLIKÁTOV POČAS TESTOVACEJ METÓDY MEOGRT

Obrázok 1: Zoskupovanie a nasadzovanie replikátov počas testu MEOGRT Na obrázku je znázornená jedna skupina s aplikovanou chemikáliou alebo ½ kontroly. V dôsledku zoskupovania sa nezachováva identita replikátu počas celého testu. Výraz „vajíčka“ označuje životaschopné, oplodnené vajíčka (ekvivalentné embryám).



Skupiny s aplikovanou chemikáliou a replikácia

V rámci tejto testovacej metódy sa odporúča päť skupín s aplikovanou testovanou chemikáliou pomocou materiálov technickej akostnej triedy a negatívna kontrola. Počet replikátov na skupinu s aplikovanou chemikáliou nezostáva počas testu MEOGRT konštantný a počet replikátov v kontrolnej skupine predstavuje dvojnásobok počtu použitého v danej skupine s aplikovanou testovanou chemikáliou. V generácii F₀ sa

v každej skupine s aplikovanou testovanou chemikáliou nachádza šesť replikátov, zatiaľ čo v skupine negatívnej kontroly sa nachádza 12 replikátov. Dôrazne sa odporúča nepoužívať rozpúšťadlá a v prípade, že sa použijú, je potrebné v správe o teste MEOGRT uviesť odôvodnenie použitia a výberu rozpúšťadla. Ak sa použije rozpúšťadlo, sú ďalej potrebné dva druhy kontrol: a) kontrola s aplikáciou rozpúšťadla a b) negatívna kontrola. Obe tieto kontrolné skupiny majú obsahovať úplnú množinu replikátov vo všetkých bodoch v rámci harmonogramu testu MEOGRT. Počas celého vývoja testovaných organizmov v generácii F1 (a v generácii F2 do vyľahnutia) zostáva uvedená štruktúra replikátov rovnaká. V dospelom štádiu, keď sa vytvárajú chovné páry generácie F1, sa počet replikátov rozmnožujúcich sa párov na testovanú skupinu optimálne zdvojnásobuje, preto existuje až 12 replikovaných párov v každej skupine s aplikovanou chemikáliou a 24 replikovaných párov v kontrolnej skupine (a v prípade potreby ďalších 24 replikovaných párov v kontrole s aplikáciou rozpúšťadla). Stanovenie liahnutia z embryí vyprodukovaných pri trení párov generácie F1 sa uskutočňuje v rovnakej štruktúre replikátov ako v prípade embryí vyprodukovaných pri trení párov generácie F0, čo predstavuje na začiatku šesť replikátov na skupinu s aplikovanou testovanou chemikáliou a 12 replikátov v kontrolných skupinách.

Dodatok 8

URČENIE POČTU PAPÍL ANÁLNEJ PLUTVY

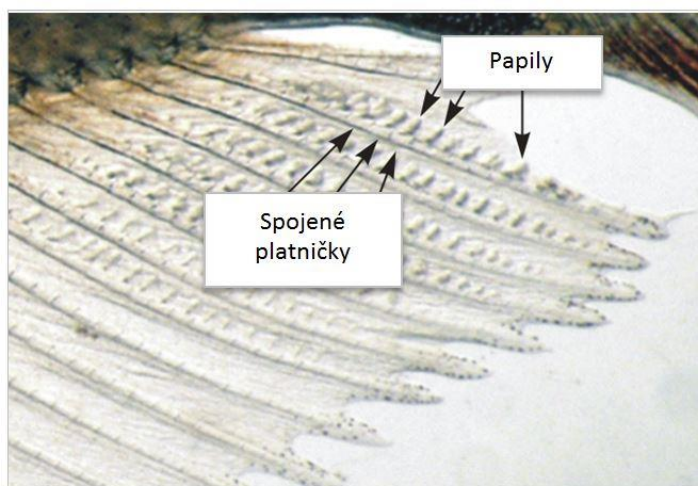
Hlavné materiály a reagenty

- stereoskopický mikroskop (s pripojenou voliteľnou kamerou),
- fixačný prostriedok [napr. Davidsonov (Bouinov sa neodporúča)], ak sa počet nestanovuje na základe obrazového záznamu.

Postupy

Po pitve sa má vytvoriť obrazový záznam análnej plutvy, aby bolo možné ľahko stanoviť počet papíl análnej plutvy. Hoci je odporúčanou metódou vytvorenie obrazového záznamu, análnu plutvu možno zafixovať v Davidsonovom alebo inom vhodnom fixačnom prostriedku približne počas 1 minúty. Je dôležité, aby bola análna plutva počas fixácie umiestnená naplocho, čím sa uľahčí stanovenie počtu papíl. Telo ryby s análnou plutvou možno uložiť v Davidsonovom alebo inom vhodnom fixačnom prostriedku až do analýzy. Spočítajte spojené platničky (**obrázok 1**) s papilami, ktoré prečnievajú zo zadného okraja spojenej platničky.

Obrázok 1: Papily análnej plutvy



Dodatok 9

PODROBNÝ HARMONOGRAM TESTU MEOGRT

1. – 3. testovací týždeň (F0)

Pri rybách generácie F0, ktoré sa trú a ktoré spĺňajú kritériá výberu (pozri odseky 16 – 20), sa uskutoční trojtýždňová expozícia s cieľom vystaviť gaméty a gonadálne tkanivá testovanej chemikálii. V každej nádrži replikátu je umiestnený jeden chovný pár rýb (chovný pár so samicou s chromozómami XX a samcom s chromozómami XY). Vajíčka vyprodukované pri trení sa zberajú, stanovuje sa ich počet a posudzuje sa fertilita počas 21 za sebou nasledujúcich dní od 1. testovacieho dňa.

4. testovací týždeň (F0 a F1)

Uprednostňuje sa zber oplodnených a životaschopných vajíčok (embryí) v jeden deň. Ak však počet embryí nie je dostatočný, môžu sa zbierať počas dvoch dní. Ak zber prebieha počas dvoch dní, všetky embryá v rámci daných testovaných skupín, ktoré sa zozbierali v prvý deň, sa zlúčia s embryami zozbieranými na druhý deň. Potom sa všetky zlúčené embryá pre každú testovanú skupinu náhodne rozdelia do jednotlivých inkubátorov replikátov v počte 20 embryí na inkubátor. Denne sa kontroluje a zaznamenáva mortalita oplodnených vajíčok (embryí). Mŕtve vajíčka sa z inkubátorov odstraňujú (smrť oplodnených vajíčok môže predovšetkým v ranných štádiách naznačovať výrazná strata priehľadnosti a zmena v zafarbení spôsobená koaguláciou a/alebo vyvrážením bielkovín, čo vedie k bielemu nepriehľadnému vzhľadu; OECD 210).

Poznámka: Ak sa pri jednej testovanej skupine vyžaduje druhý deň zberu, je tento postup potrebné uskutočniť vo všetkých testovaných skupinách (vrátane kontrol). Ak po druhom dni zberu nie je k dispozícii dostatočný počet embryí v rámci testovanej skupiny na nasadenie 20 embryí na inkubátor, znížte počet embryí nasadených v rámci tejto konkrétnej testovanej skupiny na 15 embryí na inkubátor. Ak nie je k dispozícii dostatočný počet embryí na nasadenie 15 embryí na inkubátor, znížte počet inkubátorov replikátov tak, aby bolo možné nasadiť do každého inkubátora 15 embryí. Navyše je možné v generácii F0 pridať viac chovných párov na testovanú skupinu a kontroly s cieľom vyprodukovať viac vajíčok, aby sa dosiahol odporúčaný počet 20 na replikát.

Na 24. testovací deň sa chovné páry generácie F0 humánnym spôsobom usmrtia a zaznamená sa hmotnosť a dĺžka. V prípade potreby možno chovné páry generácie F0 chovať ešte ďalšie 1 – 2 dni, aby sa znovu začala generácia F1.

5. – 6. testovací týždeň (F1)

Jeden až dva dni pred predpokladaným začiatkom liahnutia zastavte alebo obmedzte

premiešavanie vajíčok počas inkubácie, aby sa urýchlilo liahnutie. Ako sa embryá každý deň liahnu, plôdiky sa zoskupia podľa testovanej skupiny a systematicky sa rozdelia do jednotlivých nádrží replikátov s larvami v rámci konkrétnej testovanej skupiny tak, aby v žiadnej nebolo viac ako 12 plôdikov. Uskutočňuje sa to náhodným výberom plôdikov, ktoré sa bez rozlišovania po jednom umiestňujú do za sebou nasledujúcich replikátov, pričom sa postupuje podľa poradia replikátov konkrétnej testovanej skupiny, až kým sa vo všetkých replikátoch v rámci príslušnej testovanej skupiny nenachádza 12 plôdikov. Ak nie je k dispozícii dostatok plôdikov na naplnenie všetkých replikátov, zabezpečte, aby sa v čo najväčšom počte replikátov nachádzalo 12 plôdikov, aby bolo možné začať s fázou F1.

Vajíčka, ktoré sa nevyliarli za dvojnásobok mediánu dňa liahnutia v kontrole, sa považujú za neživotaschopné a vyradia sa. Zaznamená sa počet plôdikov a v každom replikáte sa vypočíta úspešnosť liahnutia (liahnivosť).

7. – 11. testovací týždeň (F1)

Denne sa vo všetkých replikátoch kontroluje a zaznamenáva prežitie rýb v larválnom štádiu. Na 43. testovací deň sa v každom replikáte zaznamená počet rýb, ktoré prežili, ako aj pôvodný počet plôdikov umiestnených do replikátu (nominálne dvanásť). Možno tak vypočítať percentuálny podiel prežitia od vyliahnutia po štádium pred dosiahnutím dospelosti.

Testovacie týždne (F1)

Na 78. – 85. testovací deň sa z chvostovej plutvy každej ryby odoberie malá vzorka na určenie genotypového pohlavia jedinca (t. j. odobratie odrezkov plutiev) v prípade všetkých rýb. Tieto informácie sa použijú pri vytváraní chovných párov.

Do troch dní po stanovení genotypového pohlavia každej ryby sa náhodne vytvorí 12 chovných párov na testovanú skupinu a 24 párov na kontrolu. Dve ryby s chromozómami XX a XY z každého replikátu sa náhodne vyberú a zoskupia podľa pohlavia a potom sa z nich na základe náhodného výberu vytvorí chovný pár (t. j. pár s chromozómami XX – XY). Vytvorí sa najmenej 12 replikátov na skupinu s aplikovanou chemikáliou a najmenej 24 replikátov pre kontrolu, pričom v každom replikáte sa nachádza jeden chovný pár. Ak v replikáte nie sú na účely zoskupenia k dispozícii dve ryby s chromozómami XX alebo dve ryby s chromozómami XY, ryby s vhodným pohlavným genotypom je potrebné získať z iných replikátov v rámci danej testovanej skupiny.

Zvyšné ryby (najviac 8 rýb na replikát) sa humánne usmrtia a použijú sa ako vzorky na meranie rôznych sledovaných parametrov pri jedincoch pred dosiahnutím dospelosti. Údaje o géne *dmy* (XX alebo XY) pre všetky vzorky rýb pred dosiahnutím dospelosti sa uchovávajú, aby bolo možné priradiť údaje o všetkých sledovaných parametroch ku genetickému pohlaviu jednotlivých rýb.

13. – 14. testovací týždeň (F1)

Expozícia pokračuje v čase, keď sa chovné páry zložené z rýb pred dosiahnutím dospelosti vyvíjajú na dospelé ryby. Na 98. testovací deň (t. j. deň pred začiatkom zberu vajíčok) sa odstránia vajíčka, ktoré sa nachádzajú v akváriách aj na samiciach.

15. – 17. testovací týždeň (F1)

Vajíčka vyprodukované pri trení sa v každom replikáte zberajú denne počas 21 za sebou nasledujúcich dní a posudzujú sa z hľadiska plodivosti a fertility.

18. testovací týždeň (opakovanie 4. testovacieho týždňa) (F1 a F2)

Na 120. testovací deň ráno sa v každej nádrži replikátu uskutoční zber vajíčok. Odoberaté vajíčka sa posúdia a oplodnené vajíčka (s odstránenými vláknami) od každého z chovných párov sa zoskupia podľa testovanej skupiny a systematicky sa rozdelia do komôr na inkubáciu vajíčok tak, aby sa v každom inkubátore nachádzalo 20 oplodnených vajíčok. Inkubátory možno umiestniť do samostatných inkubačných nádrží pripravených pre jednotlivé testované skupiny alebo do nádrže replikátu, v ktorej sa po vyliahnutí budú nachádzať vyliahnuté larvy. Uprednostňuje sa zber embryí v jeden deň, ak však počet embryí nie je dostatočný, môžu sa zbierať počas dvoch dní. Ak zber prebieha počas dvoch dní, všetky embryá v rámci daných testovaných skupín, ktoré sa zozbierali v prvý deň, sa zlúčia s embryami zozbieranými na druhý deň. Potom sa všetky zlúčené embryá pre každú testovanú skupinu náhodne rozdelia do jednotlivých inkubátorov replikátov v počte 20 embryí na inkubátor. Poznámka: Ak sa pri jednej testovanej skupine vyžaduje druhý deň zberu, je tento postup potrebné uskutočniť vo všetkých testovaných skupinách (vrátane kontrol). Ak po druhom dni zberu nie je k dispozícii dostatočný počet embryí v rámci testovanej skupiny na nasadenie 20 embryí na inkubátor, znížte počet embryí nasadených v rámci tejto konkrétnej testovanej skupiny na 15 embryí na inkubátor. Ak nie je k dispozícii dostatočný počet embryí na nasadenie 15 embryí na inkubátor, znížte počet inkubátorov replikátov tak, aby bolo možné nasadiť do každého inkubátora 15 embryí.

Na 121. testovací deň (alebo na 122. testovací deň, aby sa zabezpečil správny začiatok generácie F2) sa chovné páry generácie F1 humánnym spôsobom usmrť a analyzujú sa z hľadiska sledovaných parametrov dospelých rýb. V prípade potreby možno chovné páry generácie F1 chovať ešte ďalšie 1 – 2 dni, aby sa znovu začala generácia F2.

19. – 20. testovací týždeň (F2)

Jeden až dva dni pred predpokladaným začiatkom liahnutia zastavte alebo obmedzte premiešavanie vajíčok počas inkubácie, aby sa urýchlilo liahnutie. Ak sa test ukončí do dokončenia liahnutia v generácii F2, plôdiky sa každý deň zaznamenávajú a vyradia. (Embryá, ktoré sa nevyliarli počas predĺženého inkubačného času, ktorý je vymedzený ako dvojnásobok mediánu dňa liahnutia v kontrole, sa považujú za neživotaschopné.)

Dodatok 10

ŠTATISTICKÁ ANALÝZA

Typy biologických údajov získaných v teste MEOGRT nie sú jedinečné pre tento test a s výnimkou údajov týkajúcich sa patológie bolo vytvorených množstvo vhodných štatistických metodík na primerané analyzovanie podobných údajov v závislosti od ich charakteristík, a to vrátane normality, homogenity rozptylu, toho, či je koncepcia štúdie vhodná na testovanie hypotéz alebo regresnú analýzu, na parametrické alebo neparametrické testy atď. Všeobecnou zásadou je, že pri navrhovaných štatistických analýzach sa vychádza z odporúčaní OECD v súvislosti s údajmi o ekotoxícite (OECD 2006). Na obrázku 2 sa nachádza vývojový diagram na prijímanie rozhodnutí v súvislosti s analýzou údajov testu MEOGRT.

Predpokladá sa, že pri množinách údajov sa budú najčastejšie vyskytovať monotónne reakcie. Okrem toho je potrebné zvážiť rozdiel pri použití jednostranného alebo dvojstranného štatistického testu. Pokiaľ neexistuje biologické odôvodnenie, na základe ktorého by sa jednostranný test považoval za nevhodný, odporúča sa použitie jednostranných testov. Hoci sa v nasledujúcej časti odporúčajú určité štatistické testy, ak sa vyvinú vhodnejšie a/alebo výkonnejšie štatistické metódy, ktoré možno použiť pri konkrétnych údajoch získaných v teste MEOGRT, majú sa použiť tieto štatistické testy, aby sa využili ich výhody.

Údaje z testu MEOGRT sa analyzujú samostatne pre každé genotypové pohlavie. Na analýzu údajov týkajúcich sa rýb so zmeneným pohlavím (samce s chromozómami XX alebo samice s chromozómami XY) sú k dispozícii dve stratégie. 1. Všetky údaje týkajúce sa rýb so zmeneným pohlavím v celom teste sa cenzurujú s výnimkou situácie, keď zmena pohlavia prevláda v jednotlivých replikátoch. 2. Údaje týkajúce sa všetkých rýb so zmeneným pohlavím sa ponechajú v množine údajov a analyzujú sa na základe genotypu.

Histopatologické údaje

Histopatologické údaje sa uvádzajú v podobe skóre závažnosti, ktoré sa hodnotia pomocou novovytvoreného štatistického postupu RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) (Green a kol., 2014). Pomocou *Raovej-Scottovej* úpravy sa zachovávajú informácie o replikácii v rámci testu a v postupe s označením *by Slices* je začlenené biologické očakávanie, že skóre závažnosti majú tendenciu zvyšovať sa so zvyšujúcimi sa koncentraciami testovanej chemikálie. Pri jednotlivých diagnostických postupoch sa na základe výstupu RSCABS určuje, pri ktorých skupinách s aplikovanou chemikáliou dochádza v porovnaní s kontrolami k vyššej prevalencii patologických javov, ako aj súvisiaca úroveň závažnosti.

Údaje týkajúce sa plodivosti

Súčasťou analýz údajov týkajúcich sa plodivosti je Jonckheerov-Terpstrov test trendu alebo Williamsov test s cieľom určiť účinky aplikovania testovanej chemikálie, a to za predpokladu, že údaje zodpovedajú monotónnej závislosti reakcie od koncentrácie. V prípade step-down testu trendu sa všetky porovnávania uskutočňujú na úrovni významnosti 0,05 a neuplatňuje sa úprava na základe počtu porovnaní. Očakáva sa, že údaje zodpovedajú monotónnej závislosti reakcie od koncentrácie, možno to však overiť vizuálnou kontrolou údajov alebo stanovením lineárnych a kvadratických kontrastov stredných hodnôt aplikovania testovanej chemikálie po transformácii údajov podľa poradia. Ak kvadratický kontrast nie je významný a lineárny kontrast je nevýznamný, uskutoční sa testovanie trendov. V opačnom prípade sa použije Dunnettov test s cieľom určiť účinky aplikovania testovanej chemikálie, ak majú údaje normálne rozdelenie s homogénnymi rozptylmi. Ak uvedené požiadavky nie sú splnené, použije sa Dunnov test s Bonferonniho-Holmovou úpravou. Všetky uvedené testy sa uskutočňujú nezávisle od akéhokoľvek celkového F-testu alebo Kruskalovho-Wallisovho testu. Podrobnejšie údaje sa uvádzajú v dokumente OECD 2006.

Ak je to štatisticky odôvodnené, možno použiť alternatívne metódy, napr. generalizovaný lineárny model so zohľadnením chýb v Poissonovom rozdelení v súvislosti s počtami vajíčok (bez transformácie) (Cameron a Trividi, 2013). V prípade použitia alternatívneho prístupu sa odporúča využiť poradenstvo v oblasti štatistiky.

Denný počet vajíčok v rámci jednej generácie

Model ANOVA vychádza z parametrov $Y = \text{čas} * \text{čas} + \text{aplikovanie testovanej chemikálie} + * \text{aplikovanie testovanej chemikálie} + \text{čas} * \text{aplikovanie testovanej chemikálie} + * \text{čas} * \text{aplikovanie testovanej chemikálie}$ so zahrnutím náhodných účinkov replikátu (generácia* aplikovanie testovanej chemikálie), čo umožňuje zohľadniť nerovnaké zložky rozptylu oboch typov medzi generáciami. Parametrom čas sa tu označuje frekvencia počítania vajíčok (napr. deň alebo týždeň). Ide o analýzu na základe opakovaných meraní s koreláciami medzi pozorovaniami na rovnakých replikátoch, pričom sa zohľadňuje povaha údajov získaných z opakovaných meraní.

Hlavné účinky aplikovania testovanej chemikálie sa testujú pomocou Dunnettovho (alebo Dunnettovho-Hsuovho) testu, ktorý zahŕňa úpravu na základe počtu porovnaní. Potrebné sú úpravy na základe hlavného účinku generácie a času, keďže pre tieto dva faktory neexistuje „kontrolná“ úroveň a každá dvojica úrovní predstavuje porovnanie, ktoré je možným predmetom záujmu. Pokiaľ ide o tieto dva hlavné účinky, ak je F-test pri hlavnom účinku významný na úrovni 0,05, možno bez ďalšej úpravy testovať párové porovnania medzi úrovňami daného faktora na úrovni 0,05.

Súčasťou modelu sú dvojfaktorové a trojfaktorové interakcie, keďže hlavný účinok, napríklad v prípade času, nemusí byť významný, hoci má čas významný vplyv na výsledky. Ak je preto dvojfaktorová a trojfaktorová interakcia zahŕňajúca čas významná na úrovni

0,05, možno bez ďalšej úpravy akceptovať porovnania úrovni času na úrovni významnosti 0,05.

Ďalej nasledujú F-testy významnosti aplikovania testovanej chemikálie v rámci času, tzv. rezy v tabuľke ANOVA. Ak je napríklad rez pre aplikovanie testovanej chemikálie v rámci generácie F1 a času 12 významný na úrovni 0,05, možno bez ďalšej úpravy akceptovať párové porovnania aplikovania testovanej chemikálie v rámci generácie F1 a času 12 na úrovni 0,05. Podobné postupy sa vzťahujú na testy týkajúce sa času v rámci generácie F1 a aplikovania testovanej chemikálie a na testy týkajúce sa generácie v rámci času a aplikovania testovanej chemikálie.

A nakoniec, v prípade porovnaní, ktoré nepatria ani do jednej z vyššie uvedených kategórií, je potrebné porovnania upraviť pomocou Bonferroniho-Holmovej úpravy podľa hodnôt p. Ďalšie informácie o analýzach takýchto modelov možno nájsť v zdrojoch Hocking (1985) a Hochberg a Tamhane (1987).

Alternatívne sa nespracované údaje zaznamenajú a uvedú v správe o štúdiu ako plodivosť (počet vajíčok) na replikát za každý deň. Vypočíta sa stredná hodnota nespracovaných údajov replikátu a použije sa transformácia druhej odmocniny. Uskutoční sa jednosmerná analýza ANOVA na transformovaných stredných hodnotách replikátu a následne sa vypočítajú kontrasty Dunnettovou metódou. Užitočná môže byť aj vizuálna kontrola údajov o plodivosti pre každú testovanú skupinu a/alebo replikát pomocou bodového grafu, v ktorom sa zobrazujú údaje v priebehu času. Umožňuje to neformálne posúdenie potenciálnych účinkov v priebehu času.

Všetky ostatné biologické údaje

Pri štatistických analýzach sa vychádza z východiskového predpokladu, že pri správnom výbere dávky budú údaje monotónne. Údaje sa tak považujú za monotónne a formálne sa vyhodnocuje ich monotónnosť pomocou lineárnych a kvadratických kontrastov. Ak sú údaje monotónne, odporúča sa na mediány replikátu použiť Jonckheerov-Terpstrov test trendu (podľa OECD 2006). Ak je kvadratický kontrast významný a lineárny kontrast nie je významný, údaje sa považujú za nemonotónne.

Ak sú údaje nemonotónne, najmä z dôvodu nižšej reakcie v jednej alebo dvoch testovaných skupinách s najvyššou dávkou, je potrebné zvážiť cenzurovanie množiny údajov tak, aby sa analýza uskutočnila bez uvedených testovaných skupín. Toto rozhodnutie bude potrebné prijať na základe odborného úsudku a všetkých dostupných údajov, obzvlášť údajov, ktoré naznačujú zjavnú toxicitu pri uvedených úrovniach aplikovania testovanej chemikálie.

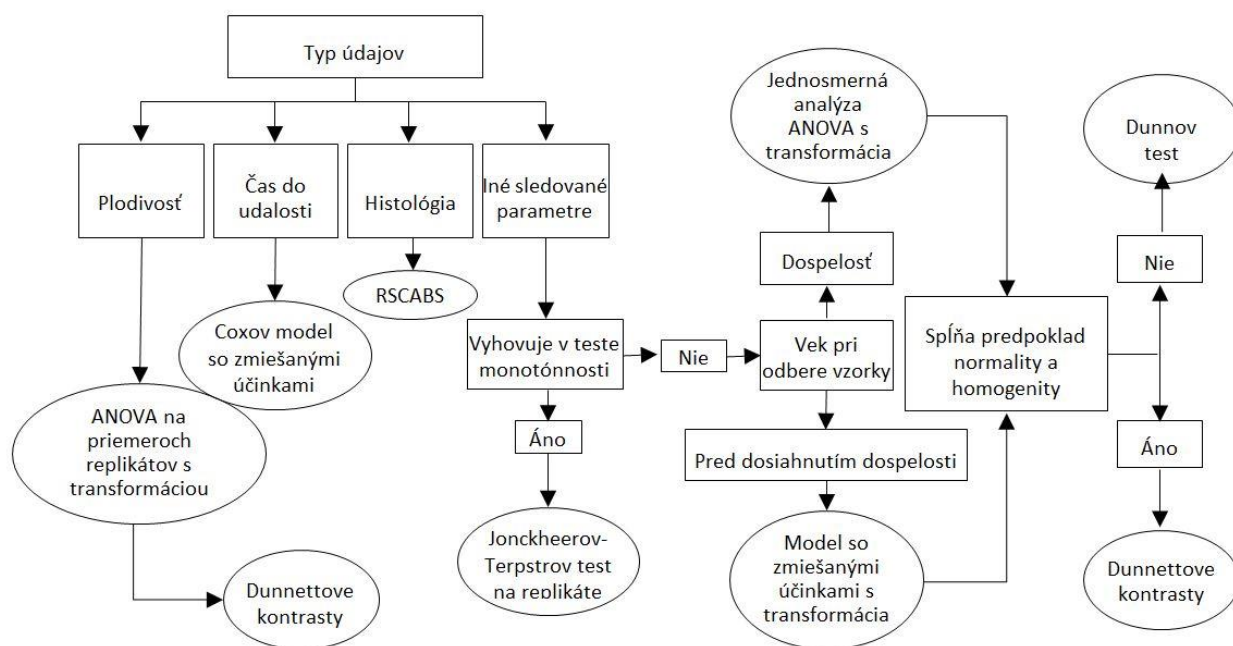
V prípade hmotnosti a dĺžky sa neodporúčajú transformácie, hoci príležitostne môžu byť nevyhnutné. V prípade údajov o vitelogeníne sa však odporúča logaritmická transformácia, v prípade údajov o sekundárnych pohlavných znakoch (papily análnej plutvy) sa odporúča

transformácia druhej odmocniny a v prípade údajov o proporciálnom liahnutí, percentuálnej miere prežitia, pomere pohlaví a percentuálnej hodnote oplodnených vajíčok sa odporúča arkussínusová transformácia druhej odmocniny. Čas do vyliahnutia a čas do prvého trenia sa považujú za údaje vyjadrujúce čas do udalosti, pričom na údaje predstavujúce jednotlivé embryá, ktoré sa vo vymedzenom období nevyliahnú, alebo replikáty, pri ktorých nikdy nenastane trenie, sa uplatní cenzurovanie sprava. Čas do vyliahnutia sa vypočíta z mediánu dňa liahnutia jednotlivých replikátov. Tieto sledované parametre sa analyzujú pomocou Coxovho modelu proporcionálnych rizík so zmiešanými účinkami.

V biologických údajoch pochádzajúcich zo vzoriek dospelých jedincov sa nachádza jedno meranie na replikát, t.j. zahŕňajú jednu rybu s chromozómami XX a jednu rybu s chromozómami XY na akvárium s replikátom. Odporúča sa preto, aby sa na stredných hodnotách replikátu uskutočnila jednosmerná analýza ANOVA. Ak sú splnené predpoklady analýzy ANOVA (normalita a homogenita rozptylu na základe posúdenia na rezíduách z analýzy ANOVA pomocou Shapirovho-Wilkovho testu, resp. Levenovho testu), na stanovenie testovaných skupín, ktoré boli odlišné od kontroly, sa majú použiť kontrasty stanovené Dunnettovou metódou. Naopak, ak nie sú splnené predpoklady analýzy ANOVA, na stanovenie testovaných skupín, ktoré boli odlišné od kontroly, sa má použiť Dunnov test. Podobný postup sa odporúča v prípade údajov, ktoré sú v percentuálnej podobe (fertilita, liahnutie a prežitie).

Biologické údaje zo vzoriek jedincov pred dosiahnutím dospelosti obsahujú 1 až 8 meraní na replikát, čo znamená, že môžu zahŕňať premenlivé počty jedincov započítaných do strednej hodnoty replikátu za každé genotypové pohlavie. Preto sa odporúča použitie modelu ANOVA so zmiešanými účinkami a následne použitie kontrastov stanovených Dunnettovou metódou, ak sú splnené predpoklady normality a homogenity rozptylu (na rezíduách modelu ANOVA so zmiešanými účinkami). Ak nie sú splnené, na stanovenie testovaných skupín, ktoré boli odlišné od kontroly, sa má použiť Dunnov test.

Obrázok 2: Vývojový diagram odporúčaných štatistických postupov na analýzu údajov testu MEOGRT



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

C.53 SKÚŠKA VÝVOJA A RASTU OBOJŽIVELNÍKOV V LARVÁLNOH ŠTÁDIU (LAGDA)

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s usmernením OECD na vykonávanie testov 241 (2015). Potreba vytvorenia a validácie skúšky, pomocou ktorej možno identifikovať a charakterizovať nežiaduce dôsledky expozície obojživelníkov toxickým látkam, vychádza z obáv, že úrovně chemikálií v životnom prostredí môžu spôsobovať nežiaduce účinky v prípade ľudí aj voľne žijúcich živočíchov. V usmernení OECD na vykonávanie testov ku skúške vývoja a rastu obojživelníkov v larválnom štádiu (LAGDA) sa opisuje test toxicity v prípade druhu obojživelníka, pri ktorom sa posudzuje rast a vývoj od oplodnenia a počas raného obdobia juvenilného jedinca. V skúške (zvyčajne v trvaní 16 týždňov) sa posudzuje raný vývoj, metamorfóza, prežitie, rast a čiastočné reprodukčné dozrievanie. Pomocou skúšky možno merať aj viacero ďalších sledovaných parametrov umožňujúcich diagnostické hodnotenie chemikálií, pri ktorých existuje podozrenie, že predstavujú endokrinné disruptory (EDC), alebo iných typov vývojovo a reprodukčne toxických látok. Postup opísaný v tejto testovacej metóde je odvodený z validačných činností s použitím africkej pazúrnatky vodnej (*Xenopus laevis*), ktoré vykonala Agentúra Spojených štátov na ochranu životného prostredia (US EPA), s príspevím podporných činností vykonaných v Japonsku (1). Hoci v oblasti rastu a vývoja možno testovaciemu protokolu, ktorého dôležitou zložkou je schopnosť stanoviť genetické pohlavie, prispôbiť iné druhy obojživelníkov, špecifické metódy a sledované parametre z hľadiska pozorovania, ktoré sú opísané v tejto testovacej metóde, sa vzťahujú len na druh *Xenopus laevis*.
2. Skúška LAGDA slúži ako test vyššieho stupňa v prípade obojživelníkov na získanie komplexnejších informácií o nežiaducich účinkoch, pokiaľ ide o závislosť reakcie od koncentrácie, ktoré sú vhodné na použitie na identifikáciu a charakterizáciu nebezpečnosti a na posudzovanie ekologického rizika. Skúška zodpovedá úrovni 4 koncepčného rámca OECD na testovanie a hodnotenie endokrinných disruptorov, v rámci ktorej sa pomocou skúšok *in vivo* získavajú aj údaje o nežiaducich účinkoch na príslušné sledované parametre endokrinného systému (2). V rámci všeobecnej koncepcie pokusu sa uskutoční expozícia embryí *X. laevis* v Nieuwkoopovom a Faberovom (NF) štádiu 8 – 10 (3) najmenej štyrom rôznym koncentraciám testovanej chemikálie (všeobecne s odstupmi nie menšími ako polovica logaritmického intervalu) a kontrolám, a to do 10 týždňov po mediáne času do NF štádia 62 v kontrole, s jednou predbežnou podvzorkou v NF štádiu 62 [(≤ 45 dní po

oplodnení; zvyčajne približne 45 dní (dni po oplodnení)]. Pri každej testovanej koncentrácii existujú štyri replikáty, pričom pri kontrole sa používa osem replikátov. Medzi sledované parametre, ktoré sa hodnotia v priebehu expozície (v predbežnej podvzorke a konečnej vzorke pri ukončení testu), patria tie, ktoré signalizujú celkovú toxicitu: mortalitu, abnormálne správanie a parametre stanovenia rastu (dĺžka a hmotnosť), ako aj sledované parametre určené na charakterizovanie špecifických toxických spôsobov účinku na endokrinný systém s pôsobením na fyziologické procesy sprostredkované estrogénom, androgénom alebo štítnou žľazou. V rámci metódy sa kladie hlavný dôraz na potenciálne účinky relevantné z hľadiska populácie (konkrétne škodlivé vplyvy na prežitie, vývoj, rast a reprodukčný vývoj) pri výpočte hodnôt koncentrácie, pri ktorej sa nepozorujú účinky, (NOEC) alebo účinnej koncentrácie, ktorá spôsobuje x % zmenu (ECx) v meranom sledovanom parametri. Je však potrebné poznamenať, že prístupy s využitím účinnej koncentrácie ECx sú zriedka vhodné pre rozsiahle štúdie tohto typu, v ktorých môže byť nepraktický rastúci počet testovaných koncentrácií, ktoré majú slúžiť na určenie požadovanej hodnoty ECx. Takisto je potrebné poznamenať, že sa táto metóda nevzťahuje na samotnú reprodukčnú fázu. Vymedzenie pojmov použitých v tejto testovacej metóde sa uvádza v dodatku 1.

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

3. Vzhľadom na obmedzený počet testovaných chemikálií a laboratórií, ktoré sa zúčastnili na validácii tejto pomerne zložitej štúdie, pričom obzvlášť medzilaboratórna reprodukovateľnosť nebola doposiaľ zdokumentovaná na základe údajov z pokusov, sa predpokladá, že sa usmernenie OECD na vykonávanie testov 241 prehodnotí a v prípade potreby sa zreviduje na základe získaných skúseností, keď bude k dispozícii dostatočný počet štúdií na posúdenie vplyvu novej koncepcie štúdie. LAGDA predstavuje dôležitú skúšku na posúdenie látok, ktoré potenciálne prispievajú k poklesu populácie obojživelníkov, hodnotením účinkov expozície chemikáliám počas citlivého larválneho štádia, keď môžu účinky na prežitie a vývoj vrátane normálneho vývoja reprodukčných orgánov nepriaznivo ovplyvňovať populácie týchto živočíchov.
4. Test je určený na detekciu konečných účinkov v dôsledku endokrinných aj neendokrinných mechanizmov a jeho súčasťou sú diagnostické sledované parametre, ktoré sú sčasti špecifické pre kľúčové endokrinné modality. Je potrebné poznamenať, že pred vyvinutím skúšky LAGDA neexistovala žiadna validovaná skúška, ktorá by slúžila na tento účel v prípade obojživelníkov.

5. Pred začiatkom skúšky je dôležité mať k dispozícii informácie o fyzikálno-chemických vlastnostiach testovanej chemikálie, najmä na to, aby bolo možné pripraviť stabilné chemické roztoky. Je potrebné mať k dispozícii aj primerane citlivú analytickú metódu na overenie koncentrácií testovanej chemikálie. Počas obdobia približne 16 týždňov sa v rámci skúšky celkovo vyžaduje 480 zvierat, t. j. embryí *X. laevis* (alebo 640 embryí v prípade použitia kontroly s aplikáciou rozpúšťadla), aby sa zabezpečila dostatočná kapacita testu na vyhodnotenie sledovaných parametrov súvisiacich s populáciou, napr. rastu, vývoja a reprodukčného dozrievania.
6. Pred použitím tejto testovacej metódy na regulačné testovanie zmesi treba zvážiť, či poskytne prijateľné výsledky na určené regulačné účely. V tejto skúške sa navyše priamo nevyhodnocuje plodivosť, preto sa nemusí dať použiť v pokročilejších fázach, než je úroveň 4 koncepčného rámca OECD na testovanie a hodnotenie endokrinných disruptorov.

VEDECKÝ ZÁKLAD TESTOVACEJ METÓDY

7. Súčasná miera porozumenia biológii obojživelníkov sa do veľkej miery dosiahla prostredníctvom vzorového laboratórneho druhu *X. laevis*. Tento druh možno bežne kultivovať v laboratóriu, ovuláciu možno vyvolať pomocou ľudského chorionického gonadotropínu (hCG) a zásoby zvierat sú jednoducho dostupné od komerčných chovateľov.
8. Podobne ako pri všetkých stavovcoch reprodukciu obojživelníkov riadi os hypotalamus – hypofýza – gonády (HPG) (4). Estrogény a androgény slúžia ako mediátory tohto endokrinného systému a ovplyvňujú vývoj a fyziológiu pohlavne dimorfných tkanív. V životnom cykle obojživelníkov sa vyskytujú tri samostatné fázy, počas ktorých je táto os obzvlášť aktívna: 1. diferenciácia gonád počas larválneho vývoja; 2. vývoj sekundárnych pohlavných znakov a gonadálne dozrievanie počas juvenilnej fázy a 3. funkčná reprodukcia dospelých jedincov. Počas každého z týchto vývojových období sa pravdepodobne prejavuje vnímavosť na narušenie endokrinného systému určitými chemikáliami, ako sú estrogény a androgény, čo v konečnom dôsledku vedie k strate reprodukčnej spôsobilosti organizmov.
9. Vývoj gonád sa začína v NF štádiu 43, keď sa prvýkrát objavuje bipotenciálna gonadálna ryha. Diferenciácia gonád sa začína v NF štádiu 52, keď sa primordiálne zárodočné bunky buď premiestnia do medulárneho tkaniva (samce), alebo zostanú v kortikálnej oblasti (samice) vyvíjajúcich sa gonád (3). Náchylnosť tohto procesu pohlavnej diferenciácie gonád na chemickú zmenu v prípade rodu *Xenopus* sa prvýkrát pozorovala v 50. rokoch

dvadsiateho storočia (5) (6). Expozícia žubrienok estradiolu počas tohto obdobia diferenciácie gonád vedie k zmene pohlavia samcov, z ktorých sa pri dosiahnutí dospelosti stávajú úplne funkčné samice (7) (8). Možná je aj funkčná zmena pohlavia samíc na samce, ktorá bola zaznamenaná po implantácii tkaniva semenníkov do žubrienok (9). Aj keď expoziícia inhibítora aromatázy spôsobuje funkčnú zmenu pohlavia aj pri druhu *X. tropicalis* (10), tento jav sa pri druhu *X. laevis* nepreukázal. Historicky sa účinky toxických látok na diferenciáciu gonád posudzovali histologickým vyšetrením gonád pri metamorfóze a zmenu pohlavia bolo možné stanoviť len na základe analýzy pomerov pohlaví. Až donedávna neexistovali prostriedky na priame stanovenie genetického pohlavia rodu *Xenopus*. Stanovením markerov súvisiacich s pohlavím pri druhu *X. laevis* je však v súčasnosti možné určiť genetické pohlavie a priamo identifikovať zvieratá so zmeneným pohlavím (11).

10. Pri samcoch sa v rámci juvenilného vývoja zvyšujú úrovně testosterónu v krvi v súvislosti s vývojom sekundárnych pohlavných znakov a vývojom semenníkov. Pri samiciach sa vo vaječníkoch vytvára estradiol, čo vedie k prítomnosti vitelogenínu (VTG) v plazme, vitelogenínových oocytov vo vaječníku a k vývoju vajcovodov (12). Vajcovody sú samičné sekundárne pohlavné znaky, ktoré sa podieľajú na dozrievaní oocytov počas reprodukcie. Na vonkajší povrch oocytov sa počas prechodu vajcovodom nanáša rôsolovitý povlak a následne sa oocyty, pripravené na oplodnenie, zhromažďujú vo vaku na vajíčka. Vývoj vajcovodov podľa všetkého regulujú estrogény, keďže ich vývoj koreluje s úrovňami estradiolu v krvi pri druhoch *X. laevis* (13) a *X. tropicalis* (12). V prípade samcov sa pozoroval vývoj vajcovodov po expozícii zlúčeninám polychlórovaných bifenylov (14) a 4-*terc*-oktylfenolu (15).

PRINCÍP TESTU

11. V rámci koncepcie testu sa uskutoční expoziícia embryí *X. laevis* v NF štádiu 8 – 10 vodnou cestou štyrom rôznym koncentráciám testovanej chemikálie a kontrolám do 10 týždňov po mediáne času do NF štádia 62 v kontrole, s jednou predbežnou podvzorkou v NF štádiu 62. Hoci môže existovať aj možnosť podávania dávok výrazne hydrofóbných chemikálií prostredníctvom krmiva, v rámci tejto skúšky doteraz existujú len obmedzené skúsenosti s touto expozičnou cestou. Pri každej testovanej koncentrácii existujú štyri replikáty, pričom pri každej použitej kontrole sa používa osem replikátov. Medzi sledované parametre, ktoré sa hodnotia v priebehu expoziície, patria tie, ktoré signalizujú celkovú toxicitu [t. j. mortalita, abnormálne správanie a parametre stanovenia rastu (dĺžka a hmotnosť)], ako aj sledované parametre určené na charakterizovanie špecifických toxických spôsobov účinku na endokrinný systém s pôsobením na fyziologické procesy

sprostredkované estrogénom, androgénom a štítnou žľazou [t. j. histopatologické vyšetrenie štítnej žľazy, histopatologické vyšetrenie gonád a gonadálneho kanála, abnormálny vývoj, vitelogenín v plazme (voliteľné) a genotypové/fenotypové pomery pohlaví].

KRITÉRIÁ PLATNOSTI TESTU

12. Uplatňujú sa tieto kritériá platnosti testu:

- koncentrácia rozpusteného kyslíka má počas testu dosahovať $\geq 40\%$ hodnoty rozpustnosti vzdušného kyslíka,
- teplota vody má byť v rozsahu 21 ± 1 °C a rozdiely medzi replikátmi a medzi testovanými skupinami by nemali byť väčšie ako 1,0 °C,
- pH testovaného roztoku sa má udržiavať v rozsahu 6,5 až 8,5 a rozdiely medzi replikátmi a medzi testovanými skupinami by nemali byť väčšie ako 0,5,
- malo by byť preukázateľné, že koncentrácia testovanej chemikálie v roztoku bola uspokojivo udržiavaná v rozsahu ± 20 % stredných nameraných hodnôt,
- mortalita počas obdobia expozície má byť ≤ 20 % pri každom replikáte v kontrolách,
- ≥ 70 % životaschopnosť znášky zvolenej na začiatku štúdie,
- medián času do NF štádia 62 kontrol má byť ≤ 45 dní.
- Priemerná hmotnosť testovaných organizmov v NF štádiu 62 a pri ukončení štúdie v kontrolách a kontrolách s aplikáciou rozpúšťadla (ak sa používajú) má dosiahnuť $1,0 \pm 0,2$, resp. $11,5 \pm 3$ g.

13. Odporúča sa, aby boli na analýzu k dispozícii najmenej tri úrovne koncentrácie chemikálie s tromi nenarušenými replikátmi, hoci to nepredstavuje kritérium platnosti. Nadmerná mortalita v rámci testovanej skupiny je vymedzená > 4 úhynmi (> 20 %) najmenej v 2 replikátoch, ktoré nemožno vysvetliť technickou chybou. Na analýzu musia byť k dispozícii aspoň tri úrovne koncentrácie chemikálie bez zjavnej toxicity. Medzi známky zjavnej toxicity môže okrem iného patriť plávanie na povrchu, ležanie na dne nádrže, obrátené alebo nepravidelné plávanie, nevychádzanie na hladinu a nereagovanie na podnety, ako aj morfológické abnormality (napr. deformácie končatín), hemoragické lézie a opuch brucha.

14. Ak sa zistí odchýlka od kritérií platnosti testu, dôsledky by sa mali posudzovať s ohľadom na spoľahlivosť výsledkov testu a tieto odchýlky a úvahy by mali byť zahrnuté do správy o teste.

OPIS METÓD

Prístroje

15. Bežné laboratórne vybavenie a najmä tieto zariadenia:

- a) prístroje na reguláciu teploty (napr. ohrievače alebo chladiče nastaviteľné na teplotu 21 ± 1 °C);
- b) teplomer;
- c) binokulárny stereoskopický mikroskop a pitevné nástroje;
- d) digitálna kamera s rozlíšením aspoň 4 megapixely a s funkciou mikro (v prípade potreby);
- e) analytické váhy schopné vážiť na 0,001 mg alebo 1 µg;
- f) zariadenia na meranie koncentrácie rozpusteného kyslíka a pH;
- g) prístroj na meranie intenzity svetla schopný merať v luxoch.

Voda

Zdroj a kvalita

16. Môže sa použiť akákoľvek voda na riedenie, ktorá je lokálne dostupná (napr. pramenitá voda alebo voda z vodovodu filtrovaná cez uhlie) a umožňuje normálny rast a vývoj druhu *X. laevis*, pričom má byť k dispozícii dôkaz o normálnom raste v danej vode. Keďže kvalita miestnej vody sa môže medzi jednotlivými oblasťami výrazne líšiť, mala by sa vykonať analýza kvality vody, najmä ak nie sú dostupné historické údaje o použiteľnosti vody na chov lariev obojživelníkov. Ak je známe, že voda na riedenie má relatívne stálu kvalitu, stačí, ak sa v nej pred začiatkom testovania a/alebo napríklad raz za šesť mesiacov zmeria obsah ťažkých kovov (napríklad Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), hlavných aniónov a kationov (napríklad Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), pesticídov, celkový obsah organického uhlíka a nerozpustných pevných látok. Niektoré chemické vlastnosti vody vhodnej na riedenie sú uvedené v dodatku 2.

Koncentrácia jodidu vo vode na testovanie

17. Na to, aby mohla v štítnej žľaze prebiehať syntéza hormónov štítnej žľazy na podporu normálnej metamorfózy, majú mať larvy k dispozícii dostatok jodidu z kombinácie zdrojov

vo vode a v potrave. V súčasnosti neexistujú empiricky odvodené usmernenia v súvislosti s minimálnymi koncentráciami jodidu v potrave alebo vo vode na to, aby sa zabezpečil správny vývoj. Dostupnosť jodidu však môže ovplyvniť schopnosť systému štítnej žľazy reagovať na látky pôsobiace v štítnej žľaze a je známe, že jodid reguluje základnú činnosť štítnej žľazy, čo si zasluhuje pozornosť pri interpretácii výsledkov histopatologického vyšetrenia štítnej žľazy. Na základe predchádzajúcich prác sa správna výkonnosť skúšky preukázala v rozsahu koncentrácií jodidu (I^-) vo vode na riedenie od 0,5 do 10 $\mu\text{g/l}$. V ideálnom prípade má byť minimálna koncentrácia jodidu vo vode na riedenie počas celého testu 0,5 $\mu\text{g/l}$ (pridáva sa ako sodná alebo draselná soľ). Ak sa voda na testovanie rekonštituuje z deionizovanej vody, mal by sa pridať jód v minimálnej koncentrácii 0,5 $\mu\text{g/l}$. Je potrebné uviesť namerané koncentrácie jodidu vo vode na testovanie (t. j. vode na riedenie) a doplnenie jodidu alebo iných solí do vody na testovanie (ak sa použilo). Okrem vody na testovanie možno obsah jodidu merať aj v potrave.

Expozičný systém

18. Test bol navrhnutý pomocou prietokového systému s riedením. Zložky systému, ktoré prichádzajú do kontaktu s vodou, majú byť zo skla, z nehrdzavejúcej ocele a/alebo iných chemicky inertných materiálov. Expozičné nádrže sú akváriá zo skla alebo z nehrdzavejúcej ocele a využiteľný objem nádrže je od 4,0 do 10,0 l (minimálna hĺbka vody 10 až 15 cm). Systém má byť schopný umožniť použitie všetkých expozičných koncentrácií, kontroly a v prípade potreby kontroly s aplikáciou rozpúšťadla, ako aj štyroch replikátov na skupinu s aplikovanou chemikáliou a ôsmich replikátov v kontrolách. Prietok v každej nádrži má byť konštantný, aby bolo možné udržiavať biologické podmienky aj expozíciu chemikálii. Odporúča sa, aby sa použili vhodné prietoky (napr. najmenej 5 výmen obsahu nádrží denne) s cieľom predísť poklesu koncentrácie chemikálie v dôsledku metabolizmu testovaných organizmov aj vodných mikroorganizmov, ktoré sa vyskytujú v akváriách, alebo v dôsledku abiotických ciest degradácie (hydrolýza, fotolýza) alebo disipácie (prchavosť, sorpcia). Testovacie nádrže by sa mali náhodne prideliť na určitú pozíciu v expozičnom systéme, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy pozície vrátane miernych odchýlok v teplote, intenzite svetla atď. Ďalšie informácie o inštalácii prietokových expozičných systémov sa nachádzajú v štandardnom usmernení ASTM na vykonávanie testov akútnej toxicity na testovaných materiáloch pre ryby, makrobezstavovce a obojživelníky (16).

Aplikovanie chemikálie: príprava testovaných roztokov

19. Na prípravu testovaných roztokov v expozičnom systéme sa zásobný roztok testovanej chemikálie dávkuje do expozičného systému pomocou vhodného čerpadla alebo iného

zariadenia. Prietok zásobného roztoku sa kalibruje v súlade s analytickým potvrdením testovaných roztokov pred začiatkom expozície a počas testu sa pravidelne kontroluje z hľadiska objemu. Objem testovaného roztoku v každej komore sa obnovuje minimálne päťkrát denne.

20. Metódy používané na aplikovanie testovanej chemikálie do systému sa môžu líšiť v závislosti od jej fyzikálno-chemických vlastností. Preto je pred testom potrebné získať základné informácie o chemikálii relevantné z hľadiska určenia testovateľnosti. Medzi užitočné informácie o špecifických vlastnostiach testovanej chemikálie patrí štruktúrny vzorec, molekulová hmotnosť, čistota, stabilita vo vode a na svetle, hodnoty pK_a a K_{ow} , rozpustnosť vo vode (prednostne v testovacom médiu) a tlak pár, ako aj výsledky testu ľahkej biologickej odbúrateľnosti [testovacia metóda C.4 (17) alebo C.29 (18)]. Rozpustnosť a tlak pár možno použiť na výpočet Henryho konštanty, ktorá bude udávať, či môže dôjsť k stratám v dôsledku vyparovania testovanej chemikálie. Uskutočnenie tohto testu bez vyššie uvedených informácií je potrebné dôkladne zvážiť, keďže koncepcia štúdie je závislá od fyzikálno-chemických vlastností testovanej chemikálie a bez týchto údajov môže byť náročné interpretovať výsledky testu alebo tieto výsledky nemusia byť zmysluplné. Na kvantifikáciu testovanej chemikálie v testovaných roztokoch je potrebné mať spoľahlivú analytickú metódu so známou a uvedenou presnosťou a detekčným limitom. Testované chemikálie rozpustné vo vode možno rozpustiť v alikvotných častiach vody na riedenie v koncentrácii, ktorá umožňuje aplikovanie pri cieľovej testovanej koncentrácii v prietokovom systéme. Pri chemikáliách, ktoré sú kvapalné alebo tuhé pri izbovej teplote a stredne rozpustné vo vode, sa môžu vyžadovať saturačné kolóny typu kvapalina – kvapalina alebo kvapalina – tuhá látka (napríklad kolóna so sklenou vatou) (19). Hoci môže existovať aj možnosť podávania dávok veľmi hydrofóbných testovaných chemikálií prostredníctvom krmiva, v rámci tejto skúšky existujú len obmedzené skúsenosti s touto expozičnou cestou.
21. Testované roztoky vybraných koncentrácií sa pripravujú riedením zásobného roztoku. Zásobný roztok sa má podľa možnosti pripraviť jednoduchým miešaním alebo pretrepávaním testovanej chemikálie vo vode na riedenie mechanickým prostriedkom (napr. miešadlom a/alebo ultrazvukom). Na dosiahnutie vhodne koncentrovaného zásobného roztoku možno použiť saturačné kolóny/systémy alebo pasívne dávkovacie metódy (20). Uprednostňuje sa použitie testovacieho systému bez kosolventu, rôzne testované chemikálie však budú mať odlišné fyzikálno-chemické vlastnosti, ktoré si pravdepodobne budú vyžadovať rôzne prístupy k príprave vody na expozíciu chemikáliám. Je potrebné vyvinúť všetko úsilie na to, aby sa zabránilo použitiu rozpúšťadiel alebo nosičov, pretože: 1. určité rozpúšťadlá môžu samy osebe spôsobovať toxicitu a/alebo

nežiaduce alebo neočakávané reakcie; 2. testovanie chemikálií nad hranicou ich rozpustnosti vo vode (k čomu môže často dôjsť pri použití rozpúšťadiel) môže viesť k nepresnému stanoveniu účinných koncentrácií; 3. použitie rozpúšťadiel v dlhodobějších testoch môže spôsobiť vznik značného stupňa biofilmu v súvislosti s mikrobiálnou aktivitou, ktorý môže mať vplyv na podmienky prostredia, ako aj na schopnosť udržať expozičné koncentrácie; a 4. v prípade, že neexistujú historické údaje, z ktorých vyplýva, že rozpúšťadlo neovplyvňuje výsledok štúdie, pri použití rozpúšťadiel sa vyžaduje použitie kontroly s aplikáciou rozpúšťadla, čo má významné dôsledky z hľadiska dobrých životných podmienok zvierat, keďže sú na uskutočnenie testu potrebné ďalšie zvieratá. V prípade ťažko testovateľných chemikálií možno rozpúšťadlo použiť ako poslednú možnosť, pričom na stanovenie najlepšej metódy je potrebné prečítať si usmerňovací dokument OECD o testovaní toxicity ťažko testovateľných látok a zmesí vo vodnom prostredí (21). Rozpúšťadlo sa vyberie na základe chemických vlastností testovanej chemikálie a dostupnosti historických údajov o kontrolách v súvislosti s rozpúšťadlom. Pokiaľ nie sú dostupné historické údaje, vhodnosť rozpúšťadla sa musí stanoviť pred uskutočnením konečnej štúdie. V prípade, že sa nemožno vyhnúť použitiu rozpúšťadla a vyskytne sa mikrobiálna aktivita (vznik biofilmu), počas celého testu sa odporúča v jednotlivých nádržiach (najmenej raz za týždeň) zaznamenávať vznik biofilmu/podávať správy o jeho vzniku. Koncentrácia rozpúšťadla má byť v ideálnom prípade v kontrole s aplikáciou rozpúšťadla a vo všetkých testovacích vzorkách konštantná. Ak sa neudržiava konštantná koncentrácia rozpúšťadla, v kontrole s aplikáciou rozpúšťadla sa má použiť najvyššia koncentrácia rozpúšťadla v testovacej vzorke. V prípadoch, keď sa použije nosič s rozpúšťadlom, nemajú maximálne koncentrácie rozpúšťadla prekročiť 100 µl/l alebo 100 mg/l (21) a odporúča sa udržiavať koncentráciu rozpúšťadla čo najnižšiu (napr. ≤ 20 µl/l), aby sa predišlo potenciálnym účinkom rozpúšťadla na merané sledované parametre (22).

Pokusné zvieratá

Testovaný druh

22. Testovaný druh je *X. laevis*, pretože: 1. sa bežne kultivuje v laboratóriách na celom svete; 2. možno ho jednoducho získať prostredníctvom komerčných dodávateľov a 3. umožňuje stanovenie genetického pohlavia.

Párenie dospelých jedincov a starostlivosť o ne

23. Správna starostlivosť o druh *X. laevis* a jeho párenie sa opisuje v štandardizovaných usmerneniach (23). Umiestnenie a starostlivosť o druh *X. laevis* sa opisuje aj v zdroji: Read (24). Na vyvolanie párenia sa trom až piatim párom dospelých samíc a samcov intraperitoneálne vstrekuje ľudský chorionický gonadotropín (hCG). Samiciam sa vstrekuje približne 800 – 1 000 IU a samcom približne 500 – 800 IU hCG rozpusteného v 0,6 – 0,9 % fyziologickom roztoku (alebo Ringerovom roztoku pre žaby, čo je izotonický fyziologický roztok na použitie pri obojživelníkoch www.hermes.mbl.edu/biologicalbulletin/compendium/comp-RGR.html). Dávkovaný objem má byť približne 10 µl/g telesnej hmotnosti (~1 000 µl). Páry, pri ktorých sa vyvolalo párenie, sa následne držia vo veľkých nádržiach nerušené a za statických podmienok, aby sa podporil amplexus. Na spodku každej rozmnožovacej nádrže by malo byť falošné dno tvorené sitom z nehrdzavejúcej ocele (napríklad s otvormi s veľkosťou 1,25 cm), ktoré umožňuje padanie vajíčok na spodok nádrže. Žaby, ktorým bol vstreknutý hCG neskoro popoludní, zvyčajne nakladú väčšinu vajíčok do polovice dopoludnia nasledujúceho dňa. Po uvoľnení a oplodnení dostatočného množstva vajíčok je potrebné vybrať dospelé jedince z rozmnožovacích nádrží. Vajíčka sa potom zozbierajú a odstráni sa z nich rôsolovitý povlak ošetrením pomocou L-cysteínu (23). Pripraví sa 2 % roztok L-cysteínu a hodnota pH sa upraví na 8,1 pomocou NaOH s koncentráciou 1 M. Tento roztok s teplotou 21 °C sa pridá do Erlenmeyerovej banky s objemom 500 ml, v ktorej sa nachádzajú vajíčka z jednej znášky, a jemnými krúživými pohybmi sa mieša jednu až dve minúty a potom sa dôkladne premyje 6 až 8 ráz kultivačnou vodou s teplotou 21 °C. Vajíčka sa potom prenesú na kryštalizačnú misku a stanovia sa, či dosahujú > 70 % životaschopnosť s minimálnymi abnormalitami pri embryách, v ktorých dochádza k deleniu buniek.

KONCEPCIA TESTU

Testované koncentrácie

24. Odporúča sa použiť najmenej štyri koncentrácie chemikálie a vhodné kontroly (v prípade potreby vrátane kontrol s aplikáciou rozpúšťadla). Vo všeobecnosti sa odporúča odstup koncentrácií (faktor odstup), ktorý neprekračuje hodnotu 3,2.
25. Na účely tohto testu sa majú, pokiaľ je to možné, použiť výsledky existujúcich štúdií týkajúcich sa obojživelníkov na stanovenie najvyššej testovanej koncentrácie, aby sa predišlo koncentráciám, ktoré sú zjavne toxické. K stanoveniu takejto koncentrácie môžu prispieť napríklad informácie z kvantitatívnych vzťahov štruktúry a aktivity, prevzatých

údajov a údajov z existujúcich štúdií týkajúcich sa obojživelníkov, napríklad zo skúšky metamorfózy obojživelníkov, testovacej metódy C.38 (25) a skúšky teratogenézy žabích embryí – *Xenopus* (23) a/alebo z testov na rybách, napr. testovacích metód C.48, C.41 a C.49 (26) (27) (28). Pred uskutočnením skúšky LAGDA sa môže vykonať pokus na zistenie rozsahu. Odporúča sa, aby sa expozícia na zistenie rozsahu začala do 24 hodín po oplodnení a trvala 7 až 14 dní (alebo v prípade potreby dlhšie) a aby sa testované koncentrácie stanovili tak, že intervaly medzi nimi neprekračujú faktor 10. Výsledky pokusu na zistenie rozsahu slúžia na stanovenie najvyššej testovanej koncentrácie v skúške LAGDA. Ak sa má použiť rozpúšťadlo, možno v rámci štúdie na zistenie rozsahu stanoviť vhodnosť rozpúšťadla (t. j. či môže mať vplyv na výsledok štúdie).

Replikáty v rámci testovaných skupín a kontrol

26. Použiť sa majú najmenej štyri nádrže s replikátom na testovanú koncentráciu a najmenej osem replikátov pre kontroly (a v prípade potreby pre kontrolu s aplikáciou rozpúšťadla) (t. j. počet replikátov v kontrole a akejkolvek kontrole s aplikáciou rozpúšťadla má predstavovať dvojnásobok počtu replikátov v každej testovanej skupine, aby sa zabezpečila vhodná štatistická váha). V každom replikáte má byť najviac 20 zvierat. Minimálny počet skúmaných zvierat má byť 15 (5 v podvzorku v NF štádiu 62 a 10 juvenilných jedincov). Do každého replikátu sa však pridávajú ďalšie zvieratá, aby sa zohľadnila možnosť úhynu a zároveň sa zachoval kritický počet 15 jedincov.

POSTUP

Prehľad skúšky

27. Skúška sa začína s novovyprodukovanými embryami (NF štádium 8 – 10) a pokračuje až do obdobia juvenilného vývoja. Pri zvieratách sa denne kontroluje mortalita a akékoľvek príznaky abnormálneho správania. V NF štádiu 62 sa získa podvzorka jedincov v larválnom štádiu (do 5 zvierat na replikát) a skúmajú sa rôzne sledované parametre (tabuľka 1). Keď ako všetky zvieratá dosiahnu NF štádium 66, t. j. dokončila sa metamorfóza (alebo 70 dní od začiatku skúšky, podľa toho, čo nastane skôr), vykoná sa náhodná selekcia (avšak bez odberu podvzoriek), aby sa znížil počet zvierat (10 na nádrž) (pozri odsek 43), a expozícia zvyšných zvierat pokračuje až do 10 týždňov po mediáne času do NF štádia 62 v kontrole. Pri ukončení testu (odber vzoriek juvenilných jedincov) sa uskutočnia dodatočné merania (tabuľka 1).

Podmienky expozície

28. Úplný súhrn parametrov testu sa uvádza v dodatku 3. Počas obdobia expozície je potrebné denne merať koncentráciu rozpusteného kyslíka, teplotu a pH testovaných roztokov. Raz mesačne sa meria vodivosť, alkalita a tvrdosť. Pokiaľ ide o teplotu vody testovaných roztokov, rozdiely medzi replikátmi a medzi testovanými skupinami by (v rámci jedného dňa) nemali byť väčšie ako 1,0 °C. V prípade pH testovaných roztokov nemajú byť rozdiely medzi replikátmi a medzi testovanými skupinami väčšie ako 0,5.
29. Expozičné nádrže sa môžu denne odsávať, aby sa odstránila neskonsumovaná potrava a odpadové produkty, pričom treba postupovať opatrne, aby nedošlo ku krížovej kontaminácii nádrží. Je potrebné minimalizovať stres a traumatizovanie zvierat, obzvlášť počas premiestňovania, čistenia akvárií a manipulácie. Je potrebné vyhýbať sa stresujúcim podmienkam/činnostiam, ako je silný a/alebo nepretržitý hluk, búchanie na akváriá či vibrácie v nádrži.

Dĺžka expozície testovanej chemikálie

30. Expozícia sa začína s novovyprodukovanými embryami (NF štádium 8 – 10) a pokračuje až do 10 týždňov po mediáne času do NF štádia 62 (≤ 45 dní od začiatku skúšky) v kontrolnej skupine. Skúška LAGDA vo všeobecnosti trvá 16 týždňov (maximálne 17 týždňov).

Začiatok skúšky

31. V prípade rodičovských zvierat použitých na začatie skúšky je potrebné preukázať, že už mali potomstvo, pri ktorom bolo možné odlišiť genetické pohlavie (dodatok 5). Po trení dospelých jedincov sa embryá zozbierajú, ošetrí sa cysteínom, aby sa odstránil rôsolovitý povlak, a overí sa ich životaschopnosť (23). Vďaka ošetrovaniu cysteínom možno počas skríningu manipulovať s embryami bez toho, aby sa prichytávali k povrchom. Skrínung sa uskutočňuje pod stereoskopickým mikroskopom, pričom sa pomocou očného kvapkadla vhodnej veľkosti odstráni neživotaschopné embryá. Uprednostňuje sa, aby sa v rámci testu použila jedna znáška so životaschopnosťou vyššou ako 70 %. Embryá v NF štádiu 8 – 10 sa náhodne rozdelia do expozičných testovacích nádrží, ktoré obsahujú vhodný objem vody na riedenie, až kým každá nádrž nebude obsahovať 20 embryí. S embryami sa počas tohto prenosu musí manipulovať opatrne, aby sa minimalizoval stres pri manipulácii a aby nedošlo k poraneniu. 96 hodín po oplodnení by sa žubrienky mali premiestniť nahor vo vodnom stĺpci a začať sa prichytávať k stenám nádrže.

Kŕmny režim

32. Zmeny krmiva a dávky potravy počas rôznych vývojových štádií druhu *X. laevis* predstavujú veľmi dôležitý aspekt protokolu LAGDA. Nadmerné kŕmenie počas larválnej fázy zvyčajne vedie k zvýšenému výskytu a závažnosti skoliózy (dodatok 8) a je potrebné mu predchádzať. Na druhej strane, nedostatočné kŕmenie počas larválnej fázy vedie k veľmi premenlivému tempu vývoja medzi kontrolami, čo môže potenciálne viesť k narušeniu štatistickej váhy alebo zneprehľadneniu výsledkov testu. V dodatku 4 s uvádza odporúčaná potrava a režimy kŕmenia pre druh *X. laevis* v larválnom a juvenilnom štádiu v prietokových podmienkach, prípustné sú však aj alternatívy za predpokladu, že testované organizmy uspokojivo rastú a vyvíjajú sa. Je dôležité poznamenať, že ak sa merajú sledované parametre špecifické pre endokrinný systém, v potrave sa nemajú nachádzať látky s účinkom na endokrinný systém, napríklad sójový šrot.

Kŕmenie lariev

33. Odporúčaná potrava pre larvy obsahuje štartovacie krmivo pre pstruhy, disky z rias *Spirulina* a lupienky potravy pre karasa zlatého (napr. vločky TetraFin®, Tetra, Nemecko) zmiešané v kultivačnej vode (alebo vo vode na riedenie). Táto zmes sa podáva trikrát denne v pracovných dňoch a raz denne počas víkendov. Žubrienky sa kŕmia aj živými 24-hodinovými naupliami žiabronôžky soľnej rodu *Artemia*, a to dvakrát denne počas pracovných dní a raz denne počas víkendov od 8. dňa po oplodnení. Kŕmenie lariev má byť zhodné v jednotlivých testovacích nádobách a má umožňovať primeraný rast a vývoj pokusných zvierat, aby sa zabezpečila reprodukovateľnosť a prenosnosť výsledkov skúšky: 1. medián času do NF štádia 62 v kontrolách má byť ≤ 45 dní a 2. odporúča sa priemerná hmotnosť v rozsahu $1,0 \pm 0,2$ g v NF štádiu 62 v kontrolách.

Kŕmenie juvenilných jedincov

34. Po dokončení metamorfózy sa kŕmny režim skladá z prémiového vodného krmiva pre žaby, napr. Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, FL, USA) (dodatok 4). V prípade malých žiab (juvenilných jedincov v ranom štádiu) sa pelety krátko pomelú v mlynčeku na kávu, mixéri alebo sa rozdrvia pomocou trecej misky a paličky, aby sa zmenšila ich veľkosť. Keď juvenilné jedince dosiahnu dostatočnú veľkosť nato, aby mohli konzumovať celé pelety, mletie alebo drvenie už nie je potrebné. Zvieratá sa kŕmia raz denne. Kŕmenie juvenilných jedincov má umožňovať primeraný rast a vývoj organizmov: v prípade kontrolných juvenilných jedincov sa odporúča priemerná hmotnosť v rozsahu $11,5 \pm 3$ g pri ukončení štúdie.

Analytická chémia

35. Pred začatím skúšky by sa mala stanoviť stabilita testovanej chemikálie (napr. rozpustnosť, odbúrateľnosť a prchavosť) a všetky potrebné analytické metódy, napríklad na základe existujúcich informácií a vedomostí. Pri dávkovaní prostredníctvom vody na riedenie sa pred začatím testu odporúča analyzovať testované roztoky z každej koncentrácie z nádrže replikátu, aby sa overila výkonnosť systému. Počas obdobia expozície sa koncentrácie testovanej chemikálie stanovujú vo vhodných intervaloch, podľa možnosti každý týždeň najmenej v jednom replikáte v každej testovanej skupine so striedaním medzi replikátmi v tej istej testovanej skupine každý týždeň. Odporúča sa, aby výsledky vychádzali z nameraných koncentrácií. V prípade, že koncentrácia testovanej chemikálie v roztoku bola uspokojivo udržiavaná v rozsahu ± 20 % nominálnej koncentrácie počas celého testu, výsledky môžu vychádzať buď z nominálnych, alebo z nameraných hodnôt. V každej koncentrácii sa má okrem toho počas celého testovacieho obdobia udržiavať variačný koeficient (CV) nameraných testovaných koncentrácií v rámci testovanej skupiny na úrovni 20 % alebo menej. Keď namerané koncentrácie nezostanú v rozsahu 80 až 120 % nominálnej koncentrácie (napr. pri testovaní chemikálií s vysokou mierou biodegradácie alebo adsorpcie), účinná koncentrácia sa má stanoviť a vyjadriť vzhľadom na aritmetický priemer koncentrácie v prietokových testoch.
36. Počas trvania expozície sa prietok vody na riedenie a zásobného roztoku kontroluje vo vhodných intervaloch (napr. trikrát týždenne). V prípade chemikálií, ktoré nemožno detegovať pri niektorých alebo pri všetkých nominálnych koncentráciách (napríklad z dôvodu rýchlej degradácie alebo adsorpcie v testovacích nádobách alebo z dôvodu značnej akumulácie chemikálie v telách exponovaných zvierat), sa odporúča, aby sa miera obnovovania testovaného roztoku v každej komore prispôbila tak, aby sa testované koncentrácie udržiavali čo najkonštantnejšie.

Pozorovania a merania sledovaných parametrov

37. Medzi sledované parametre, ktoré sa hodnotia v priebehu expozície, patria tie, ktoré signalizujú toxicitu vrátane mortality, abnormálneho správania, ako sú klinické príznaky choroby a/alebo všeobecnej toxicity, a parametrov stanovenia rastu (dĺžka a hmotnosť), ako aj sledované parametre z hľadiska patológie, ktoré môžu predstavovať reakciu na spôsoby účinku z hľadiska všeobecnej toxicity a spôsoby účinku na endokrinný systém s pôsobením na dráhy sprostredkované estrogénom, androgénom alebo štítnou žľazou. Navyše sa pri ukončení štúdie môže voliteľne merať koncentrácia VTG v plazme. Meranie VTG môže byť užitočné pri porozumení výsledkom štúdie v kontexte endokrinných mechanizmov pri chemikáliách, pri ktorých existuje podozrenie, že predstavujú endokrinné disruptory (EDC). Sledované parametre a harmonogram meraní sú zhrnuté v tabuľke 1.

Tabuľka 1: Prehľad sledovaných parametrov v skúške LAGDA

Sledované parametre*	Denne	Predbežný odber vzoriek (Odber vzoriek jedincov v larválnom štádiu)	Ukončenie testu (Odber vzoriek juvenilných jedincov)
Mortalita a abnormality	X		
Čas do NF štádia 62		X	
Histo(pato)ológia (štítna žľaza)		X	
Morfometrika (rast z hľadiska hmotnosti a dĺžky)		X	X
Index pomeru hmotnosti pečene k hmotnosti tela (LSI)			X
Genotypové/fenotypové pomery pohlaví			X
Histopatológia (gonády, reprodukčné trubice, oblička a pečeň)			X
Vitelogenín (VTG) (voliteľné)			X

* Všetky sledované parametre sa analyzujú štatisticky.

Mortalita a denné pozorovania

38. Všetky testovacie nádrže sa musia každý deň kontrolovať, či v nich nie sú zvieratá, pričom v každej nádrži sa zaznamenáva uhynuté mortalita. Mŕtve zvieratá sa musia z nádrže odstrániť ihneď po zistení úhynu. Vývojové štádium uhynutých zvierat sa kategorizuje ako NF štádium skoršie ako 58 (pred vyvinutím predných končatín), NF štádium 58 – NF štádium 62, NF štádium 63 – NF štádium 66 (od NF štádia 62 po úplnú absorpciu chvosta) a obdobie po NF štádiu 66 (ukončené larválne štádium). Mortalita presahujúca 20 % môže znamenať nevhodné testovacie podmienky alebo zjavne toxické účinky testovanej chemikálie. Zvieratá sú zvyčajne najviac citlivé z hľadiska mortality, ktorá nie je vyvolaná chemikáliami, počas prvých dní vývoja po trení a počas vrcholu metamorfózy. Takáto mortalita môže byť zrejme z kontrolných údajov.
39. Okrem toho je potrebné zaznamenať akékoľvek známky abnormálneho správania, zreteľne viditeľné malformácie (napr. skolióza) alebo lézie. Pozorované výskyty skoliózy je potrebné spočítať (incidencia) a ohodnotiť z hľadiska závažnosti (napr. nepozorovaná – NR, minimálna – 1, mierna – 2, závažná – 3; dodatok 8). Je potrebné usilovať sa o to, aby sa v rámci celej štúdie obmedzila prevalencia miernej a závažnej skoliózy (napr. menej ako

10 % v kontrolách), hoci vyššia prevalencia abnormalít v kontrolách nemusí byť nevyhnutne dôvodom na ukončenie testu. Normálne správanie jedincov v larválnom štádiu je charakterizované rozptýlením vo vodnom stĺpci s chvostom vztýčeným nad hlavou, pravidelným rytmickým pohybom chvostovou plutvou, pravidelným vychádzaním na hladinu, vytvorením žiabrových viečok a reagovaním na podnety. Abnormálne správanie zahŕňa napríklad plávanie na povrchu, ležanie na dne nádrže, obrátené alebo nepravidelné plávanie, nevychádzanie na hladinu a nereagovanie na podnety. V prípade zvierat, pri ktorých prebehla metamorfóza, sa okrem takéhoto abnormálneho správania majú zaznamenať aj výrazné rozdiely v príjme potravy. Zreteľné malformácie a lézie môžu okrem iného zahŕňať morfológické abnormality (napr. deformácie končatín), hemoragické lézie, opuch brucha a bakteriálne alebo plesňové infekcie. Výskyt lézií na hlave juvenilných jedincov bezprostredne za nozdrami môže naznačovať nedostatočnú úroveň vlhkosti. Tieto stanovenia sú kvalitatívne a mali by sa považovať za podobné klinickým príznakom ochorenia/stresu a porovnať s kontrolnými zvieratami. Ak je miera výskytu v exponovaných nádržiach vyššia ako v kontrolných nádržiach, malo by sa to považovať za dôkaz zjavnej toxicity.

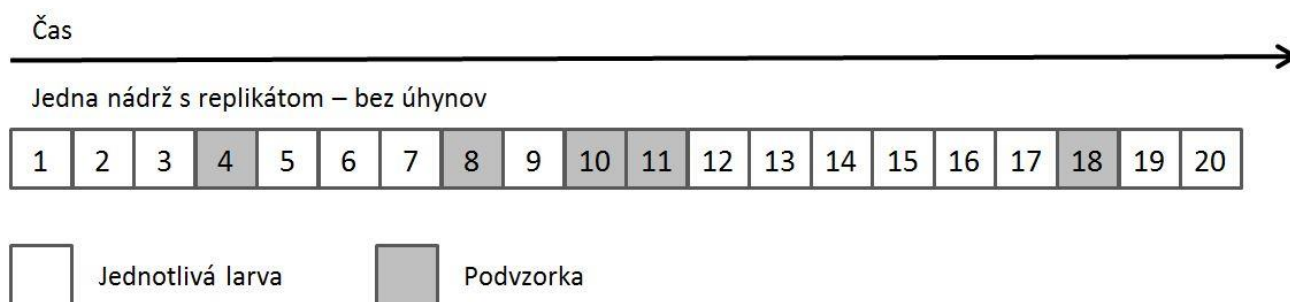
Odber podvzoriek jedincov v larválnom štádiu

Prehľad odberu podvzoriek jedincov v larválnom štádiu:

40. Žubrienky, ktoré dosiahli NF štádium 62, sa vyberú z nádrží a buď sa z nich odoberú vzorky, alebo sa presunú do nasledujúcej časti expozície v novej nádrži, prípadne sa fyzicky oddelia od zvyšných žubrienok v rovnakej nádrži pomocou oddeľovača. Denne sa vykonáva kontrola žubrienok a zaznamená sa deň štúdie, v ktorom jednotlivá žubrienka dosiahla NF štádium 62. Určujúcou charakteristikou, ktorá sa použije pri tomto posúdení, je tvar hlavy. Keď sa veľkosť hlavy zmenší tak, že má na pohľad približne rovnakú šírku ako trup žubrienky, a predné končatiny sa nachádzajú na úrovni stredu srdca, pri danom jedincovi sa zaznamená dosiahnutie NF štádia 62.
41. Cieľom je odobrať vzorku obsahujúcu celkovo päť žubrienok v NF štádiu 62 na nádrž s replikátom. Postupuje sa pri tom celkom náhodne, rozhodnutie je však potrebné uskutočniť *a priori*. Hypotetický príklad nádrže s replikátom je uvedený na **obrázku 1**. Ak sa v čase, keď prvý jedinec dosiahne NF štádium 62, v príslušnej nádrži nachádza 20 žubrienok, ktoré prežili, vyberie sa päť náhodných čísel z rozsahu 1 – 20. Žubrienka č. 1 je prvý jedinec, ktorý dosiahol NF štádium 62, a žubrienka č. 20 je posledný jedinec v nádrži, ktorý dosiahol NF štádium 62. Podobne, ak je v príslušnej nádrži 18 žubrienok, ktoré prežili, vyberie sa päť náhodných čísel z rozsahu 1 – 18. Tento postup sa uskutoční v každej nádrži s replikátom, keď prvý jedinec v teste dosiahne NF štádium 62. Ak počas

odberu vzoriek v NF štádiu 62 dôjde k úhynom, zvyšné vzorky je potrebné opätovne randomizovať na základe počtu zostávajúcich lariev, ktoré ešte nedosiahli NF štádium 62, a na základe toho, koľko ďalších vzoriek je potrebných, aby sa dosiahlo celkovo päť vzoriek z daného replikátu. V deň, keď žubrienka dosiahne NF štádium 62, sa na základe pripravenej schémy na odber vzoriek stanoví, či sa daný jedinec vyberie do vzorky alebo či sa fyzicky oddelí od zvyšných žubrienok na účely pokračovania expozície. V uvedenom príklade (obrázok 1) sa prvý jedinec, ktorý dosiahne NF štádium 62 (t. j. políčko č. 1), fyzicky oddelí od ostatných lariev a pokračuje jeho expozícia, pritom sa zaznamená deň štúdie, v ktorom tento jedinec dosiahol NF štádium 62. Následne sa pri jedincoch č. 2 a č. 3 postupuje rovnako ako v prípade jedinca č. 1 a potom sa jedinec č. 4 vyberie do vzorky na posúdenie rastu a histológie štítnej žľazy (podľa tohto príkladu). V tomto postupe sa pokračuje, až kým sa nedospeje k 20. jedincovi, ktorý sa buď zaradí k ostatným jedincom po NF štádiu 62, alebo sa vyberie do vzorky. Musí sa použiť taký náhodný postup, aby bola pri každom testovanom organizme rovnaká pravdepodobnosť, že bude vybratý. To možno dosiahnuť použitím akejkoľvek randomizačnej metódy, ale vyžaduje sa, aby sa každá žubrienka vybrala sieťkou v určitom bode počas obdobia odberu podvzoriek v NF štádiu 62.

Obrázok 1: Hypotetický príklad režimu odberu vzoriek v NF štádiu 62 pre jednu nádrž s replikátom.



42. Pri odbere podvzoriek jedincov v larválnom štádiu sa získavajú tieto sledované parametre:
1. čas do NF štádia 62 (t. j. počet dní od oplodnenia po dosiahnutie NF štádia 62);
 - 2.

vonkajšie abnormality; 3. morfometrika (napr. hmotnosť a dĺžka) a 4. histológia štítnej žľazy.

Humánne usmrcovanie žubrienok

43. Podvzorka žubrienok v NF štádiu 62 (5 jedincov na replikát) sa usmrtí ponorením na 30 minút do vhodného množstva (napr. 500 ml) anestetického roztoku (napr. 0,3 % roztok MS-222, trikaín metán sulfonát, CAS 886-86-2). Roztok MS-222 sa tlmí pridaním bikarbonátu sodného na hodnotu pH približne 7,0, pretože netlmený roztok MS-222 je kyslý a dráždi kožu žiab, čo vedie k nedostatočnej absorpcii a nežiaducemu dodatočnému stresu, ktorému sú organizmy vystavené.
44. Pomocou ponornej sieťky sa žubrienka vyberie z pokusnej komory a preniesie sa (umiestni sa) do usmrcovacieho roztoku. Zviera je riadne usmrtené a pripravené na pitvu, keď nereaguje na externé stimuly, napríklad zovretie zadnej končatiny pomocou pinzety.

Morfometrika (hmotnosť a dĺžka)

45. Meranie vlhkej hmotnosti (s presnosťou na mg) a dĺžky od pysku po kloaku (SVL) (s presnosťou na 0,1 mm) pri každej žubrienke sa uskutočňuje hneď po tom, ako žubrienka prestane reagovať v dôsledku anestézie (obrázok 2a). Na meranie SVL z fotografie možno použiť softvér na obrazovú analýzu. Žubrienky možno pred vážením osušiť, aby sa z nich odstránila prebytočná voda. Po uskutočnení meraní veľkosti tela (hmotnosť a SVL) sa zaznamenajú alebo zapíšu zreteľné morfológické abnormality a/alebo klinické príznaky toxicity, napríklad skolióza (pozri dodatok 8), petechie a hemorágia, pričom sa odporúča vytvorenie digitálnej dokumentácie. Petechie sú malé červené alebo fialové krvné výrony v kožných kapilárach.

Odber a fixácia tkaniva

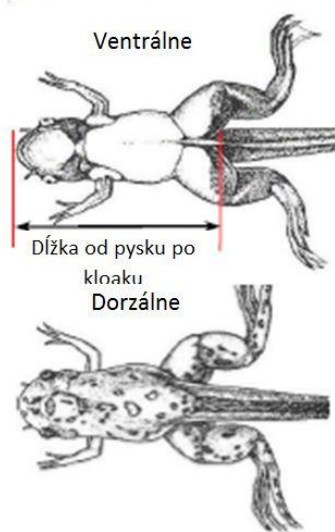
46. V prípade podvzorky jedincov v larválnom štádiu sa posudzujú štítne žľazy z hľadiska histológie. Spodná časť trupu za prednými končatinami sa odstráni a vyradí. Zvyšok tela zvieraťa sa zafixuje v Davidsonovom fixačnom prostriedku. Objem fixačného prostriedku v nádobe má predstavovať najmenej desaťnásobok približného objemu tkaniva. Na správnu fixáciu tkanív, ktoré sú predmetom záujmu, je potrebné zabezpečiť vhodné miešanie alebo cirkuláciu fixačného prostriedku. Všetky tkanivá zostávajú v Davidsonovom fixačnom prostriedku najmenej 48 hodín, nie však viac ako 96 hodín. Potom sa opláchnu deionizovanou vodou a uskladnia sa v 10 % neutrálnom tlmenom formalíne (1) (29).

Histológia štítnej žľazy

47. V prípade každej podvzorky jedincov v larválnom štádiu (zafixované tkanivá) sa vykoná histologické posúdenie štítnej žľazy, čo zahŕňa diagnostiku a hodnotenie závažnosti (29) (30).

Obrázok 2: Znaky na meranie dĺžky od pysku po kloaku pri skúške LAGDA pri jedincoch v NF štádiu 62 (a) a juvenilných žabách (b). Určujúce charakteristiky NF štádia 62 (a): hlava má rovnakú šírku ako trup, čuchový nerv je kratší ako priemer čuchového bulbu (dorzálny pohľad) a predné končatiny sú na úrovni srdca (ventrálny pohľad). Obrázky upravené zo zdroja Nieuwkoop a Faber (1994).

a) Odber podvzorky jedincov v larválnom



b) Odber vzorky juvenilných jedincov



Koniec larválnej expozície

48. Vzhľadom na počiatočný počet žubrienok sa očakáva, že medzi nimi pravdepodobne bude malý percentuálny podiel jedincov, ktoré sa nebudú normálne vyvíjať a v primeranom čase sa pri nich nedokončí metamorfóza (NF štádium 66). Larválne obdobie expozície nemá prekročiť 70 dní. Všetky žubrienky, ktoré zostanú na konci tohto obdobia, sa usmrtia (pozri odsek 43), odmeria sa ich vlhká hmotnosť a SVL, priradí sa im štádium podľa Nieuwkoopa a Fabera (1994) a zaznamenajú sa akékoľvek vývojové abnormality.

Selekcia po NF štádiu 66

49. Od NF štádia 66 (úplná resorpcia chvosta) sa pokračuje s desiatimi jedincami na nádrž až do ukončenia expozície. Po tom, ako všetky zvieratá dosiahnu NF štádium 66, alebo po 70

dňoch (podľa toho, čo nastane skôr) sa preto musí uskutočniť selekcia. Náhodne sa vyberú zvieratá po NF štádiu 66, pri ktorých sa nebude pokračovať v expozícii.

50. Zvieratá, ktoré sa nevyberú na účely pokračovania expozície, sa usmrtia (pozri odsek 43). Pri každom zvierati sa uskutočnia merania vývojového štádia, vlhkej hmotnosti a SVL (obrázok 2b), ako aj makroskopická pitva. Fenotypové pohlavie (na základe morfológie gonád) sa zaznamená ako samičie, samčie alebo neurčité.

Odber vzoriek juvenilných jedincov

Prehľad odberu vzoriek juvenilných jedincov

51. Expozícia zvyšných zvierat pokračuje až do dosiahnutia 10 týždňov po mediáne času do NF štádia 62 v kontrole s vodou na riedenie (a/alebo v kontrole s aplikáciou rozpúšťadla, ak je to relevantné). Na konci obdobia expozície sa zvyšné zvieratá (najviac 10 žiab na replikát) usmrtia a zmerajú/posúdia a zaznamenajú sa rôzne sledované parametre: 1. morfometrika (hmotnosť a dĺžka); 2. fenotypové/genotypové pomery pohlaví; 3. hmotnosť pečene (index pomeru hmotnosti pečene k hmotnosti tela); 4. histopatológia (gonády, reprodukčné trubice, oblička a pečeň) a voliteľne 5. VTG v plazme.

Humánne usmrcovanie žiab

52. Juvenilné žaby po uskutočnení metamorfózy sa usmrtia intraperitoneálnou injekciou anestetika, napr. 10 % MS-222 vo vhodnom fosfátovom tlmivom roztoku. Vzorky zo žiab sa môžu odobrať po tom, ako žaby prestanú reagovať (zvyčajne približne 2 minúty po injekčnom podaní, ak sa použije 10 % MS-222 s dávkovaním 0,01 ml na gram žaby). Hoci možno juvenilné žaby ponoriť do anestetika s vyššou koncentráciou (MS-222), zo skúseností vyplýva, že dosiahnutie anestézie trvá pomocou tejto metódy dlhšie a jej trvanie nemusí byť dostatočné na to, aby bolo možné odobrať vzorky. Injekčným podaním sa dosahuje účinné a rýchle usmrtenie pred odberom vzoriek. K odberu vzoriek sa pristúpi až vtedy, keď sa na základe absencie reakcií na podnety potvrdí, že žaby sú mŕtve. Ak sa na žabách prejavujú príznaky značného utrpenia (vo veľmi závažnej miere a je možné spoľahlivo predpokladať smrť) a zvieratá sa považujú za moribundné, je potrebné im podať anestetikum a usmrtiť ich a na účely analýzy údajov ich považovať za uhynuté. Ak sa žaba usmrtí v dôsledku morbiditu, zaznamená sa to a uvedie v správe. Žaba sa môže uchovať na účely histopatologickej analýzy (fixácia žaby na účely možnej histopatológie) v závislosti od toho, kedy počas štúdie dôjde k jej usmrteniu.

Morfometrika (hmotnosť a dĺžka)

53. Merania vlhkej hmotnosti a SVL (obrázok 2b) sú totožné s meraniami uvedenými pre odber podvzoriek jedincov v larválnom štádiu.

VTG v plazme (voliteľné)

54. VTG je všeobecne akceptovaný biologický marker vyskytujúci sa v dôsledku expozície estrogénovým chemikáliám. Pri skúške LAGDA sa VTG v plazme môže voliteľne merať v prípade vzoriek z juvenilných zvierat (obzvlášť relevantné to môže byť v prípade podozrenia, že testovaná chemikália má estrogénové pôsobenie).
55. Zadné končatiny usmrteného juvenilného jedinca sa narežú a krv sa odoberie pomocou heparinizovanej kapiláry (vhodné však môžu byť aj alternatívne metódy odberu krvi, napríklad punkcia srdca). Krv sa vytlačí do skúmavky mikroodstredivky (napr. s objemom 1,5 ml) a odstredovaním sa z nej získa plazma. Vzorky plazmy sa skladujú pri teplote –70 °C alebo nižšej až do stanovenia VTG. Koncentráciu VTG v plazme možno merať pomocou metódy enzýmového imunisorbentového stanovenia (ELISA) (dodatok 6) alebo pomocou alternatívnej metódy, napr. hmotnostnej spektrometrie (31). Kvôli vyššej citlivosti sa uprednostňujú druhovo špecifické protilátky.

Určenie genetického pohlavia

56. Genetické pohlavie každej juvenilnej žaby sa určuje na základe markerov, ktoré vyvinul Yoshimoto a kol. (11). Na účely určenia genetického pohlavia sa odoberie časť jednej zadnej končatiny (alebo celá zadná končatina), ktorá sa odstráni počas pitvy, a vloží sa do skúmavky mikroodstredivky (vzorky tkaniva zo žiab možno získať z akéhokoľvek tkaniva). Tkanivo možno skladovať pri teplote –20 °C alebo nižšej až do izolácie deoxyribonukleovej kyseliny (DNA). Na izoláciu DNA z tkanív možno použiť komerčne dostupné súpravy a analýza na stanovenie prítomnosti alebo neprítomnosti markera sa uskutočňuje metódou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) (dodatok 5). Súlad medzi histologicky zisteným pohlavím a genotypom medzi kontrolnými zvieratami v čase odberu vzoriek juvenilných jedincov v kontrolných skupinách je viac ako 95 %.

Odber a fixácia tkaniva na účely histopatológie

57. Počas konečného odberu vzoriek sa odoberú gonády, reprodukčné trubice, obličky a pečene na účely histologickej analýzy. Otvorí sa brušná dutina a pečeň sa oddelí rezom a odváži. Z dolnej časti brucha sa ďalej opatrne odstránia orgány tráviacej sústavy (napr. žalúdok, črevá), aby sa získal prístup ku gonádami, k obličkám a reprodukčným trubicami. Zaznamenajú sa zreteľné morfológické abnormality v gonádach. Nakoniec sa odstránia zadné končatiny, ak sa už neodstránili skôr pri odbere krvi. Odoberajú sa pečene a telo s gonádami ponechanými *in situ* sa okamžite vložia do Davidsonovho fixačného

prostriedku. Objem fixačného prostriedku v nádobe má predstavovať najmenej desaťnásobok približného objemu tkaniva. Všetky tkanivá zostávajú v Davidsonovom fixačnom prostriedku najmenej 48 hodín, nie však viac ako 96 hodín. Potom sa opláchnu deionizovanou vodou a uskladnia sa v 10 % neutrálnom tlmenom formalíne (1) (29).

Histopatológia

58. Každá juvenilná vzorka sa histologicky posudzuje z hľadiska výskytu patologických javov v gonádach, reprodukčných trubiciach, obličkách a tkanive pečene, čo zahŕňa diagnostiku a hodnotenie závažnosti (32). Od tohto posúdenia sa odvodzuje aj gonádový fenotyp (napr. vaječníky, semenníky, intersexuálny jedinec) a spolu s jednotlivými meraniami genetického pohlavia možno na základe týchto pozorovaní vypočítať fenotypové/genotypové pomery pohlaví.

PREZENTOVANIE ÚDAJOV

Štatistická analýza

59. V rámci skúšky LAGDA sa vytvárajú tri druhy údajov, ktoré sa majú štatisticky analyzovať: 1. kvantitatívne spojité údaje (hmotnosť, SVL, LSI, VTG); 2. údaje vyjadrujúce čas do udalosti z hľadiska tempa vývoja (t. j. počet dní do NF štádia 62 od začiatku skúšky) a 3. poradové údaje v podobe skóre závažnosti alebo vývojových štádií z histopatologických hodnotení.
60. Odporúča sa, aby koncepcia testu a výber štatistických testov poskytovali dostatočnú váhu na detekciu zmien biologického významu v sledovaných parametroch, pri ktorých sa má uvádzať hodnota NOEC alebo ECx. Pri štatistických analýzach údajov (vo všeobecnosti na základe priemeru replikátov) by sa podľa možnosti malo vychádzať z postupov uvedených v dokumente Súčasné prístupy k štatistickej analýze údajov o ekotoxícite: usmernenie k uplatňovaniu (33). V dodatku 7 k tejto testovacej metóde je k dispozícii odporúčaná schéma rozhodovania z hľadiska štatistickej analýzy a usmernenie s cieľom pomôcť pri spracovaní údajov a pri výbere najvhodnejšieho štatistického testu alebo modelu, ktorý sa použije pri skúške LAGDA.
61. Údaje z odberu vzoriek juvenilných jedincov (napr. rast, LSI) sa analyzujú samostatne pre každé genotypové pohlavie, keďže genotypové pohlavie sa určuje pri všetkých žabách.

Úvahy v súvislosti s analýzou údajov

Používanie narušených replikátov a testovaných skupín

62. K narušeniu replikátov a testovaných skupín môže dôjsť v dôsledku abnormálnej mortality spôsobenej zjavnou toxicitou, ochorením alebo technickou chybou. Ak dôjde k narušeniu testovanej skupiny v dôsledku choroby alebo technickej chyby, na analýzu majú byť k dispozícii tri nenarušené testované skupiny s tromi nenarušenými replikátmi. Ak sa zjavná toxicita vyskytuje pri testovaných skupinách s vysokou dávkou, uprednostňuje sa, aby boli na účely analýzy k dispozícii aspoň tri úrovne koncentrácie chemikálie s tromi nenarušenými replikátmi [v súlade s prístupom na základe maximálnej tolerovanej koncentrácie pri usmerneniach OECD na vykonávanie testov (34)]. Okrem úhynu môžu medzi známky zjavnej toxicity patriť účinky na správanie (napr. plávanie na povrchu, ležanie na dne nádrže, obrátené alebo nepravidelné plávanie, nevychádzanie na hladinu), morfológické lézie (napr. hemoragické lézie, opuch brucha) alebo inhibícia normálnych reakcií na kŕmenie pri kvalitatívnom porovnaní s kontrolnými zvieratami.

Kontrola s rozpúšťadlom

63. Po skončení testu by sa malo vykonať hodnotenie potenciálnych vplyvov rozpúšťadla (ak sa použilo). To sa dosiahne štatistickým porovnaním kontrolnej skupiny s aplikáciou rozpúšťadla a kontrolnej skupiny s vodou na riedenie. Medzi najrelevantnejšie sledované parametre na posúdenie v rámci tejto analýzy patria faktory rastu (hmotnosť a dĺžka), keďže na ne môžu mať vplyv celkové toxicity. Ak sa zistia štatisticky významné rozdiely v týchto sledovaných parametroch medzi kontrolnou skupinou s vodou na riedenie a kontrolnou skupinou s aplikáciou rozpúšťadla, je potrebné na základe najlepšieho odborného úsudku určiť, či nedošlo k narušeniu platnosti testu. Ak sa tieto dve kontroly líšia, testované skupiny vystavené chemikálii sa majú porovnať s kontrolou s aplikáciou rozpúšťadla, pokiaľ nie je známe, že sa uprednostňuje porovnanie s kontrolou s vodou na riedenie. Ak neexistuje štatisticky významný rozdiel medzi týmito dvomi kontrolnými skupinami, odporúča sa, aby sa testované skupiny vystavené testovanej chemikálii porovnali so zoskupenými kontrolami (kontrolné skupiny s aplikáciou rozpúšťadla a s vodou na riedenie), pokiaľ nie je známe, že sa uprednostňuje porovnanie buď len s kontrolnou skupinou s vodou na riedenie, alebo len s kontrolnou skupinou s aplikáciou rozpúšťadla.

Správa o teste

64. Správa o teste obsahuje tieto informácie:

Testovaná chemikália:

- fyzikálny charakter a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti,

– Jednozložkové látky:

fyzický vzhľad, rozpustnosť vo vode a ďalšie relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti,

identifikácia chemikálie, napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS, číslo CAS, kód SMILES alebo InChI, štruktúrny vzorec, čistota, chemická identita nečistôt, ak to je vhodné a prakticky uskutočniteľné, atď. (vrátane obsahu organického uhlíka, ak to je vhodné).

– Viaczložkové látky, UVCB a zmesi:

charakterizácia v najväčšej možnej miere na základe chemickej identity (pozri vyššie), kvantitatívneho výskytu a príslušných fyzikálno-chemických vlastností zložiek.

Testovaný druh:

- vedecký názov, kmeň, ak je dostupný, zdroj a metóda zberu oplodnených vajíčok a následnej manipulácie.
- Výskyt skoliózy v historických kontrolách pri použitej zásobnej kultúre.

Podmienky testu:

- fotoperiód,ý,
- koncepcia testu (napr. veľkosť a materiál komory a objem vody, počet testovacích komôr a replikátov, počet testovaných organizmov na replikát),
- metóda prípravy zásobných roztokov a frekvencia obnovy (ak bol použitý solubilizačný prostriedok, mal by sa uviesť spolu s jeho koncentráciou),
- metóda dávkovania testovanej chemikálie (napr. čerpadlá, riediace systémy),
- miera výťažnosti metódy a nominálne testované koncentrácie, kvantifikačný limit, priemery nameraných hodnôt a ich štandardné odchýlky v testovacích nádobách a metóda, ktorou boli dosiahnuté, a dôkaz, že sa namerané hodnoty týkajú koncentrácií testovanej chemikálie v skutočnom roztoku,
- vlastnosti vody na riedenie: pH, tvrdosť vody, teplota, koncentrácia rozpusteného kyslíka, úroveň zvyškového chlóru (ak boli merané), celkový obsah jódu, celkový obsah organického uhlíka (ak bol meraný), nerozpustené pevné látky (ak boli merané), salinita v testovacom médiu (ak bola meraná) a akékoľvek iné vykonané merania,
- nominálne testované koncentrácie, priemery nameraných hodnôt a ich štandardné odchýlky,

- kvalita vody v testovacích nádobách: pH, teplota (meraná denne) a koncentrácia rozpustného kyslíka,
- podrobné informácie o kŕmení (napr. druh potravy, zdroj, dávkované množstvo a frekvencia).

Výsledky:

- dôkaz, že kontroly splnili kritériá validity,
 - tieto údaje pre kontrolu (plus kontrolu s aplikáciou rozpúšťá, ak sa použila) a testované skupiny: pozorovaná mortalita a abnormality, čas do NF štádia 62, posúdenie histológie štítnej žľazy (len vzorka v larválnom štádiu), rast (hmotnosť a dĺžka), LSI (len juvenilná vzorka), pomery genetických/fenotypových pohlaví (len juvenilná vzorka), výsledky histopatologického posúdenia gonád, reprodukčných trubíc, obličky a pečene (len juvenilná vzorka) a VTG v plazme (len juvenilná vzorka, ak sa skúmalo),
 - prístup uplatnený pri štatistickej analýze a spracovaní údajov (použitý štatistický test alebo model),
 - koncentrácia bez pozorovaného účinku (NOEC) pre každú posudzovanú reakciu,
 - najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom (LOEC) (pri $\alpha = 0,05$) pre každú posudzovanú reakciu; v prípade potreby hodnota EC_x pre každú posudzovanú reakciu vrátane intervalov spoľahlivosti (napr. 95 %) a grafu zavedeného modelu použitého na jej výpočet, sklon krivky závislosti veličiny od koncentrácie, vzorec regresného modelu, odhadované parametre modelu a ich štandardné chyby,
 - akákoľvek odchýlka od testovacej metódy a odchýlky od kritérií prijateľnosti a úvahy o možných dôsledkoch v súvislosti s výsledkom testu.
65. V prípade výsledkov merania sledovaných parametrov sa uvádzajú priemerné hodnoty a ich štandardné odchýlky (na základe replikátov aj koncentrácií, ak je to možné).
66. Vypočíta sa medián času do NF štádia 62 v kontrolách, ktorý sa uvádza ako stredná hodnota mediánov replikátov a ich štandardnej odchýlky. Podobne sa v prípade testovaných skupín vypočíta medián testovanej skupiny, ktorý sa uvádza ako stredná hodnota mediánov replikátov a ich štandardnej odchýlky.

LITERATÚRA

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

- Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469 – 2474.
- (12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S and Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117 – 123.
- (13) Tobias ML, Tomasson J and Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: 441 – 448.
- (14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR and Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321 – 327.
- (15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A and Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159 – 169.
- (16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, USA.
- (17) Kapitola C.4 tejto prílohy, Test ľahkej biodegradovateľnosti.
- (18) Kapitola C.29 tejto prílohy, Ľahká biodegradovateľnosť – CO₂ v hermeticky uzavretých nádobách (test v uzavretom priestore nad kvapalinou).
- (19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL and Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539 – 551.
- (20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593 – 9.
- (21) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 23), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

- (22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. *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., s. 84
- (25) Kapitola C.38 tejto prílohy, Skúška metamorfózy obojživelníkov.
- (26) Kapitola C.48 tejto prílohy, Krátkodobý reprodukčný test na rybách.
- (27) Kapitola C.41 tejto prílohy, Test pohlavného vývinu rýb.
- (28) Kapitola C.49 tejto prílohy, Test akútnej toxicity na rybích embryách (FET).
- (29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, *Toxicological Pathology* 37: 415 – 424.
- (31) Luna LG and Coady K. (2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Techniques* 5(3): 194.
- (32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

- (34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. *Aquatic Toxicology* 91(3): 197 – 202.

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Koncový sledovaný parameter: účinok pôsobiaci na úrovni populácie.

Chemikália: látka alebo zmes.

ELISA: enzýmové imunosorbentové stanovenie

EC_x: (účinná koncentrácia pre x % účinok) je koncentrácia, ktorá počas daného obdobia expozície vyvolá x % účinok na testované organizmy v porovnaní s kontrolnou skupinou. Napríklad EC₅₀ je koncentrácia, pri ktorej sa odhaduje, že počas vymedzeného obdobia expozície vyvolá účinok na sledovaný ukazovateľ testu v 50 % exponovanej populácie.

dpf: dni po oplodnení

Prietokový test: test s neustálym prietokom testovaných roztokov cez testovací systém počas trvania expozície.

Os HPG: os hypothalamus – hypofýza – gonády

IUPAC: Medzinárodná únia pre čistú a aplikovanú chémiu.

Najnižšia koncentrácia s pozorovaným účinkom (LOEC) je najnižšia testovaná koncentrácia testovanej chemikálie, pri ktorej je účinok chemikálie štatisticky významný (pri $p < 0,05$) v porovnaní s kontrolou. Škodlivý účinok všetkých testovaných koncentrácií vyšších ako hodnota LOEC by však mal byť rovnaký alebo väčší ako účinky pozorované pri hodnote LOEC. Ak nie sú splnené tieto dve podmienky, je potrebné poskytnúť úplné vysvetlenie, akým spôsobom sa zvolila hodnota LOEC (a teda aj NOEC). Usmernenie sa uvádza v dodatku 7.

Stredná letálna koncentrácia (LC₅₀): predstavuje koncentráciu testovanej chemikálie, ktorá sa odhadne ako letálna pre 50 % testovaných organizmov počas trvania testu.

Koncentrácia bez pozorovaného účinku (NOEC) je testovaná koncentrácia chemikálie ihneď pod LOEC, ktorá pri porovnaní s kontrolou nemá štatisticky významný účinok ($p < 0,05$) počas daného obdobia expozície.

SMILES: zjednodušený systém zadávania molekulárnych štruktúr.

Testovaná chemikália: každá látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

UVCB: látky neznámeho alebo variabilného zloženia, produkty komplexných reakcií alebo biologické materiály.

VTG: vitelogenín. Je to fosfolipoglykoproteín, slúžiaci ako prekursor proteínov vaječného žltka, ktorý sa normálne vyskytuje v telách pohlavne aktívnych samíc všetkých vajcorodých druhov.

Dodatok 2**NIEKTORÉ CHEMICKÉ VLASTNOSTI VODY VHODNEJ NA RIEDENIE**

Látka	Koncentračný limit
Tuhé častice	5 mg/l
Celkový obsah organického uhlíka	2 mg/l
Neionizovaný amoniak	1 µg/l
Zvyškový chlór	10 µg/l
Celkový obsah organofosforových pesticídov	50 ng/l
Celkový obsah organochlórových pesticídov a polychlórovaných bifenylov	50 ng/l
Celkový obsah organického chlóru	25 ng/l
Hliník	1 µg/l
Arzén	1 µg/l
Chróm	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Meď	1 µg/l
Železo	1 µg/l
Olovo	1 µg/l
Nikel	1 µg/l
Zinok	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Ortuť	100 ng/l
Striebro	100 ng/l

Dodatok 3**PODMIENKY TESTU PRI SKÚŠKE LAGDA**

1. Testovaný druh	<i>Xenopus laevis</i>
2. Typ testu	s nepretržitým prietokom
3. Teplota vody	Nominálna teplota je 21 °C. Priemerná teplota vody počas trvania testu je 21 ± 1 °C (rozdiely medzi replikátmi a medzi koncentráciami chemikálie by nemali byť väčšie ako 1,0 °C).
4. Kvalita osvetlenia	Fluorescenčné svietidlá (so širokým spektrom) 600 – 2 000 luxov (lúmenov/m ²) na hladine vody
5. Fotoperiód	12 hodín svetla a 12 hodín tmy
6. Objem testovaného roztoku a testovacia nádoba (nádrž)	4 – 10 l (hlbka vody najmenej 10 – 15 cm) nádrž zo skla alebo z nehrdzavejúcej ocele
7. Výmeny objemu testovacích roztokov	neustále, s cieľom zachovať biologické podmienky a expozíciu chemikáliám (napr. 5 obnovení objemu za deň)
8. Vek testovaných organizmov na začiatku	Nieuwkoopovo a Faberovo (NF) štádium 8 – 10
9. Počet organizmov na replikát	20 zvierat (embryí)/nádrž (replikát) na začiatku expozície a 10 zvierat (juvenilných jedincov)/nádrž (replikát) po NF štádiu 66 do skončenia expozície
10. Počet testovaných skupín	najmenej 4 skupiny s aplikovanou testovanou chemikáliou plus príslušné kontroly
11. Počet replikátov na testovanú skupinu	4 replikáty na skupinu s testovanou chemikáliou a 8 replikátov pre kontroly
12. Počet organizmov na testovanú koncentráciu	najmenej 80 zvierat na skupinu s testovanou chemikáliou a najmenej 160 replikátov pre kontroly
13. Voda na riedenie	akákoľvek voda, ktorá umožňuje normálny rast a vývoj druhu <i>X. laevis</i> (napr. pramenitá voda alebo voda z vodovodu filtrovaná cez aktívne uhlie)
14. Prevzdušňovanie	Nevyžaduje sa. Prevzdušňovanie nádrží však môže byť potrebné, ak úrovne koncentrácie rozpusteného kyslíka klesnú pod odporúčané limity, pričom sa zvyšuje pri maximalizovaní prietoku testovacieho

	roztoku.
15. Koncentrácia rozpusteného kyslíka v testovanom roztoku	Koncentrácia rozpusteného kyslíka: ≥ 40 % hodnoty rozpustnosti vzdušného kyslíka alebo $\geq 3,5$ mg/l
16. pH testovaného roztoku	6,5 – 8,5 (rozdiely medzi replikátmi a medzi koncentraciami chemikálie by nemali byť väčšie ako 0,5)
17. Tvrdosť a alkalita testovaného roztoku	10 – 250 mg CaCO ₃ /l
18. Kŕmny režim	(pozri dodatok 4)
19. Obdobie expozície	od NF štádia 8 – 10 do 10 týždňov po mediáne času do NF štádia 62 v kontrolnej skupine s vodou a/alebo s aplikáciou rozpúšťadla (najviac 17 týždňov)
20. Biologické sledované parametre	mortalita (a vzhľadové abnormality), čas do NF štádia 62 (vzorka v larválnom štádiu), posúdenie histológie štítnej žľazy (vzorka v larválnom štádiu), rast (hmotnosť a dĺžka), index pomeru hmotnosti pečene k hmotnosti tela (juvenilná vzorka), genetické/fenotypové pomery pohlaví (juvenilná vzorka), histopatológia gonád, reprodukčných trubíc, obličky a pečene (juvenilná vzorka) a vitelogenín v plazme (juvenilná vzorka, voliteľné)
21. Kritériá platnosti testu	Koncentrácia rozpusteného kyslíka má byť ≥ 40 % hodnoty rozpustnosti vzdušného kyslíka; priemerná teplota vody má byť 21 ± 1 °C a rozdiely medzi replikátmi a medzi koncentraciami chemikálie by mali byť $< 1,0$ °C; pH testovacieho roztoku má byť v rozsahu od 6,5 do 8,5; mortalita v kontrolách má byť ≤ 20 % pri každom replikáte a priemerný čas do NF štádia 62 v kontrole má byť ≤ 45 dní; priemerná hmotnosť testovaných organizmov v NF štádiu 62 a pri ukončení skúšky v kontrolách a kontrolách s aplikáciou rozpúšťadla (ak sa používajú) má dosiahnuť $1,0 \pm 0,2$, resp. $11,5 \pm 3$ g; malo by byť preukázateľné, že koncentrácia testovanej chemikálie v roztoku bola uspokojivo udržiavaná v rozsahu ± 20 % stredných nameraných hodnôt.

Dodatok 4

KRŤMNY REŽIM

Je potrebné poznamenať, že hoci sa odporúča tento kŕmny režim, možné sú aj alternatívy za predpokladu, že testované organizmy vhodným tempom rastú a vyvíjajú sa.

Kŕmenie lariev

Príprava potravy pre larvy

- A. štartovacie krmivo pre pstruhy a riasy/krmivo TetraFin® (alebo ekvivalentné krmivo) v objemovom pomere 1:1;
1. štartovacie krmivo pre pstruhy: mixujte 50 g štartovacieho krmiva pre pstruhy (jemné granule alebo prášok) a 300 ml vhodnej filtrovanej vody 20 sekúnd pri vysokých otáčkach mixéra;
 2. zmes rias/krmiva TetraFin® (alebo ekvivalentného krmiva): mixujte 12 g diskov z rias spirulina a 500 ml filtrovanej vody 40 sekúnd pri vysokých otáčkach mixéra, zmixujte 12 g krmiva Tetrafin® (alebo ekvivalentného krmiva) s 500 ml filtrovanej vody a potom zmiešajte tieto zmesi, aby ste získali 1 liter zmesi s obsahom 12 g/l rias spirulina a 12 g/l krmiva Tetrafin® (alebo ekvivalentného krmiva),
 3. zmiešajte rovnaké objemy zmixovaného štartovacieho krmiva pre pstruhy a zmesi rias/krmiva TetraFin® (alebo ekvivalentného krmiva);
- B. Žiabronôžka soľná:

15 ml vajíčok žiabronôžky soľnej sa nechá vyliahnúť v 1 litri slanej vody (pripravenej pridaním 20 ml NaCl do 1 litra deionizovanej vody). Po prevzdušňovaní v trvaní 24 hodín pri izbovej teplote a stálom svetle sa zozbierajú jedince žiabronôžky soľnej. Jedince žiabronôžky soľnej sa nechajú usadiť počas 30 minút tým, že sa zastaví prevzdušňovanie. Cysty, ktoré plávajú navrchu nádoby, sa zlejú a vyradia a jedince žiabronôžky soľnej sa prelejú cez vhodné filtre a zmiešajú sa s filtrovanou vodou, aby sa dosiahol objem 30 ml.

Protokol kŕmenia

V tabuľke 1 sa uvádzajú referenčné informácie týkajúce sa typu a množstva krmiva použitého počas larválnych štádií expozície. Zvieratá sa kŕmia trikrát denne od pondelka do piatka a raz denne počas víkendov.

Tabuľka 1: Kŕmny režim lariev druhu *X. laevis* v prietokových podmienkach

Čas* (po oplodnení)	Štartovacie krmivo pre pstruhy : riasy/krmivo TetraFin® (alebo ekvivalentné krmivo)	Žiabronôžka soľná
------------------------	---	-------------------

	Pracovný deň (trikrát denne)	Víkend (jedenkrát denne)	Pracovný deň (dvakrát denne)	Víkend (jedenkrát denne)
4. – 14. deň (v 0. – 1. týždni)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (od 8. do 15. dňa)	0,5 ml (od 8. do 15. dňa)
2. týždeň	0,67 ml	2,4 ml	1 ml (od 16. dňa)	1 ml (od 16. dňa)
3. týždeň	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
4. týždeň	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
5. týždeň	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
6. týždeň	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
7. týždeň	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
8. – 10. týždeň	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

* 0. deň sa vymedzuje ako deň injekčného podania hCG.

Prechod od stravy pre larvy k strave pre juvenilné jedince

Keď sa pri larvách dokončí metamorfóza, prechádzajú na zloženie potravy pre juvenilné jedince vysvetlené ďalej. V priebehu tohto prechodu sa obmedzuje potrava pre larvy a zvyšuje sa objem krmiva pre juvenilné jedince. Možno to dosiahnuť pomerným znižovaním potravy pre larvy a súčasným pomerným zvyšovaním potravy pre juvenilné jedince, keď každá skupina piatich žubrienok prekročí NF štádium 62 a priblíži sa dokončeniu metamorfózy v NF štádiu 66.

Kŕmenie juvenilných jedincov

Potrava pre juvenilné jedince

Po dokončení metamorfózy (štádium 66) dôjde k zmene kŕmneho režimu, aby obsahoval len prémiové vodné krmivo pre žaby s veľkosťou 3/32 palca (Xenopus Express™, FL, USA) alebo ekvivalentné krmivo.

Príprava drvených peliet na prechod z larválneho do juvenilného štádia

Pelety vodného krmiva pre žaby sa krátko pomelú v mlynčeku na kávu, mixéri alebo sa rozdrvíva pomocou trecej misky a paličky, aby sa zmenšila ich veľkosť približne o tretinu. Pri príliš dlhom spracúvaní sa krmivo zmení na prášok, čo sa neodporúča.

Protokol kŕmenia

V **tabuľke 2** sa uvádzajú referenčné informácie týkajúce sa typu a množstva krmiva použitého počas vývojových štádií juvenilných a dospelých jedincov. Zvieratá sa krmia raz denne. Je potrebné poznamenať, že počas toho, ako pri zvieratách prebieha metamorfóza, aj naďalej čiastočne prijímajú žiabronôžku soľnú v potrave, až kým sa pri > 95 % zvierat neukončí metamorfóza.

V deň ukončenia testu sa zvieratá nemajú kŕmiť, aby nedošlo k zneprehľadneniu meraní hmotnosti v dôsledku prijatej potravy.

Tabuľka 2: Kŕmny režim juvenilných jedincov druhu *X. laevis* v prietokových podmienkach. Je potrebné poznamenať, že zvieratá, pri ktorých neprebehla metamorfóza, vrátane tých, pri ktorých sa metamorfóza oneskorila v dôsledku aplikovania chemikálie, nemôžu konzumovať nerozdrvené pelety.

Čas (týždne po mediáne dátumu metamorfózy)	Objem rozdrvených peliet (mg na malú žabu)	Objem celých peliet (mg na malú žabu)
Pri dokončení metamorfózy pri zvieratách	25	0
0. – 1. týždeň	25	28
2. – 3. týždeň	0	110
4. – 5. týždeň	0	165
6. – 9. týždeň	0	220

* Prvý deň 0. týždňa predstavuje medián dátumu metamorfózy pri kontrolných zvieratách.

Dodatok 5

URČENIE GENETICKÉHO POHLAVIA (GENETICKÉ ROZLIŠOVANIE POHLAVIA)

Metóda genetického rozlišovania pohlavia druhu *Xenopus laevis* vychádza z práce Yoshimota a kol., 2008. Podrobné postupy týkajúce sa genotypizácie možno v prípade potreby získať z tejto publikácie. Možno použiť aj alternatívne metódy (napr. vysokovýkonnú metódu qPCR), ak sa považujú za vhodné.

Primery druhu *X. laevis*

Marker DM-W

Priamy: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Reverzný: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Pozitívna kontrola

Priamy: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Reverzný: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Čistenie DNA

Vykonajte čistenie DNA zo svalového alebo z kožného tkaniva napr. pomocou súpravy Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (kat. č. 69506) alebo podobného produktu podľa pokynov dodaných so súpravou. DNA možno eluovať z centrifugačných kolón pomocou menšieho objemu tlmivého roztoku, aby sa získali koncentrovanejšie vzorky, ak sa to považuje za potrebné na účely polymerázovej reťazovej reakcie. DNA je pomerne stabilná, preto je potrebné dbať na to, aby sa predišlo krížovej kontaminácii, ktorá by mohla viesť k nesprávnej charakterizácii samcov ako samíc a naopak.

Polymerázová reťazová reakcia

Vzorový protokol s využitím súpravy JumpStart™ *Taq* od spoločnosti Sigma sa uvádza v **tabuľke 1**.

Tabuľka 1: Vzorový protokol s využitím súpravy JumpStart™ *Taq* od spoločnosti Sigma

Hlavná zmes (Master Mix)	1x (μl)	[konečná]
NFW	11	–
Tlmivý roztok 10X	2,0	–
MgCl ₂ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP (každý 10 mM)	0,4	200 μM
Marker pre primer (8 μM)	0,8	0,3 μM
Marker pre rev. primer (8 μM)	0,8	0,3 μM
Kontrola pre primer (8 μM)	0,8	0,3 μM
Kontrola pre rev. primer (8 μM)	0,8	0,3 μM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 jednotky/μl
Matrica DNA	1,0	~200 pg/μl

Poznámka: Pri príprave hlavných zmesí (Master Mix) pripravte určité množstvo navyše, aby bolo možné nahradiť prípadné straty pri pipetovaní (príklad: 25 dávok sa použije na 24 reakcií).

Reakcia:

Hlavná zmes (Master Mix) 19,0 μl

Matrica 1,0 μl

Spolu 20,0 μl

Profil termocykléra

Krok 1. 94 °C 1 min

Krok 2. 94 °C 30 s

Krok 3. 60 °C 30 s

Krok 4. 72 °C 1 min

Krok 5. Prechod na krok 2. 35 cyklov

Krok 6. 72 °C 1 min

Krok 7. 4 °C udržiavať

Produkty PCR možno použiť okamžite v géli alebo ich uskladniť pri teplote 4 °C.

Elektroforéza na agarózovom géli (3 %) (vzorový protokol)*50X TAE*

Tris 24,2 g
Ľadová kyselina octová 5,71 ml
Na₂ (EDTA)·2H₂O 3,72 g
Doplňte vodu do 100 ml

1X TAE

H₂O 392 ml
50X TAE 8 ml

Agaróza 3:1

3 diely agarózy NuSieve™ GTG™
1 diel agarózy Fisher s nízkou elektroendoosmózou (EEO)

Metóda

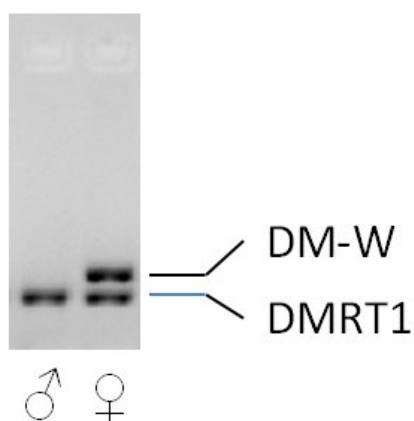
1. Pripravte 3 % gél pridaním 1,2 g zmesi agarózy k 43 ml 1X TAE. Krúživým pohybom premiešajte, aby sa rozpadli veľké zhluky.
2. Zahrievajte zmes agarózy, až kým sa úplne nerozpustí (zabráňte tomu, aby zovrela). Nechajte mierne vychladnúť.
3. Pridajte 1,0 µL etídiumbromidu (10 mg/ml). Krúživým pohybom premiešajte obsah banky. Etídiumbromid je mutagénny, preto sa majú v tomto kroku používať alternatívne chemikálie, pokiaľ je to technicky možné, aby sa minimalizovali riziká pre zdravie pracovníkov¹.
4. Nalejte gél do foriem s hrebeňom. Nechajte úplne vychladnúť.
5. Pridajte gél do prístroja. Pokryte gél pomocou 1X TAE.

¹ V súlade s článkom 4.1 smernice Európskeho parlamentu a Rady 2004/37/ES z 29. apríla 2004 o ochrane pracovníkov pred rizikami z vystavenia účinkom karcinogénov alebo mutagénov pri práci (šiesta samostatná smernica v zmysle článku 16 ods. 1 smernice Rady 89/391/EHS) (Ú. v. EÚ L 158, 30.4.2004, s. 50).

6. Pridajte 1 μ l 6x nanášacieho farbiva na každých 10 μ l produktu PCR.
7. Pomocou pipety rozdeľte vzorky do jamiek.
8. Spracúvajte pri konštantnom napätí 160 voltov približne 20 minút.

Na **obrázku 1** je zobrazený agarózový gél s pruhovými vzormi, ktoré označujú samčie a samičie jedince.

Obrázok 1: Obrázok agarózového gélu s pruhovým vzorom, ktorý označuje samčieho (σ) jedinca (jeden pruh ~203 bp: DMRT1) a samičieho (ϕ) jedinca (dva pruhy ~259 bp: DM-W a 203 bp: DMRT1).



LITERATÚRA

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.

Dodatok 6

MERANIE VITELOGENÍNU

Na meranie vitelogenínu (VTG) sa používa enzýmové imunisorbentové stanovenie (ELISA), ktoré bolo pôvodne vyvinuté na účely stanovenia VTG v prípade čereble potočnej (Parks a kol., 1999). V súčasnosti neexistujú komerčne dostupné protilátky pre druh *X. laevis*. Vzhľadom na dostatok informácií o tomto proteíne a dostupnosť nákladovo efektívnych komerčných služieb na produkciu protilátok však možno primerane predpokladať, že v laboratóriách možno jednoducho použiť metódu ELISA na uskutočnenie tohto merania (Olmstead a kol., 2009). V zdroji Olmstead a kol. (2009) sa opisuje aj úprava tejto skúšky na meranie VTG pri druhu *X. tropicalis*, ktorá sa uvádza ďalej. V tejto metóde sa používa protilátka vytvorená proti VTG druhu *X. tropicalis*, je však známe, že účinkuje aj proti VTG druhu *X. laevis*. Je potrebné poznamenať, že možno používať aj nekompetitívne metódy ELISA a že tieto metódy môžu mať nižší detekčný limit než metóda opísaná ďalej.

Materiály a činidlá

- vopred adsorbované sérum s prvou protilátkou (Ab),

Zmiešajte 1 diel séra s prvou protilátkou proti VTG druhu *X. tropicalis* s 2 dielmi kontrolnej samčej plazmy a nechajte približne 75 minút pri izbovej teplote, položte na ľad na 30 minút, odstredíte 1 hodinu pri $> 20\,000\text{ g}$ pri teplote $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, odstráňte supernatant, rozdeľte na alikvoty a uskladnite pri teplote $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- druhá protilátka,

kozí anti-králičí IgG-HRP konjugát (napr. Bio-Rad 172-1019),

- štandard VTG,

čistený VTG druhu *X. laevis* s koncentráciou $3,3\text{ mg/ml}$,

- TMB (3,3',5,5'-tetrametylbendidín) (napr. KPL 50-76-00 alebo Sigma T0440),
- normálne kozie sérum (NGS)(napr. Chemicon® S26 – 100 ml),
- 96-jamkové polystyrénové mikrotitračné platničky EIA (napr. ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher: 07-200-35)
- hybridizačná pec s teplotou $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (alebo inkubátor s rýchlym dosahovaním rovnováhy vzduchu) pre mikrotitračné platničky, vodný kúpeľ pre skúmavky,
- ďalšie bežné laboratórne vybavenie, chemikálie a spotrebný materiál.

Postupy

Krycí tlmivý roztok (50 mM uhličitanový tlmivý roztok, pH 9,6):

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

10X PBS (0,1 M fosfát, 1,5 M NaCl):

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

Premývací tlmivý roztok (PBST):

10X PBS	100 ml
voda	900 ml

Upravte pH na 7,3 pomocou 1 M HCl, potom pridajte 0,5 ml Tween-20

Tlmivý skúšobný roztok:

normálne kozie sérum (NGS)	3,75 ml
premývací tlmivý roztok	146,25 ml

Odbor vzoriek

Krv sa odoberie pomocou heparinizovanej mikrohematokritovej kapiláry a umiestni sa na ľad. Po centrifugácii v trvaní 3 minúty sa kapilára posúdi, rozlomením sa otvorí a plazma sa premiestni do skúmaviek mikroadstredivky s objemom 0,6 ml, ktoré obsahujú 0,13 jednotky lyofilizovaného aprotinínu. (Tieto skúmavky sa pripravujú vopred pridaním vhodného objemu aprotinínu, zmrazením a lyofilizovaním v zariadení speed-vac s nízkou úrovňou tepla až do vysušenia.) Plazmu uskladníte pri teplote –80 °C až do analyzovania.

Postup pre jednu mikrotitračnú platničku

Vytvorenie krycej vrstvy na mikrotitračnej platničke

Zmiešajte 20 µl čisteného VTG s 22 ml uhličitanového tlmivého roztoku (konečná koncentrácia 3 µg/ml). Pridajte 200 µl do jednotlivých jamiek 96-jamkovej mikrotitračnej platničky. Zakryte mikrotitračnú platničku pomocou príľnavej tesniacej fólie a nechajte ju inkubovať dve hodiny pri teplote 37 °C (alebo cez noc pri teplote 4 °C).

Blokovanie mikrotitračnej platničky

Blokujúci roztok sa pripraví pridaním 2 ml normálneho kozieho séra (NGS) do 38 ml uhličitanového tlmivého roztoku. Odstráňte krycí roztok a osušte pretrepávaním. Do každej jamky pridajte 350 µl blokujúceho roztoku. Zakryte pomocou príľnavej tesniacej fólie a inkubujte dve hodiny pri teplote 37 °C (alebo cez noc pri teplote 4 °C).

Príprava štandardov

5,8 µl čisteného VTG štandardu sa zmieša s 1,5 ml tlmivého skúšobného roztoku v jednorazovej borosilikátovej sklenenej skúmavke s rozmermi 12 × 75 mm. Dosiahne sa tak koncentrácia 12 760 ng/ml. Potom sa uskutoční sériové riedenie pridaním 750 µl predchádzajúceho riedenia k 750 µl tlmivého skúšobného roztoku, aby sa dosiahli konečné koncentrácie 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 a 50 ng/ml.

Príprava vzoriek

Začnite riedením plazmy do tlmivého skúšobného roztoku v pomere 1:300 (napr. zmiešaním 1 µl plazmy s 299 µl tlmivého skúšobného roztoku) alebo v pomere 1:30. Ak sa očakáva veľké množstvo VTG, môžu byť potrebné ďalšie alebo väčšie riedenia. Usilujte sa udržiavať hodnotu B/B₀ v rozsahu štandardov. V prípade vzoriek bez značného obsahu VTG, napr. v prípade kontrolných samcov a samíc (ktoré sú všetky nezrelé), použite riedenie v pomere 1:30. Pri vzorkách s menším než uvedeným riedením sa môžu prejavovať nežiaduce matricové efekty.

Navyše sa odporúča na každej mikrotitračnej platničke testovať aj pozitívnu kontrolnú vzorku. Táto vzorka pochádza zo zásoby plazmy, ktorá obsahuje vysoké indukované úrovne VTG. Táto zásoba sa najskôr zriedi v NGS, rozdelí sa na alikvoty a uskladní sa pri teplote – 80 °C. Pre každú mikrotitračnú platničku sa alikvot rozmrazí, ďalej sa zriedi v tlmivom skúšobnom roztoku a testuje sa podobne ako testovacia vzorka.

Inkubácia s prvou protilátkou

Prvá protilátka sa pripraví zriedením vopred adsorbovaného séra s prvou protilátkou v tlmivom skúšobnom roztoku v pomere 1:2 000 (napr. 8 µl na 16 ml tlmivého skúšobného roztoku). V sklenenej skúmavke zmiešajte 300 µl roztoku prvej protilátky s 300 µl vzorky/štandardu. Podobne sa pripraví skúmavka B₀, ktorá obsahuje 300 µl tlmivého skúšobného roztoku a 300 µl protilátky. Pripraví sa aj skúmavka NSB, ktorá obsahuje len 600 µl tlmivého skúšobného roztoku, t. j. žiadne protilátky. Uzatvorte skúmavky a opatrne

ich zmiešajte pretrepaním. Inkubujte 1 hodinu vo vodnom kúpeli s teplotou 37 °C.

Premytie mikrotitračnej platničky

Bezprostredne pred dokončením inkubácie prvej protilátky vykonajte premytie mikrotitračnej platničky. Dosiahnete to pretrepaním obsahu a vysušením dotykom savého papiera. Potom naplňte jamky 350 µl premývacieho roztoku, zlejte ho a platničku osušte. Pri tomto postupe je užitočná viackanálová opakovacia pipeta alebo premývač mikrotitračnej platničky. Krok premytia sa zopakuje ešte dvakrát, aby sa spolu uskutočnili tri premytia.

Naplnenie mikrotitračnej platničky

Po premytí mikrotitračnej platničky vyberte skúmavky z vodného kúpeľa a zľahka ich pretrepte. Do zdvojených jamiek na mikrotitračnej platničke pridajte 200 µl z každej skúmavky vzorky, štandardu, B₀ a NSB. Zakryte mikrotitračnú platničku pomocou príľnavej tesniacej fólie a nechajte ju inkubovať 1 hodinu pri teplote 37 °C.

Inkubácia s druhou protilátkou

Na konci inkubácie v predchádzajúcom kroku je potrebné mikrotitračnú platničku znovu trikrát premyť, ako bolo opísané vyššie. Zriedená druhá protilátka sa pripraví zmiešaním 2,5 µl druhej protilátky s 50 ml tlmivého skúšobného roztoku. Pridajte 200 µl zriedenej druhej protilátky do každej jamky, uzatvorte podľa predchádzajúceho opisu a inkubujte 1 hodinu pri teplote 37 °C.

Pridanie substrátu

Po dokončení inkubácie s druhou protilátkou trikrát premyte mikrotitračnú platničku podľa predchádzajúceho opisu. Potom do každej jamky pridajte 100 µl substrátu TMB. Nechajte reakciu prebiehať 10 minút, podľa možnosti mimo ostrého svetla. Zastavte reakciu pridaním 100 µl 1 M kyseliny fosforečnej. Spôsobí to zmenu farby z modrej na intenzívnu žltú. Pomocou snímača mikrotitračných platničiek zmerajte absorbanciu pri 450 nm.

Výpočet B/B₀

Od všetkých meraní odpočítajte priemernú hodnotu NSB. B/B₀ pre každú vzorku a štandard sa vypočíta ako podiel hodnoty absorbancie (B) a priemernej absorbancie vzorky B₀.

Získanie krivky štandardov a určenie neznámych množstiev

Vytvorte krivku štandardov pomocou počítačového softvéru na tvorbu grafov (napr. SlidewriteTM alebo Sigma Plot[®]), ktorým sa extrapoluje množstvo z hodnoty B/B₀ vzorky na základe hodnoty B/B₀ štandardov. Toto množstvo sa zvyčajne znázorňuje v logaritmickej mierke a krivka bude mať sigmoidálny tvar. Pri použití úzkeho rozsahu štandardov však

môže vyzeráť lineárna. Vykonajte korekciu množstiev vzorky na základe faktora riedenia a uveďte ich v mg VTG/ml plazmy.

Stanovenie minimálnych detekčných limitov (MDL)

Najmä pri normálnych samcoch často nebude zrejmé, akým spôsobom prezentovať výsledky pri nízkych hodnotách. V takých prípadoch je potrebné pomocou 95 % hraníc spoľahlivosti potrebné určiť, či sa má hodnota uviesť ako nula alebo ako iné číslo. Ak sa výsledok vzorky nachádza v rámci intervalu spoľahlivosti nulového štandardu (B_0), výsledok sa uvádza ako nula. Minimálna úroveň detekcie bude predstavovať najnižší štandard, ktorý sa stabilne odlišuje od nulového štandardu, čo znamená, že sa tieto dva intervaly spoľahlivosti neprekrývajú. Pri každom výsledku vzorky, ktorý je v rámci hranice spoľahlivosti minimálnej úrovne detekcie alebo nad ňou, sa uvádza vypočítaná hodnota. Ak vzorka spadá medzi intervaly nulového štandardu a minimálnej úrovne detekcie, jedna polovica minimálnej úrovne detekcie sa má uvádzať ako hodnota tejto vzorky.

LITERATÚRA

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.

Dodatok 7

ŠTATISTICKÁ ANALÝZA

V rámci skúšky LAGDA sa vytvárajú tri druhy údajov, ktoré sa majú štatisticky analyzovať: 1. kvantitatívne spojité údaje; 2. údaje vyjadrujúce čas do udalosti pri tempe vývoja (čas do NF štádia 62) a 3. poradové údaje v podobe skóre závažnosti alebo vývojových štádií z histopatologických hodnotení. Odporúčaná schéma rozhodovania z hľadiska štatistickej analýzy pre skúšku LAGDA sa uvádza na obrázku 1. Ďalej sú uvedené aj niektoré poznámky, ktoré môže byť potrebné zohľadniť pri vykonávaní štatistickej analýzy meraní zo skúšky LAGDA. Podľa schémy rozhodovania z hľadiska analýzy sa výsledky meraní mortality, rastu (hmotnosť a dĺžka) a indexu pomeru hmotnosti pečene k hmotnosti tela (LSI) analyzujú na základe vetvy „Iné sledované parametre“.

Spojité údaje

V prípade údajov pre spojité sledované parametre je potrebné najskôr overiť ich monotónnosť pomocou transformácie údajov podľa poradia, dosadením do modelu ANOVA a porovnaním lineárnych a kvadratických kontrastov. Ak sú údaje monotónne, uskutoční sa Jonckheerov-Terpstrov test trendu na mediánoch replikátov a nepoužijú sa žiadne ďalšie analýzy. Alternatívu pre údaje s normálnym rozdelením a homogénnymi rozptylmi predstavuje step-down Williamsov test. Ak údaje nie sú monotónne (kvadratický kontrast je významný a lineárny kontrast nie je významný), majú sa analyzovať pomocou modelu ANOVA so zmiešanými účinkami. Ďalej sa pri údajoch posudzuje normalita (podľa možnosti pomocou Shapirovho-Wilkovho alebo Andersonovho-Darlingovho testu) a homogenita rozptylu (podľa možnosti pomocou Levenovho testu). Oba testy sa uskutočňujú na rezíduách modelu ANOVA so zmiešanými účinkami. Namiesto týchto formálnych testov normality a homogenity rozptylu možno použiť odborný posudok, ale uprednostňujú sa formálne testy. Ak majú údaje normálne rozdelenie s homogénnymi rozptylmi, sú splnené predpoklady analýzy ANOVA so zmiešanými účinkami a významný účinok testovanej chemikálie sa stanoví na základe Dunnettovho testu. Ak sa zistí nenormalita alebo heterogenita rozptylu, predpoklady Dunnettovho testu nie sú splnené a je potrebné vykonať normalizačnú transformáciu na stabilizáciu rozptylu. Ak sa takáto transformácia nenájde, významný účinok testovanej chemikálie sa stanoví na základe Dunnovho testu. Ak je to možné, má sa použiť jednostranný test namiesto dvojstranného testu. Pri stanovení toho, ktorý test je vhodný pre daný sledovaný parameter, sa však vyžaduje odborné posúdenie.

Mortalita

Údaje o mortalite sa analyzujú za časové obdobie zahŕňajúce celý test a vyjadrujú sa ako podiel uhynutých jedincov v príslušnej nádrži. Žubrienky, pri ktorých sa v danom časovom rámci nedokončila metamorfóza, žubrienky, ktoré sú v kohorte podvzorky jedincov

v larválnom štádiu, juvenilné žaby vyradené v rámci selekcie a všetky zvieratá, ktoré uhynú v dôsledku chyby pri pokuse, sa považujú za cenzurované údaje a nie sú zahrnuté v menovateli pri výpočte percentuálnej hodnoty. Pred štatistickými analýzami sa má pri podieloch mortality uskutočniť arkussínusová transformácia druhej odmocniny. Alternatívne možno použiť step-down Cochranov-Armitageov test, prípadne s Raovou-Scottovou úpravou pri výskyte nadmerného rozptylu.

Hmotnosť a dĺžka (údaje o raste)

Samce a samice nie sú počas metamorfózy pohlavne dimorfné, preto sa údaje o raste podvzorky jedincov v larválnom štádiu majú analyzovať nezávisle od pohlavia. Údaje o raste juvenilných jedincov sa však analyzujú samostatne na základe genetického pohlavia. V prípade týchto sledovaných parametrov môže byť potrebná logaritmická transformácia, keďže logaritmická normalita údajov o veľkosti nie je nezvyčajná.

Index pomeru hmotnosti pečene k hmotnosti tela (LSI)

Hmotnosti pečene sa normalizujú ako podiel celkovej hmotnosti tela (t. j. LSI) a analyzujú sa oddelene na základe genetického pohlavia.

Čas do NF štádia 62

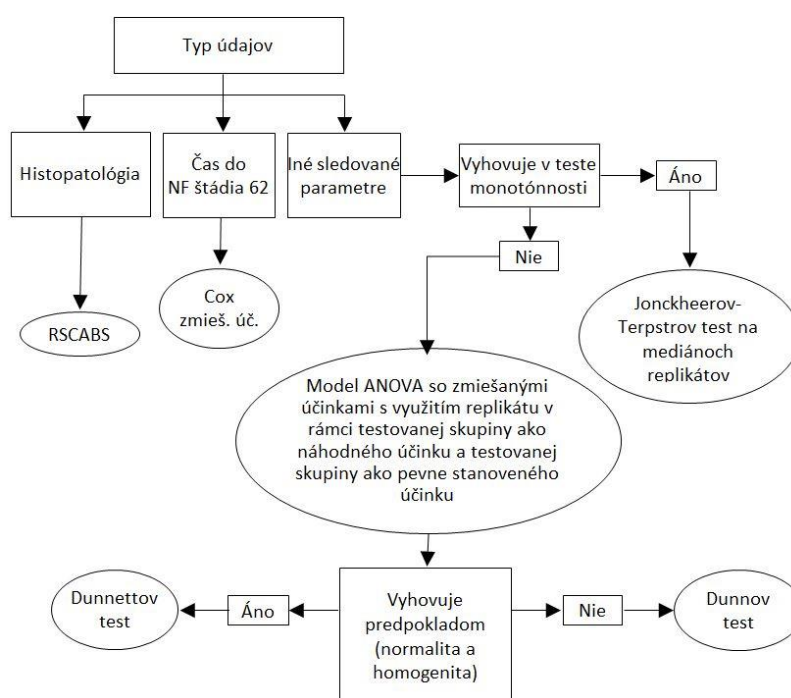
Údaje o čase do metamorfózy sa spracúvajú ako údaje o čase do udalosti, pričom úhyny alebo jedince, ktoré nedosiahli NF štádium 62 do 70 dní, sa považujú za cenzurované údaje po časovom limite (t. j. skutočná hodnota je väčšia ako 70 dní, ale štúdia sa končí pred tým, ako zvieratá dosiahnu NF štádium 62 do 70 dní). Na stanovenie času ukončenia testu sa má použiť medián času do dokončenia metamorfózy v NF štádiu 62 v kontrolách s vodou na riedenie. Medián času do dokončenia metamorfózy možno stanoviť pomocou Kaplanových-Meierových odhadov limitu súčinu. Tento sledovaný parameter sa analyzuje pomocou Coxovho modelu proporcionálnych rizík so zmiešanými účinkami, v ktorom sa zohľadňuje štruktúra štúdie s využitím replikátov.

Údaje týkajúce sa histopatológie (skóre závažnosti a vývojové štádiá)

Údaje týkajúce sa histopatológie sú v podobe skóre závažnosti alebo vývojových štádií. V teste s označením RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) sa využíva step-down Cochranov-Armitageov test trendu s Raovou-Scottovou úpravou na jednotlivých úrovniach závažnosti histopatologickej reakcie (Green a kol., 2014). Pomocou Raovej-Scottovej úpravy sa do testu začleňuje koncepcia pokusu s využitím nádob s replikátmi. V postupe označenom ako „by Slices“ je začlenené biologické očakávanie, že závažnosť účinku má tendenciu zvyšovať sa so zvyšujúcimi sa dávkami alebo koncentráciami, pričom sa zachovávajú skóre jednotlivých jedincov a preukazuje sa závažnosť každého zisteného účinku. Postupom RSCABS sa určuje nielen to, ktoré testované skupiny sa štatisticky odlišujú od kontrol (t. j. sú v nich závažnejšie patologické javy než pri kontrolách), ale aj to,

pri akom skóre závažnosti k danému rozdielu dochádza, čím sa získava veľmi potrebný kontext pre analýzu. V prípade určovania vývojového štádia gonád a reprodukčných trubíc sa má pri údajoch použiť dodatočná manipulácia vzhľadom na predpoklad metódy RSCABS, že závažnosť účinku sa zvyšuje s dávkou. Pozorovaný účinok môže predstavovať oneskorenie alebo zrýchlenie vývoja. Údaje o určení vývojového štádia sa preto analyzujú tak, ako sú uvádzané, na zistenie zrýchlenia vývoja a potom sa manuálne invertujú pred druhou analýzou s cieľom zistiť oneskorenie vývoja.

Obrázok 1: Schéma rozhodovania z hľadiska štatistickej analýzy pre údaje skúšky LAGDA



LITERATÚRA

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

Dodatok 8

ÚVAHY TÝKAJÚCE SA SLEDOVANIA A MINIMALIZOVANIA VÝSKYTU SKOLIÓZY

Idiopatická skolióza, ktorej zvyčajným prejavom pri žubrienkach druhu *Xenopus laevis* je ohnutý chvost, môže komplikovať pozorovania morfológie a správania v testovaných populáciách. Je potrebné vyvinúť úsilie, aby sa minimalizoval alebo eliminoval výskyt skoliózy v chovnej populácii aj v testovacích podmienkach. V konečnom teste sa odporúča, aby bola prevalencia miernej a závažnej skoliózy nižšia ako 10 %, čím sa zlepši spoľahlivosť testu pri detekcii vývojových účinkov súvisiacich s testovanou chemikáliou v prípade inak zdravých lariev obojživelníkov.

Pri denných pozorovaniach počas konečného testu sa zaznamenáva výskyt (počet jednotlivých prípadov) a závažnosť skoliózy v prípade jej výskytu. Povahu abnormality je potrebné opísať vzhľadom na miesto (napr. pred alebo za kloakou) a smer zakrivenia (napríklad laterálne alebo dorzoventrálne). Závažnosť možno hodnotiť týmito stupňami:

(NR) Nepozorovaná: zakrivenie nie je prítomné

(1) Minimálna: mierne laterálne zakrivenie za kloakou, viditeľné len v pokoji

(2) Mierna: laterálne zakrivenie za kloakou, viditeľné neustále, ktoré však nebráni v pohybe

(3) Závažná: laterálne zakrivenie pred kloakou ALEBO akékoľvek zakrivenie, ktoré bráni v pohybe, ALEBO akékoľvek dorzoventrálne zakrivenie

Vedecká poradná skupina Agentúry Spojených štátov na ochranu životného prostredia (FIFRA SAP 2013) preskúmala súhrnné údaje o skolióze v 15 skúškach metamorfózy obojživelníkov v prípade druhu *X. laevis* (NF štádium 51 až 60 a viac) a poskytla všeobecné odporúčania na zníženie prevalencie tejto abnormality v testovacích populáciách. Tieto odporúčania sú relevantné pre test LAGDA, hoci zahŕňa dlhší časový rámec vývoja.

Historická výkonnosť pri rozmnožovaní

Ako chovné páry sa majú vo všeobecnosti používať kvalitné a zdravé dospelé jedince. Eliminovaním chovných párov, ktorých potomstvo malo skoliózu, sa môže v priebehu času minimalizovať jej výskyt. Prospešné môže byť obzvlášť minimalizovanie využívania chovných populácií získaných vo voľnej prírode. Obdobie expozície v skúške LAGDA sa začína s embryami v NF štádiu 8 až 10 a na začiatku testu nie je možné určiť, či sa pri daných jedincoch vyskytne skolióza. Okrem sledovania výskytu skoliózy pri zvieratách

zaradených do testu je potrebné zdokumentovať aj historickú výkonnosť násady (vrátane prevalencie skoliózy pri larvách, ktorým sa umožní, aby sa vyvíjali). Môže byť užitočné ďalej monitorovať tú časť násady, ktorá sa v danej štúdii nepoužije, a uviesť tieto pozorovania (FIFRA SAP 2013).

Kvalita vody

Je dôležité zabezpečiť primeranú kvalitu vody v laboratórnej chovnej populácii aj počas testu. Okrem kritérií kvality vody, ktoré sa bežne hodnotia v testoch vodnej toxicity, môže byť užitočné monitorovať a korigovať nedostatok živín (napr. nedostatok vitamínu C, vápnika, fosforu) alebo nadmerné úrovne selénu a medi, ktoré sa uvádzajú ako príčina vzniku rôznych stupňov skoliózy pri laboratórne chovaných zvieratách rodu *Rana* a *Xenopus* (Marshall a kol. 1980; Leibovitz a kol. 1992; Martínez a kol. 1992; ako uvádza FIFRA SAP 2013). Použitím vhodného režimu kŕmenia (pozri dodatok 4) a pravidelným čistením nádrží sa vo všeobecnosti zlepši kvalita vody a zdravie jedincov, ktoré predstavujú testovacie vzorky.

Potrava

V dodatku 4 sú podrobne opísané konkrétne odporúčania pre režim kŕmenia, ktorý sa osvedčil v skúške LAGDA. Odporúča sa, aby sa overovalo, či zdroje krmiva neobsahujú biologické toxíny, herbicídy a iné pesticídy, o ktorých je známe, že spôsobujú skoliózu pri druhu *X. laevis* alebo pri iných vodných živočíchoch (Schlenk a Jenkins 2013). Napríklad, expozícia určitým inhibítorom butyrylcholínesterázy sa spája so skoliózou pri rybách (Schultz a kol. 1985) a pri žabách (Bacchetta a kol. 2008).

LITERATÚRA

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

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

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

Marshall, G.A., R.L. Amborski, and D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in

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

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

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