

Bruselj, 25. februar 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

#### SPREMNI DOPIS

---

|                |                             |
|----------------|-----------------------------|
| Pošiljatelj:   | Evropska komisija           |
| Datum prejema: | 22. februar 2019            |
| Prejemnik:     | generalni sekretariat Sveta |

---

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Zadeva: | PRILOGA K UREDBI KOMISIJE (EU) .../... z dne XXX o spremembi Priloge k Uredbi (ES) št. 440/2008 o določitvi testnih metod v skladu z Uredbo (ES) št. 1907/2006 Evropskega parlamenta in Sveta o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH) zaradi njene prilagoditve tehničnemu napredku |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

---

Delegacije prejmejo priloženi dokument Annex to D060575/02.

Priloga: Annex to D060575/02

## **B.71 PRESKUSI *IN VITRO* ZA PREOBČUTLJIVOST KOŽE, S KATERIMI SE OBRAVNAVA KLJUČNI DOGODEK AKTIVACIJE DENDRITSKIH CELIC PRI POTEKU NEŽELENEGA IZIDA (AOP) ZA PREOBČUTLJIVOST KOŽE**

### **SPLOŠNI UVOD**

#### **Preskusna metoda za ključni dogodek aktivacije dendritskih celic**

1. Povzročitelj preobčutljivosti kože je snov, ki povzroči alergijski odziv po stiku s kožo, kot je opredeljeno v globalno usklajenem sistemu Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN) (1) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (uredba CLP)<sup>1</sup>. Obstaja splošno soglasje glede ključnih bioloških dogodkov, ki so osnova za preobčutljivost kože. Sedanje znanje o kemijskih in bioloških mehanizmi, povezanih s preobčutljivostjo kože, je bilo v okviru programa AOP OECD (2) povzeto kot potek neželenega izida (Adverse Outcome Pathway – AOP) od začetnega dogodka na molekulski ravni prek vmesnih dogodkov do škodljivega učinka, tj. alergijskega kontaktnega dermatitisa. V tem primeru je začetni dogodek na molekulski ravni (tj. prvi ključni dogodek) kovalentna vezava elektrofilnih snovi na nukleofilne centre v beljakovinah kože. Drugi ključni dogodek v tem poteku neželenega izida se odvija v keratinocitih ter vključuje vnetni odziv in spremembe v izražanju genov, povezanem s posebnimi potmi celičnega signaliziranja, kot so poti, odvisne od odzivnega elementa za antioksidante/elektrofile (ARE). Tretji ključni dogodek je aktivacija dendritskih celic (DC), ki se običajno ocenjuje z izražanjem posebnih celičnih površinskih označevalcev, tj. kemokinov in citokinov. Četrti ključni dogodek je aktivacija in proliferacija celic T, kar se posredno ocenjuje pri lokalni analizi bezgavk pri miših (LLNA) (3).
2. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 442E (2017). V njej so opisani preskusi *in vitro*, s katerimi se obravnavajo mehanizmi, opisani v okviru ključnega dogodka aktivacije dendritskih celic pri poteku neželenega izida za preobčutljivost kože (2). Preskusna metoda vključuje preskuse, ki jih je treba uporabiti v

---

<sup>1</sup> Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 13.12.2008, str. 1).

podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, v skladu z GHS ZN in uredbo CLP.

Preskusi, opisani v tej preskusni metodi, so:

- preskus aktivacije humane celične linije (h-CLAT);
  - preskus aktivacije celične linije U937 (U-SENS<sup>TM</sup>);
  - preskus poročevalskega gena za interlevkin-8 (preskus IL-8 Luc).
3. Preskusi, vključeni v to preskusno metodo, in ustrezne smernice OECD za preskušanje se lahko razlikujejo glede postopka, uporabljenega za pridobitev podatkov in meritev, vendar se lahko enakovredno uporabljajo za obravnavanje zahtev držav za rezultate preskusov v zvezi s ključnim dogodkom aktivacije dendritskih celic pri poteku neželenega izida za preobčutljivost kože, hkrati pa se izkoristi medsebojno priznavanje podatkov OECD.

#### **Osnova in načela preskusov, vključenih v preskusno metodo, ki temelji na ključnem dogodku**

4. Ocena preobčutljivosti kože se je običajno izvajala z uporabo laboratorijskih živali. Pri klasični metodi, pri kateri se uporabljajo morski prašički, tj. Magnusson-Kligmanovem maksimizacijskem preskusu na morskih prašičkih (preskus GPMT) in Buehlerjevem preskusu (PM B.6 (4)), se ocenjuje preobčutljivost kože v fazah indukcije in elicitacije. Lokalna analiza bezgavk pri miših, LLNA (PM B.42) (3) in njeni dve neradioaktivni prilagoditvi, tj. LLNA: DA (PM B.50 (5)) in LLNA: BrdU-ELISA (PM B.51 (6)), vse ocenjujejo le indukcijski odziv in so bile prav tako sprejete, saj je njihova prednost v primerjavi s preskusi na morskih prašičkih v tem, da upoštevajo dobrobit živali in zagotavljajo objektivne meritve v fazi indukcije preobčutljivosti kože.
5. Nedavno sta bili za prispevek k ocenjevanju nevarnosti kemikalij za preobčutljivost kože sprejeti preskusni metodi *in chemico* in *in vitro*, ki temeljita na mehanističnih merilih ter s katerima se obravnavata prvi ključni dogodek (PM B.59; neposredni preskus reaktivnosti peptidov (7)) in drugi ključni dogodek (PM B.60; luciferazna preskusna metoda z ARE-Nrf2 (8)).
6. S preskusi, opisanimi v tej preskusni metodi, se kvantificirajo bodisi spremembe v izražanju celičnih površinskih označevalcev, povezanih s procesom aktivacije monocitov in dendritskih celic po izpostavljenosti povzročiteljem preobčutljivosti (npr. CD54, CD86), bodisi spremembe v izražanju IL-8, tj. citokina, povezanega z aktivacijo dendritskih celic. Poročalo se je, da povzročitelji preobčutljivosti kože sprožijo izražanje celičnih membranskih označevalcev, kot so CD40, CD54, CD80, CD83 in CD86, ter nastanek provnetnih citokinov, kot sta IL-1 $\beta$  in TNF- $\alpha$ , ter več kemokinov, vključno z IL-8 (CXCL8) in CCL3 (9) (10) (11) (12), povezanih z aktivacijo dendritskih celic (2).

7. Ker pa je aktivacija dendritskih celic le en ključni dogodek pri poteku neželenega izida za preobčutljivost kože (2) (13), informacije, pridobljene samo s preskusi, s katerimi se merijo označevalci aktivacije dendritskih celic, morda ne bodo zadostovale za ugotovitev obstoja ali neobstoja potenciala kemikalij za povzročanje preobčutljivosti kože. Zato se predlaga, naj se podatki, pridobljeni s preskusi, opisanimi v tej preskusni metodi, uporabijo v podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože (tj. kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP) in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, kadar se uporabijo v okviru celostnih pristopov k testiranju in ocenjevanju (Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA)), skupaj z drugimi ustreznimi dopolnilnimi informacijami, ki izhajajo na primer iz poskusov *in vitro*, s katerimi se obravnavajo drugi ključni dogodki pri poteku neželenega izida preobčutljivosti kože, in nepreskusnih metod, vključno z navzkrižnim branjem pri podobnih kemijskih snoveh (13). Primeri uporabe podatkov, pridobljenih s temi preskusi v okviru opredeljenih pristopov, tj. standardiziranih pristopov v zvezi s sklopom uporabljenih virov informacij in v zvezi s postopkom, uporabljenim za podatke za pridobitev napovedi, so bili objavljeni (13) ter se lahko uporabijo kot koristni elementi v okviru IATA.
8. Preskusov, opisanih v tej preskusni metodi, ni mogoče uporabiti samostojno niti za razvrstitev povzročiteljev preobčutljivosti kože v podkategoriji 1A in 1B, kot sta opredeljeni v GHS ZN/uredbi CLP, za organe, ki uporabljajo ti neobvezni podkategoriji, niti za napoved stopnje povzročanja preobčutljivosti v okviru odločanja o oceni varnosti. Vendar pa je, odvisno od regulativnega okvira, pozitivne rezultate, pridobljene s temi metodami, kot take mogoče uporabiti za razvrstitev kemikalije v kategorijo 1 po GHS ZN/uredbi CLP.
9. Pojem ‚preskusna kemikalija‘ se pri tej preskusni metodi nanaša na to, kar se preskuša<sup>1</sup>, in ni povezan z uporabnostjo preskusov za preskušanje snovi iz ene sestavine, snovi z več sestavinami in/ali zmesi. Za zdaj so na voljo omejene informacije o uporabnosti preskusov za snovi z več sestavinami/zmesi (14) (15). Ne glede na to so preskusi tehnično ustrezni za preskušanje snovi z več sestavinami in zmesi. Preden se ta preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, pa je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen<sup>2</sup>. Kadar obstaja regulativna

---

<sup>1</sup> Junija 2013 je bil na skupnem zasedanju OECD sprejet dogovor, da bi bilo treba v novih in posodobljenih smernicah OECD za preskušanje pojem ‚preskusna kemikalija‘, ki opisuje, kaj se preskuša, uporabljati dosledneje, kjer je to mogoče.

<sup>2</sup> Ta stavek je bil predlagan in sprejet aprila 2014 na sestanku delovne skupine nacionalnih koordinatorjev za



zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni. Poleg tega je treba pri preskušanju snovi z več sestavinami ali zmesi upoštevati morebitno interferenco citotoksičnih sestavin z opaženimi odzivi.

---

smernice za preskušanje.

## VIRI

- (1) Združeni narodi (ZN) (2015). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS). Šesta revidirana izdaja. New York in Ženeva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Na voljo na: [https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev06/06files\\_e.html](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 (št. 168). Na voljo na: [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) Poglavje B.42 te priloge: Lokalna analiza bezgavk. Poglavje B.6 te priloge: Senzibilizacija kože.
- (4) Poglavje B.50 te priloge: Preobčutljivost kože: lokalna analiza bezgavk: DA.
- (5) Poglavje B.51 te priloge: Preobčutljivost kože: lokalna analiza bezgavk: BrdU-ELISA.
- (6) Poglavje B.59 te priloge: Preobčutljivost kože *in chemico*: neposredni preskus reaktivnosti peptidov (DPRA).
- (7) Poglavje B.60 te priloge: Preobčutljivost kože *in vitro*: luciferazna preskusna metoda z ARE-Nrf2.
- (8) Steinman, R. M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271–96.
- (9) Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Azuma, M., Okumura, K., Lanier, L. L., in 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., in Tagami, H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 27:3031–8.
- (11) Aiba, S., Manome, H., Nakagawa, S., Mollah, Z. U., Mizuashi, M., Ohtani, T., Yoshino, Y., in 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, NiCl<sub>2</sub> and DNCB. *J Invest Dermatol* 120:390–8.
- (12) OECD (2016). Series on Testing & Assessment (št. 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. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na: <https://community.oecd.org/community/iatass>.

- (13) Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., Kosaka, N., Ishikawa, M., Nukada, Y., Miyazawa, M., Ito, Y., Nishiyama, N., Itagaki, H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275–284.
- (14) Piroird, C., Ovigne, J. M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901–916.

### Dodatek 1

## **PREOBČUTLJIVOST KOŽE *IN VITRO*: PRESKUS AKTIVACIJE HUMANE CELIČNE LINIJE (H-CLAT)**

### **ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE**

1. S preskusom h-CLAT se kvantificirajo spremembe v izražanju celičnih površinskih označevalcev, povezanih s procesom aktivacije monocitov in dendritskih celic (DC) (tj. CD86 in CD54), v celični liniji humane monocitne levkemije THP-1 po izpostavljenosti povzročiteljem preobčutljivosti (1) (2). Izmerjene ravni izražanja celičnih površinskih označevalcev CD86 in CD54 se nato uporabijo za podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože.
2. Preskus h-CLAT je bil ocenjen v validacijski študiji pod vodstvom Referenčnega laboratorija Evropske unije za alternative testiranju na živalih (EURL ECVAM) in z naknadnim neodvisnim medsebojnim strokovnim pregledom, ki ga je izvedel Znanstveni svetovni odbor (ESAC) EURL ECVAM. Ob upoštevanju vseh razpoložljivih dokazov ter prispevkov regulatorjev in deležnikov je EURL ECVAM (3) uporabo preskusa h-CLAT priporočil v okviru IATA za podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, zaradi razvrstitve glede na nevarnost in označevanje. Primeri uporabe podatkov preskusa h-CLAT v povezavi z drugimi informacijami so navedeni v virih (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).
3. Izkazalo se je, da se lahko preskus h-CLAT prenese v laboratorije, ki imajo izkušnje s tehnikami gojenja celičnih kultur in analizo s pretočno citometrijo. Stopnja ponovljivosti napovedi, ki jo je mogoče pričakovati pri preskusu, je v enem in več laboratorijih 80-odstotna (3) (12). Rezultati, pridobljeni z validacijsko študijo (13) in drugimi objavljenimi študijami (14), na splošno kažejo, da je v primerjavi z rezultati LLNA točnost pri razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože (tj. kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP) in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti, 85-odstotna (N = 142), pri čemer je občutljivost 93-odstotna (94/101), specifičnost pa 66-odstotna (27/41) (na podlagi ponovne analize, ki jo je izvedel EURL ECVAM (12), ob upoštevanju vseh obstoječih podatkov in brez upoštevanja negativnih rezultatov za kemikalije z vrednostjo log Kow, večjo od 3,5, kot je opisano v odstavku 4). Lažno negativne napovedi pri preskusu h-CLAT se bodo bolj verjetno nanašale na kemikalije z nizko do zmerno stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (tj. podkategorija 1B po GHS ZN/uredbi CLP) kot na kemikalije z visoko stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (tj. podkategorija 1A po GHS ZN/uredbi CLP) (4) (13) (15). Vse te informacije skupaj kažejo, da metoda h-CLAT uporabno prispeva k opredelitvi nevarnosti za povzročanje preobčutljivosti kože. Vendar so tukaj navedene vrednosti

točnosti za preskus h-CLAT kot samostojni preskus zgolj okvirne, saj ga je treba obravnavati skupaj z drugimi viri informacij v okviru IATA ter v skladu z določbami odstavkov 7 in 8 iz Splošnega uvoda. Poleg tega je treba pri ocenjevanju metod za preobčutljivost kože, ki se ne izvajajo na živalih, upoštevati, da preskus LLNA in druga testiranja na živalih ne odražajo v celoti razmer pri človeku.

4. Na podlagi trenutno razpoložljivih podatkov se je pokazalo, da se metoda h-CLAT lahko uporablja za preskusne kemikalije, ki zajemajo različne organske funkcionalne skupine, mehanizme reakcije, stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (kot je določena v študijah *in vivo*) ter fizikalno-kemijske lastnosti (3) (14) (15). Metoda h-CLAT se uporablja za preskusne kemikalije, ki so topne ali tvorijo stabilno disperzijo (tj. koloid ali suspenzija, v kateri se preskusna kemikalija ne usede ali loči od topila/vehikla v različne faze) v ustreznem topilu/vehiklu (glej odstavek 14). Preskusne kemikalije z vrednostjo Log Kow, večjo od 3,5, običajno dajo lažno negativne rezultate (14). Zato se negativni rezultati, pridobljeni s preskusnimi kemikalijami z vrednostjo Log Kow, večjo od 3,5, ne bi smeli upoštevati. Pozitivni rezultati, pridobljeni s preskusnimi kemikalijami z vrednostjo Log Kow, večjo od 3,5, pa bi se še vedno lahko uporabili za podporo opredelitvi preskusne kemikalije kot povzročitelja preobčutljivosti kože. Poleg tega se lahko zaradi omejene presnovne zmogljivosti uporabljene celične linije (16) ter poskusnih pogojev pri prohaptenih (tj. snoveh, ki potrebujejo encimsko aktivacijo, na primer z encimi P450) in prehaptenih (tj. snoveh, aktiviranih z oksidacijo), zlasti pri tistih s počasno oksidacijo, prav tako pojavijo negativni rezultati v preskusu h-CLAT (15). Fluorescentne preskusne kemikalije se lahko ocenjujejo s preskusom h-CLAT (17), vendar bodo močne fluorescentne preskusne kemikalije, ki svetlobo oddajajo na isti valovni dolžini kot fluorescein izotiocianat (FITC) ali propidijev jodid (PI), vplivale na zaznavanje s pretočno citometrijo, zato jih z uporabo protiteles, konjugiranih s FITC, ali PI ni mogoče pravilno oceniti. V takem primeru se lahko uporabijo druga s fluorokromom označena protitelesa oziroma drugi označevalci citotoksičnosti, če je mogoče dokazati, da dajejo podobne rezultate kot s FITC označena protitelesa (glej odstavek 24) ali PI (glej odstavek 18), npr. s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 1.2. Glede na navedeno je treba negativne rezultate razlagati v okviru navedenih omejitev in skupaj z drugimi viri informacij v okviru IATA. Kadar obstajajo dokazi, da metode h-CLAT ni mogoče uporabiti za druge specifične kategorije preskusnih kemikalij, se ta metoda zanje ne bi smela uporabiti.
5. Kot je navedeno zgoraj, metoda h-CLAT podpira razlikovanje med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože. Kadar se uporablja v celostnih pristopih, kot je IATA, pa lahko prispeva tudi k oceni stopnje povzročanja preobčutljivosti kože (4) (5) (9). Vendar je potrebno nadaljnje delo, ki po

možnosti temelji na podatkih za ljudi, da se določi, kako bi lahko rezultati preskusa h-CLAT prispevali k oceni stopnje povzročanja preobčutljivosti.

6. Opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.1.

## NAČELO PRESKUSA

7. Metoda h-CLAT je preskus *in vitro*, s katerim se kvantificirajo spremembe v izražanju celičnih površinskih označevalcev (tj. CD86 in CD54) na celični liniji humane monocitne levkemije, tj. celicah THP-1, po 24-urni izpostavljenosti preskusni kemikaliji. Te površinske molekule so tipični označevalci aktivacije monocitnih celic THP-1 in lahko posnemajo aktivacijo dendritskih celic, ki ima ključno vlogo pri označevanju celic T. Spremembe v izražanju površinskih označevalcev se merijo s pretočno citometrijo po obarvanju celic s protitelesi, označenimi s fluorokromom. Sočasno se izvede tudi meritev citotoksičnosti, da se oceni, ali se pri subcitotoksičnih koncentracijah pojavi povečano izražanje površinskih označevalcev. Izračuna se relativna intenziteta fluorescence površinskih označevalcev v primerjavi s kontrolo s topilom/vehiklom in uporabi v napovednem modelu (glej odstavek 26) za podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti.

## DOKAZOVANJE USPOSOBLJENOSTI

8. Pred redno uporabo preskusa, opisanega v tem dodatku k preskusni metodi B.71, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost, tako da uporabijo 10 snovi za preverjanje usposobljenosti, navedenih v Dodatku 1.2. Poleg tega morajo uporabniki preskusov vzdrževati zbirko preteklih podatkov, pridobljenih s preverjanji reaktivnosti (glej odstavek 11) ter pozitivnimi kontrolami in kontrolami s topilom/vehiklom (glej odstavke od 20 do 22), ter te podatke uporabiti za potrditev, da se v njihovem laboratoriju vzdržuje obnovljivost preskusa skozi čas.

## POSTOPEK

9. Ta preskus temelji na protokolu št. 158 storitve za podatkovne zbirke o alternativnih metodah namesto poskusov na živalih (DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation (DB-ALM)) za preskus h-CLAT (18), tj. protokolu, ki se uporablja v validacijski študiji, ki jo usklajuje EURL ECVAM. Priporočljivo je, da se ta protokol uporablja pri izvajanju in uporabi metode h-CLAT v laboratoriju. V nadaljevanju so opisani glavni elementi in postopki za metodo h-CLAT, ki vključuje dva koraka: *poskus za ugotavljanje odmerka* in *meritev izražanja CD86/CD54*.

### Priprava celic

10. Za izvedbo metode h-CLAT je treba uporabiti celično linijo humane monocitne levkemije, THP-1. Priporočljivo je, da se celice (TIB-202™) pridobijo iz celične banke z dobrimi kvalifikacijami, kot je American Type Culture Collection.
11. Celice THP-1 se gojijo pri 37 °C v navlaženi atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub> v gojišču RPMI-1640, dopolnjenem z 10 % fetusnega seruma goveda (FBS), 0,05 mM 2-merkaptetanola, 100 enotami/ml penicilina in 100 µg/ml streptomicina. Uporabi penicilina in streptomicina v gojišču se je mogoče izogniti. Vendar morajo v takem primeru uporabniki preveriti, da odsotnost antibiotikov v gojišču ne vpliva na rezultate, na primer s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti, navedenih v Dodatku 1.2. Vsekakor je treba za zmanjšanje tveganja kontaminacije upoštevati dobre prakse na področju gojenja celičnih kultur ne glede na prisotnost ali odsotnost antibiotikov v gojišču za celične kulture. Celice THP-1 se rutinsko nasadijo na 2 do 3 dni z gostoto od 0,1 do  $0,2 \times 10^6$  celic/ml. Vzdrževati jih je treba pri gostoti od 0,1 do  $1,0 \times 10^6$  celic/ml. Preden se celice uporabijo za preskus, jih je treba kvalificirati s preverjanjem reaktivnosti. Reaktivnost celic je treba preveriti z uporabo pozitivnih kontrol, tj. 2,4-dinitroklorobenzena (DNCB) (št. CAS 97-00-7,  $z \geq 99$ -odstotno čistostjo) in nikljevega sulfata (NiSO<sub>4</sub>) (št. CAS 10101-97-0,  $z \geq 99$ -odstotno čistostjo), in negativne kontrole, tj. mlečne kisline (LA) (št. CAS 50-21-5,  $z \geq 85$ -odstotno čistostjo), dva tedna po odtajanju. DNCB in NiSO<sub>4</sub> morata povzročiti pozitiven odziv obeh celičnih površinskih označevalcev CD86 in CD54, LA pa mora povzročiti negativen odziv obeh celičnih površinskih označevalcev CD86 in CD54. Za poskus se uporabijo samo celice, ki so uspešno prestale preverjanje reaktivnosti. Celice se lahko namnožujejo do dva meseca po odtajanju. Število pasaž ne bi smelo presegati 30. Preverjanje reaktivnosti je treba izvesti v skladu s postopki, opisanimi v odstavkih od 20 do 24.
12. Za preskušanje se celice THP-1 nasadijo z gostoto bodisi  $0,1 \times 10^6$  celic/ml bodisi  $0,2 \times 10^6$  celic/ml in predhodno 72 ur oziroma 48 ur gojijo v stekleničkah za gojenje celičnih kultur. Pomembno je, da je gostota celic v steklenički za gojenje celičnih kultur takoj po obdobju predhodnega gojenja v vsakem poskusu čim bolj konsistentna (z uporabo enega od dveh zgoraj opisanih pogojev predhodnega gojenja), ker bi lahko gostota celic v steklenički za gojenje celičnih kultur takoj po predhodnem gojenju vplivala na izražanje CD86/CD54, ki ga povzročijo alergeni (19). Na dan preskusa se celice, odvzete iz stekleničke za gojenje celičnih kultur, ponovno suspendirajo v svežem gojišču z gostoto  $2 \times 10^6$  celic/ml. Nato se celice nanesejo na 24-jamično ploščo z ravnim dnom po 500 µl ( $1 \times 10^6$  celic/jamico) ali 96-jamično ploščo z ravnim dnom po 80 µl ( $1,6 \times 10^5$  celic/jamico).

### Poskus za ugotavljanje odmerka

13. *Poskus za ugotavljanje odmerka* se izvede za določitev CV75, ki je koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri je viabilnost celic (CV) 75-odstotna v primerjavi s kontrolo s topilom/vehiklom. Vrednost CV75 se uporabi za določitev koncentracije preskusnih kemikalij za meritev izražanja *CD86/CD54* (glej odstavke od 20 do 24).

*Priprava preskusnih kemikalij in kontrolnih snovi*

14. Preskusne kemikalije in kontrolne snovi se pripravijo na dan preskusa. Za metodo h-CLAT se preskusne kemikalije raztopijo ali stabilno dispergirajo (glej tudi odstavek 4) v fiziološki raztopini ali gojišču kot prvih možnostih topila/vehikla ali dimetil sulfoksidu (DMSO,  $\geq 99$ -odstotno čistostjo) kot drugi možnosti topila/vehikla, če preskusna kemikalija ni topna ali ne tvori stabilne disperzije v prejšnjih dveh topilih/vehiklih, do končnih koncentracij 100 mg/ml (v fiziološki raztopini ali gojišču) ali 500 mg/ml (v DMSO). Poleg zgoraj opisanih topil/vehiklov se lahko uporabijo tudi drugi, če je zagotovljena zadostna znanstvena utemeljitev. Upoštevati je treba stabilnost preskusne kemikalije v končnem topilu/vehiklu.
15. Začenši s 100 mg/l (v fiziološki raztopini ali gojišču) ali 500 mg/ml (v DMSO) osnovnimi raztopinami preskusnih kemikalij je treba izvesti naslednje korake za redčenje:
- za fiziološko raztopino ali gojišče kot topilo/vehikel: pripravi se osem osnovnih raztopin (osem koncentracij) z zaporednimi dvakratnimi redčenji z uporabo ustreznega topila/vehikla. Te osnovne raztopine se nato nadalje 50-kratno razredčijo v gojišče (delovne raztopine). Če najvišja končna koncentracija na plošči, ki znaša 1 000  $\mu\text{g/ml}$ , ni toksična, je treba največjo koncentracijo znova določiti, tako da se izvede nov preskus citotoksičnosti. Končna koncentracija na plošči ne bi smela presegati 5 000  $\mu\text{g/ml}$  za preskusne kemikalije, raztopljene ali stabilno dispergirane v fiziološki raztopini ali gojišču;
  - za DMSO kot topilo/vehikel: pripravi se osem osnovnih raztopin (osem koncentracij) z zaporednimi dvakratnimi redčenji z uporabo ustreznega topila/vehikla. Te osnovne raztopine se nato nadalje 250-kratno razredčijo v gojišče (delovne raztopine). Končna koncentracija na plošči ne bi smela presegati 1 000  $\mu\text{g/ml}$ , tudi če ta koncentracija ni toksična.

Delovne raztopine se nazadnje uporabijo za izpostavljenost, tako da se količini suspenzije celic THP-1 na plošči doda enaka količina delovne raztopine (glej tudi odstavek 17), da se doseže nadaljnja dvakratna razredčina (običajno je končni razpon koncentracij na plošči od 7,81 do 1 000  $\mu\text{g/ml}$ ).

16. Kontrola s topilom/vehiklom, uporabljena pri metodi h-CLAT, je gojišče (za preskusne kemikalije, raztopljene ali stabilno dispergirane (glej odstavek 4) v gojišču ali fiziološki raztopini) ali DMSO (za preskusne kemikalije, raztopljene ali stabilno dispergirane v



DMSO), ki se preskusi pri enotni končni koncentraciji na plošči v višini 0,2 %. Za kontrolo se uporabi enako redčenje, kot je opisano za delovne raztopine v odstavku 15.

#### *Nanos preskusnih kemikalij in kontrolnih snovi*

17. Gojišče ali delovne raztopine, opisani v odstavkih 15 in 16, se zmešajo v razmerju 1 : 1 (v/v) s suspenzijami celic, pripravljenimi na 24- ali 96-jamični plošči z ravnim dnom (glej odstavek 12). Obdelane plošče se nato inkubirajo  $24 \pm 0,5$  ure pri  $37^\circ\text{C}$  v prisotnosti 5 %  $\text{CO}_2$ . Paziti je treba, da hlapne preskusne kemikalije ne izhlapijo in da ne pride do navzkrižne kontaminacije med jamicami s preskusnimi kemikalijami, npr. z zatesnitvijo plošče pred inkubacijo s preskusnimi kemikalijami (20).

#### *Barvanje s propidijevim jodidom (PI)*

18. Po  $24 \pm 0,5$ -urni izpostavljenosti se celice prenesejo v epruvete za vzorce in zberejo s centrifugiranjem. Supernatanti se zavržejo, preostale celice pa znova suspendirajo z 200  $\mu\text{l}$  (v primeru 96 jamic) ali 600  $\mu\text{l}$  (v primeru 24 jamic) fosfatnega pufru s soljo, ki vsebuje 0,1 % govejega serumskega albumina (pufer za barvanje). 200  $\mu\text{l}$  suspenzije celic se prenese na 96-jamično ploščo z ukrivljenim dnom (v primeru 96 jamic) ali v mikroepruveto (v primeru 24 jamic) ter dvakrat spere z 200  $\mu\text{l}$  (v primeru 96 jamic) ali 600  $\mu\text{l}$  (v primeru 24 jamic) pufru za barvanje. Nazadnje se celice znova suspendirajo v pufru za barvanje (npr. 400  $\mu\text{l}$ ), nato se doda raztopina PI (npr. 20  $\mu\text{l}$ ) (na primer končna koncentracija PI je 0,625  $\mu\text{g/ml}$ ). Uporabijo se lahko tudi drugi označevalci citotoksičnosti, kot so 7-aminoactinomycin D (7-AAD), tripan modro ali drugi, če je mogoče dokazati, da alternativna barvila zagotavljajo podobne rezultate kot PI, na primer s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti, navedenih v Dodatku 1.2.

#### *Merjenje citotoksičnosti s pretočno citometrijo in ocena vrednosti CV75*

19. Vnos PI se analizira s pretočno citometrijo z merilnim kanalom FL-3. Pridobi se skupaj 10 000 živih celic (negativni PI). Viabilnost celic se lahko izračuna z naslednjo enačbo v citometrijskem analiznem programu. Kadar je viabilnost celic majhna, je treba pridobiti do 30 000 celic, vključno z mrtvimi celicami. Alternativno se lahko podatki zajemajo eno minuto po začetku analize.

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

Vrednost CV75 (glej odstavek 13), tj. koncentracija, pri kateri se pokaže 75-odstotno preživetje celic THP-1 (25-odstotna citotoksičnost), se izračuna z log-linearno interpolacijo z naslednjo enačbo:

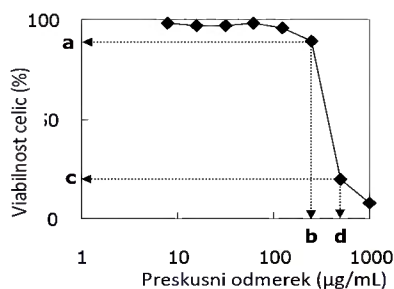
$$\text{Log CV75} = \frac{(75-c) \times \text{Log}(b) - (75-a) \times \text{Log}(d)}{a-c}$$

pri čemer je:

a najnižja vrednost viabilnosti celic nad 75 %,

c najvišja vrednost viabilnosti celic pod 75 %,

b in d sta koncentraciji, pri katerih se pokaže vrednost viabilnosti celic a oziroma c.



Za pridobitev CV75 se lahko uporabijo tudi drugi pristopi, če se dokaže, da to ne vpliva na rezultate (npr. s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti).

### Meritev izražanja CD86/CD54

#### Priprava preskusnih kemikalij in kontrolnih snovi

20. Uporabi se ustrezno topilo/vehikel (fiziološka raztopina, gojišče ali DMSO; glej odstavek 14), da se preskusne kemikalije raztopijo ali stabilno dispergirajo. Preskusne kemikalije se najprej razredčijo do koncentracije, ki ustreza 100-kratniku (za fiziološko raztopino ali gojišče) ali 500-kratniku (za DMSO)  $1,2 \times CV75$ , določeni v *poskusu za ugotavljanje odmerka* (glej odstavek 19). Če CV75 ni mogoče določiti (tj. če v *poskusu za ugotavljanje odmerka* ni ugotovljena zadostna citotoksičnost), je treba kot začetno koncentracijo uporabiti najvišjo raztopljeno ali stabilno dispergirano koncentracijo preskusne kemikalije, pripravljeno z vsakim topilom/vehiklom. Opozoriti je treba, da končna koncentracija na plošči ne bi smela presegati 5 000 µg/ml (v primeru fiziološke raztopine ali gojišča) ali 1 000 µg/ml (v primeru DMSO). Nato se izvedejo zaporedna 1,2-kratna redčenja z uporabo ustreznega topila/vehikla, da se pridobijo osnovne raztopine (osem koncentracij od  $100 \times 1,2 \times CV75$  do  $100 \times 0,335 \times CV75$  (za fiziološko raztopino ali gojišče) ali od  $500 \times 1,2 \times CV75$  do  $500 \times 0,335 \times CV75$  (za DMSO)), ki se preskusijo v metodi h-CLAT (za primer načrta odmerjanja glej protokol DB-ALM št. 158). Osnovne raztopine se nato nadalje 50-kratno (za fiziološko raztopino ali gojišče) ali 250-kratno (za DMSO) razredčijo v gojišče (delovne raztopine). Te delovne raztopine se nazadnje uporabijo za izpostavljenost z nadaljnjim končnim dvakratnim faktorjem redčenja na plošči. Če rezultati ne izpolnjujejo meril za sprejemljivost, opisanih v odstavkih 29 in 30 v zvezi z viabilnostjo celic, se lahko *poskus za ugotavljanje odmerka* ponovi, da se določi

natančnejša vrednost CV75. Upoštevati je treba, da se lahko za meritev izražanja CD86/CD54 uporabijo samo 24-jamične plošče.

21. Kontrola s topilom/vehiklom se pripravi, kot je opisano v odstavku 16. Pozitivna kontrola, uporabljena pri metodi h-CLAT, je DNCB (glej odstavek 11), za katerega se osnovne raztopine pripravijo v DMSO in razredčijo, kot je opisano za osnovne raztopine v odstavku 20. DNCB je treba kot pozitivno kontrolo za *meritev izražanja CD86/CD54* uporabiti pri enotni končni koncentraciji na plošči (običajno 4,0 µg/ml). Za pridobitev koncentracije DNCB na plošči, ki znaša 4,0 µg/ml, se pripravi 2 mg/ml osnovna raztopina DNCB v DMSO in nadalje 250-krat razredči z gojiščem v 8 µg/ml delovno raztopino. Alternativno se lahko kot koncentracija pozitivne kontrole uporabi tudi CV75 DNCB, ki se določi v vsakem preskuševalnem laboratoriju. Uporabijo se lahko tudi druge primerne pozitivne kontrole, če so na voljo podatki iz preteklih preskusov za izpeljavo primerljivih meril za sprejemljivost ponovitev. Pri pozitivnih kontrolah enotna končna koncentracija na plošči ne bi smela presegati 5 000 µg/ml (v primeru fiziološke raztopine ali gojišča) ali 1 000 µg/ml (v primeru DMSO). Merila za sprejemljivost ponovitev so enaka kot merila, opisana za preskusno kemikalijo (glej odstavek 29), razen zadnjega merila za sprejemljivost, saj se pozitivna kontrola preskusi pri eni sami koncentraciji.

#### *Nanos preskusnih kemikalij in kontrolnih snovi*

22. Za vsako preskusno kemikalijo in kontrolno snov je potreben en poskus za pridobitev napovedi. Vsak poskus je sestavljen iz vsaj dveh neodvisnih ponovitev za *meritev izražanja CD86/CD54* (glej odstavke od 26 do 28). Vsaka neodvisna ponovitev se izvede na drug dan ali isti dan, če se za vsako ponovitev: (a) pripravijo neodvisne sveže osnovne raztopine in delovne raztopine preskusne kemikalije ter raztopine protiteles in (b) uporabijo neodvisno odvzete celice (npr. celice se odzamejo iz različnih stekleničk za gojenje celičnih kultur); celice lahko sicer izhajajo iz iste pasaže. Preskusne kemikalije in kontrolne snovi, pripravljene kot delovne raztopine (500 µl), se zmešajo s 500 µl suspendiranih celic ( $1 \times 10^6$  celic) v razmerju 1 : 1, nato se celice inkubirajo  $24 \pm 0,5$  ure, kot je opisano v odstavkih 20 in 21. Pri vsaki ponovitvi zadostuje en sam ponovljen vzorec za vsako koncentracijo preskusne kemikalije in kontrolne snovi, saj se napoved pridobi iz vsaj dveh neodvisnih ponovitev.

#### *Barvanje celic in analiza*

23. Po  $24 \pm 0,5$ -urni izpostavljenosti se celice s 24-jamične plošče prenesejo v epruvete za vzorce, zberejo s centrifugiranjem in nato dvakrat sperejo z 1 ml pufru za barvanje (po potrebi se lahko opravijo dodatna spiranja). Po spiranju se celice blokirajo s 600 µl raztopine za blokiranje (pufer za barvanje, ki vsebuje 0,01 % (w/v) globulina (Cohnova frakcija II, III, humana; SIGMA, #G2388-10G ali enakovreden)) in 15 minut inkubirajo pri

4 °C. Po blokiranju se celice razdelijo v tri alikvote po 180 µl na 96-jamično ploščo z ukrivljenim dnom ali v mikroepruveto.

24. Po centrifugiranju se celice 30 minut barvajo s 50 µl s FITC označenih protiteles anti-CD86, anti-CD54 ali mišjih protiteles (izotipa) IgG1 pri 4°C. Protitelesa, opisana v protokolu h-CLAT DB-ALM št. 158 (18), je treba uporabiti tako, da se razredčijo v razmerju 3 : 25 v/v (za CD86 (BD-PharMingen, #555657; klon: Fun-1)) ali v razmerju 3 : 50 v/v (za CD54 (DAKO, #F7143; klon: 6.5B5) in IgG1 (DAKO, #X0927)) s pufrom za barvanje. Te faktorje redčenja protiteles so razvijalci preskusov opredelili kot faktorje, ki zagotavljajo najboljše razmerje med signalom in šumom. Na podlagi izkušenj razvijalcev preskusov je intenziteta fluorescence protiteles med različnimi serijami običajno konsistentna. Vendar lahko uporabniki razmislijo o titraciji protiteles v pogojih lastnega laboratorija, da se opredelijo najboljše koncentracije za uporabo. Uporabijo se lahko tudi druga s fluorokromom označena protitelesa anti-CD86 in/ali anti-CD54, če je mogoče dokazati, da dajejo podobne rezultate kot s FITC konjugirana protitelesa, na primer s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 1.2. Opozoriti je treba, da lahko sprememba klona ali dobavitelja protiteles, kot so opisana v protokolu h-CLAT DB-ALM št. 158 (18), vpliva na rezultate. Po vsaj dvakratnem spiranju s 150 µl pufru za barvanje se celice znova suspendirajo v pufru za barvanje (npr. 400 µl), nato se doda raztopina PI (npr. 20 µl za pridobitev končne koncentracije 0,625 µg/ml) ali druga raztopina označevalca citotoksičnosti (glej odstavek 18). Ravni izražanja CD86 in CD54 ter viabilnost celic se analizirajo s pretočno citometrijo.

## PODATKI IN POROČANJE

### Ocenjevanje podatkov

25. Izražanje CD86 in CD54 se analizira s pretočno citometrijo z merilnim kanalom FL-1. Na podlagi geometrijske srednje vrednosti intenzitete fluorescence (MFI) se relativna intenziteta fluorescence (RFI) CD86 in CD54 za celice pozitivne kontrole in celice, tretirane s kemikalijo, izračuna v skladu z naslednjo enačbo:

$$RFI = \frac{MFI \text{ of chemical-treated cell} - MFI \text{ of chemical-treated isotype control cells}}{MFI \text{ of solvent/vehicle-treated ctrl cells} - MFI \text{ of solvent/vehicle-treated isotype ctrl cells}} \times 100$$

Tudi viabilnost celic iz izotipske kontrole (ki so obarvane z mišjimi protitelesi (izotipa) IgG1) se izračuna v skladu z enačbo, opisano v odstavku 19.

### Napovedni model

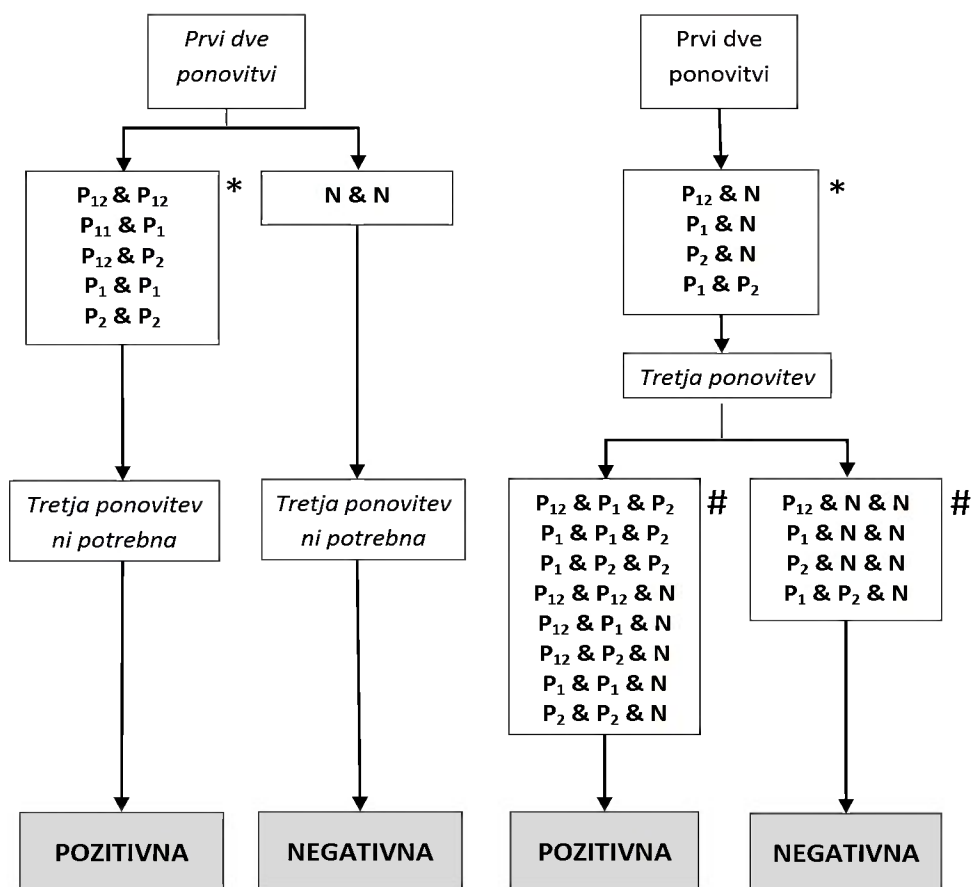
26. Za meritev izražanja *CD86/CD54* se vsaka preskusna kemikalija preskusi v najmanj dveh neodvisnih ponovitvah, iz katerih se izpelje ena sama napoved (POZITIVNA ali NEGATIVNA). Napoved h-CLAT se obravnava kot POZITIVNA, če je izpolnjen vsaj

eden od naslednjih pogojev v dveh od dveh ali v vsaj dveh od treh neodvisnih ponovitev, v nasprotnem primeru se napoved h-CLAT obravnava kot NEGATIVNA (slika 1):

- RFI CD86 je enaka ali večja od 150 % pri kateri koli preskušeni koncentraciji (z viabilnostjo celic  $\geq 50$  %);
- RFI CD54 je enaka ali večja od 200 % pri kateri koli preskušeni koncentraciji (z viabilnostjo celic  $\geq 50$  %).

27. Če sta obe prvi ponovitvi za CD86 in/ali CD54 pozitivni, se glede na navedeno napoved h-CLAT obravnava kot POZITIVNA in tretje ponovitve ni treba izvesti. Prav tako velja, da se napoved h-CLAT obravnava kot NEGATIVNA (ob ustreznem upoštevanju določb odstavka 30), ne da bi bilo treba izvesti tretjo ponovitev, če sta prvi ponovitvi negativni za oba označevalca. Če pa prvi ponovitvi nista skladni pri vsaj enem označevalcu (CD54 ali CD86), je potrebna tretja ponovitev, pri čemer končna napoved temelji na večinskem rezultatu treh posameznih ponovitev (tj. dveh od treh). V zvezi s tem je treba navesti, da je tretja ponovitev potrebna, če se izvedeta dve neodvisni ponovitvi in je ena pozitivna samo za CD86 (v nadaljnjem besedilu:  $P_1$ ), druga pa samo za CD54 (v nadaljnjem besedilu:  $P_2$ ). Če je ta tretja ponovitev negativna za oba označevalca (v nadaljnjem besedilu: N), se napoved h-CLAT obravnava kot NEGATIVNA. Če pa je ta tretja ponovitev pozitivna za kateri koli označevalec ( $P_1$  ali  $P_2$ ) ali za oba označevalca (v nadaljnjem besedilu:  $P_{12}$ ), se napoved h-CLAT obravnava kot POZITIVNA.

**Slika 1:** Napovedni model, uporabljen pri metodi h-CLAT Napoved h-CLAT je treba obravnavati v okviru IATA ter v skladu z določbami odstavkov 7 in 8 iz Splošnega uvoda.



P1: ponovitev, pozitivna samo za CD86; P2: ponovitev, pozitivna samo za CD54; P12: ponovitev, pozitivna za CD86 in CD54; N: ponovitev, ki ni pozitivna niti za CD86 niti za CD54.

\*V okencih so prikazane ustrezne kombinacije rezultatov iz prvih dveh ponovitev, neodvisno od vrstnega reda, v katerem so pridobljeni.

#V okencih so prikazane ustrezne kombinacije rezultatov iz treh ponovitev na podlagi rezultatov, pridobljenih v prvih dveh ponovitvah, prikazanih v zgornjem okencu, vendar ne izražajo vrstnega reda, v katerem so pridobljeni.

28. Za preskusne kemikalije, ki so z metodo h-CLAT napovedane kot POZITIVNE, se lahko neobvezno določita vrednosti učinkovitih koncentracij (EC), in sicer EC150 za CD86 in EC200 za CD54, tj. koncentracije, pri kateri so preskusne kemikalije povzročile RFI 150 ali 200. Ti vrednosti EC lahko potencialno prispevata k oceni stopnje povzročanja preobčutljivosti kože (9), kadar se uporabita v celostnih pristopih, kot je IATA (4) (5) (6) (7) (8). Izračunata se lahko z naslednjima enačbama:

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

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

pri čemer je:

$A_{conc}$  najnižja koncentracija v  $\mu\text{g/ml}$  z  $\text{RFI} > 150$  (CD86) ali 200 (CD54),

$B_{conc}$  najvišja koncentracija v  $\mu\text{g/ml}$  z  $\text{RFI} < 150$  (CD86) ali 200 (CD54),

$A_{RFI}$  RFI pri najnižji koncentraciji z  $\text{RFI} > 150$  (CD86) ali 200 (CD54),

$B_{RFI}$  RFI pri najvišji koncentraciji z  $\text{RFI} < 150$  (CD86) ali 200 (CD54).

Za natančnejšo izpeljavo vrednosti EC150 in EC200 bodo morda potrebne tri neodvisne ponovitve za *meritev izražanja CD86/CD54*. Končni vrednosti EC150 in EC200 se nato določita kot mediana vrednosti EC, izračunanih iz treh neodvisnih ponovitev. Kadar samo dve od treh neodvisnih ponovitev izpolnjujeta merila za pozitivnost (glej odstavka 26 in 27), se sprejme višja vrednost EC150 ali EC200 od dveh izračunanih vrednosti.

### Merila za sprejemljivost

29. Pri uporabi metode h-CLAT morajo biti izpolnjena naslednja merila za sprejemljivost (22) (27).

- Viabilnost celic v gojišču in kontrolah s topilom/vehiklom mora biti več kot 90-odstotna.
- Pri kontroli s topilom/vehiklom vrednosti RFI za CD86 in CD54 ne bi smele presegati pozitivnih meril ( $\text{RFI CD86} \geq 150 \%$  in  $\text{RFI CD54} \geq 200 \%$ ). Vrednosti RFI kontrole s topilom/vehiklom se izračunajo s formulo, opisano v odstavku 25 (‘MFI kemikalije’ se nadomesti z ‘MFI topila/vehikla’, ‘MFI topila/vehikla’ pa se nadomesti z ‘MFI kontrole (z gojiščem)’).
- Tako pri kontroli z gojiščem kot pri kontroli s topilom/vehiklom mora biti razmerje MFI CD86 in CD54 v primerjavi z izotipsko kontrolo  $> 105 \%$ .
- Pri pozitivni kontroli (DN CB) morajo vrednosti RFI tako CD86 kot tudi CD54 izpolnjevati pozitivna merila ( $\text{RFI CD86} \geq 150$  in  $\text{RFI CD54} \geq 200$ ), viabilnost celic pa mora biti več kot 50-odstotna.
- Pri preskusni kemikaliji mora biti viabilnost celic več kot 50-odstotna pri vsaj štirih preskušanih koncentracijah v vsaki ponovitvi.

30. Negativni rezultati so sprejemljivi samo za preskusne kemikalije, pri katerih je viabilnost celic manj kot 90-odstotna pri najvišji preskušeni koncentraciji (tj.  $1,2 \times \text{CV75}$  v skladu z načrtom zaporednega redčenja, opisanim v odstavku 20). Če je viabilnost celic pri  $1,2 \times \text{CV75}$  enaka ali večja od 90 %, je treba negativni rezultat zavreči. V takem primeru je priporočljivo, da se poskuša izbira odmerka izpopolniti s ponovitvijo določitve CV75.

Opozoriti je treba, da je negativen rezultat sprejemljiv, tudi če je viabilnost celic več kot 90-odstotna, kadar se kot največja preskusna koncentracija preskusne kemikalije uporabi 5 000 µg/ml v fiziološki raztopini (ali gojišču ali drugih topilih/vehiklih), 1 000 µg/ml v DMSO ali najvišja topna koncentracija.

## Poročilo o preskusu

31. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

### *Preskusna kemikalija*

Snov iz ene sestavine:

- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;
- fizični videz, vrednost Log Kow, topnost v vodi, topnost v DMSO, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo;
- čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
- preskušene koncentracije;
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;
- utemeljitev izbire topila/vehikla za vsako preskusno kemikalijo.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

- čim obsežnejša opredelitev lastnosti, na primer s kemijsko identiteto (glej zgoraj), čistostjo, kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi (glej zgoraj) sestavin, če so na voljo;
- fizični videz, topnost v vodi, topnost v DMSO in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo;
- molekulska masa ali navidezna molekulska masa v primeru zmesi/polimerov z znano sestavo ali drugi podatki, pomembni za izvedbo študije;
- obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
- preskušene koncentracije;
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;
- utemeljitev izbire topila/vehikla za vsako preskusno kemikalijo.

### *Kontrole*



Pozitivna kontrola:

- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;
- fizični videz, vrednost Log Kow, topnost v vodi, topnost v DMSO, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo in če je ustrezno;
- čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
- preskušene koncentracije;
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;
- sklicevanje na rezultate pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov, ki kažejo ustrezna merila za sprejemljivost ponovitev, če je to ustrezno.

Negativna kontrola in kontrola s topilom/vehiklom:

- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;
- čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- fizični videz, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če se uporabijo druga kontrolna topila/vehikli razen tistih, ki so navedeni v smernici za preskušanje, in če so na voljo;
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;
- utemeljitev izbire topila/vehikla za vsako preskusno kemikalijo.

*Preskusni pogoji:*

- ime in naslov naročnika, preskuševalnega laboratorija in vodje študije;
- opis uporabljenega preskusa;
- uporabljena celična linija, pogoji njenega hranjenja in vir (npr. laboratorij, ki jo je zagotovil);
- uporabljena pretočna citometrija (npr. model), vključno z nastavitvami instrumenta, globulinom, protitelesi in uporabljenim označevalcem citotoksičnosti;
- postopek, uporabljen za dokazovanje usposobljenosti laboratorija v zvezi z izvedbo preskusa s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti, in postopek, uporabljen za prikaz ponovljivosti izvedbe preskusa v daljšem časovnem obdobju, npr. podatki o kontrolah iz preteklih preskusov in/ali podatki iz preteklih preverjanj reaktivnosti.

*Merila za sprejemljivost preskusa:*

- viabilnost celic, vrednosti MFI in RFI, pridobljene s kontrolo s topilom/vehiklom, v primerjavi z območji sprejemljivosti;
- viabilnost celic in vrednosti RFI, pridobljene s pozitivno kontrolo, v primerjavi z območji sprejemljivosti;
- viabilnost celic vseh preskušanih koncentracij preskušene kemikalije.

*Preskusni postopek:*

- uporabljeno število ponovitev;
- uporabljene koncentracije preskusnih kemikalij, nanašanje in čas izpostavljenosti (če je drugačen od priporočenega);
- trajanje izpostavljenosti (če je drugačno od priporočenega);
- opis uporabljenih meril za ocenjevanje in odločitev;
- opis vseh prilagoditev preskusnega postopka.

*Rezultati:*

- preglednice s podatki, ki vključujejo vrednost CV75 (če je ustrezno), posamezne geometrijske vrednosti MFI, RFI, vrednosti viabilnosti celic in vrednosti EC150/EC200 (če je ustrezno), pridobljene za preskusno kemikalijo in pozitivno kontrolo v vsaki ponovitvi, ter indikacija ocene preskusne kemikalije glede na napovedni model;
- opis kakršnih koli drugih pomembnih opažanj, če je ustrezno.

*Razprava o rezultatih:*

- razprava o rezultatih, pridobljenih z metodo h-CLAT;
- obravnavanje rezultatov v okviru IATA, če so na voljo druge pomembne informacije.

*Sklepne ugotovitve*

## VIRI

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

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

- (9) Jaworska, J. S., Natsch, A., Ryan, C., Strickland, J., Ashikaga, T., Miyazawa, M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: A decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch Toxicol*. 89, 2355–2383.
- (10) Strickland, J., Zang, Q., Kleinstreuer, N., Paris, M., Lehmann, D. M., Choksi, N., Matheson, J., Jacobs, A., Lowit, A., Allen, D., Casey, W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol*. DOI 10.1002/jat.3281.
- (11) Nukada, Y., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Hirota, M., Sakaguchi, H., Sasa, H., Nishiyama, N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro* 26, 1150–60.
- (12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Na voljo na: <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. Na voljo na: <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 (6<sup>th</sup> 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), 23 str. Na voljo na: <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 (7<sup>th</sup> 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. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz, Francija, 2005, 96 str.
- (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 (št. 168). Na voljo na: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=E NV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=E NV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- (23) Združeni narodi (ZN) (2013). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS). Peta revidirana izdaja. New York in Ženeva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Na voljo na: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev05/05files\\_e.html](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.

## Dodatek 1.1

### OPREDELITVE POJMOV

**Točnost:** Stopnja ujemanja rezultatov preskusa s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusa in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz skladnost se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravih rezultatov preskusa (21).

**Potek neželenega izida (Adverse Outcome Pathway – AOP):** zaporedje dogodkov od kemijske strukture ciljne kemikalije ali skupine podobnih kemikalij prek začetnega dogodka na molekularni ravni do preiskovanega rezultata *in vivo* (22).

**Kemikalija:** snov ali zmes.

**CV75:** ocenjena koncentracija, pri kateri je viabilnost celic 75-odstotna.

**EC150:** koncentracije, pri katerih so vrednosti RFI pri izražanju CD86 150.

**EC200:** koncentracije, pri katerih so vrednosti RFI pri izražanju CD54 200.

**Pretočna citometrija:** citometrična tehnika, pri kateri celice, suspendirane v tekočini, vsaka posebej potuje skozi ozek snop laserske svetlobe, ki se razprši v vzorcih, značilnih za celice in njihove komponente; celice se pogosto označijo s fluorescentnimi označevalci, tako da se svetloba najprej absorbira in nato oddaja pri spremenjenih frekvencah.

**Nevarnost:** neločljiva lastnost sredstva ali stanje, ki lahko ob izpostavljenosti temu sredstvu povzroči neželen učinek na organizem, sistem ali (pod)populacijo.

**IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment = celostni pristop k testiranju in ocenjevanju):** strukturiran pristop, ki se uporablja za ugotavljanje nevarnosti (potencial), opredeljevanje nevarnosti (moč) in/ali oceno varnosti (potencial/moč in izpostavljenost) kemikalije ali skupine kemikalij ter strateško zajame in oceni vse pomembne podatke, da se lahko sprejme regulativna odločitev v zvezi z morebitno nevarnostjo in/ali tveganjem in/ali potrebo po nadaljnjem, ciljno usmerjenem in s tem minimalnem preskušanju.

**Kontrola z gojiščem:** netretiran ponovljen vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema. Ta vzorec se obdela z vzorci, tretiranimi s preskusno kemikalijo, in drugimi kontrolnimi vzorci, da se ugotovi, ali topilo/vehikel reagira s preskusnim sistemom.

**Zmes:** zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi.

**Snov iz ene sestavine:** snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je vsaj 80 mas. % glavne sestavine.

**Snov z več sestavinami:** snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je

več glavnih sestavin s koncentracijo  $\geq 10$  mas. % in  $< 80$  mas. %. Snov z več sestavinami je rezultat proizvodnega postopka. Razlika med zmesjo in snovjo z več sestavinami je v tem, da je zmes pridobljena z mešanjem dveh ali več snovi brez kemične reakcije. Snov z več sestavinami je rezultat kemične reakcije.

**Pozitivna kontrola:** ponovljen vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s snovjo, za katero je znano, da povzroči pozitiven odziv. Za zagotovitev, da se lahko variabilnost odziva pozitivne kontrole oceni v daljšem časovnem obdobju, pa stopnja pozitivnega odziva ne bi smela biti previsoka.

**Prehapteni:** kemikalije, ki postanejo povzročitelji preobčutljivosti kože z abiotsko pretvorbo.

**Prohapteni:** kemikalije, ki potrebujejo encimsko aktivacijo za uresničitev potenciala za povzročanje preobčutljivosti kože.

**Relativna intenziteta fluorescence (RFI):** relativne vrednosti geometrijske sredine intenzitete fluorescence (MFI) pri celicah, tretiranih s kemikalijo, v primerjavi z MFI pri celicah, tretiranih s topilom/vehiklom.

**Ustreznost:** opis razmerja med preskusom in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere preskus pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Pri ustreznosti se upošteva tudi točnost (skladnost) preskusa (21).

**Zanesljivost:** stopnja obnovljivosti preskusa v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih in interne laboratorijske ponovljivosti (21).

**Ponovitev:** ponovitev zajema eno ali več preskusnih kemikalij, preskušanih sočasno s kontrolo s topilom/vehiklom in pozitivno kontrolo.

**Občutljivost:** delež vseh pozitivnih/aktivnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskus, s katerim se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusa (21).

**Pufer za barvanje:** fosfatni pufer s soljo, ki vsebuje 0,1 % govejega serumskega albumina.

**Kontrola s topilom/vehiklom:** netretiran vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema razen preskusne kemikalije, vključuje pa topilo/vehikel, ki se uporabi. Uporablja se za določanje izhodiščnega odziva za vzorce, tretirane s preskusno kemikalijo, raztopljeno ali stabilno dispergirano v istem topilu/vehiklu. Pri preskušanju s sočasno kontrolo z gojiščem ta vzorec tudi pokaže, ali topilo/vehikel reagira s preskusnim sistemom.

**Specifičnost:** delež vseh negativnih/neaktivnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskus, s katerim se pridobijo kategorični rezultati, in



pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusa (21).

**Snov:** kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo.

**Preskusna kemikalija:** vsaka snov ali zmes, preskušena z uporabo te metode.

**Globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN):** sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudje (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (23).

**UVCB:** snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

**Veljaven preskus:** preskus, ki se obravnava kot dovolj ustrezen in zanesljiv za določen namen ter temelji na znanstveno utemeljenih načelih. Preskus ni nikoli veljaven v absolutnem smislu, ampak samo v zvezi z opredeljenim namenom (21).

**Dodatek 1.2****SNOVI ZA PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI**

Pred redno uporabo preskusa, opisanega v tem dodatku k preskusni metodi B.71, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost tako, da pravilno pridobijo napovedi h-CLAT, pričakovane za 10 snovi, ki so priporočene v preglednici 1, ter vrednosti CV75, EC150 in EC200, ki so za vsaj 8 od 10 snovi za preverjanje usposobljenosti v ustreznem referenčnem območju. Snovi za preverjanje usposobljenosti so bile izbrane, ker predstavljajo celoten razpon odzivov pri nevarnostih v zvezi s povzročanjem preobčutljivosti kože. Druga merila za izbiro so bila razpoložljivost snovi na trgu, razpoložljivost visokokakovostnih referenčnih podatkov *in vivo* in razpoložljivost visokokakovostnih podatkov *in vitro*, pridobljenih z metodo h-CLAT. Za metodo h-CLAT so na voljo tudi objavljeni referenčni podatki (3) (14).

**Preglednica 1:** Priporočene snovi za dokazovanje tehnične usposobljenosti za metodo h-CLAT

| Snovi za preverjanje usposobljenosti | Št. CAS    | Agregatno stanje | Napoved <i>in vivo</i> <sup>1</sup>           | CV75 Referenčno območje v µg/ml <sup>2</sup> | Rezultati h-CLAT za CD86 (referenčno območje EC150 v µg/ml <sup>2</sup> ) | Rezultati h-CLAT za CD54 (referenčno območje EC200 v µg/ml <sup>2</sup> ) |
|--------------------------------------|------------|------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| 2,4-dinitroklorobenzen               | 97-00-7    | trdna snov       | povzročitelj preobčutljivosti (izjemno močen) | 2–12                                         | pozitivna (0,5–10)                                                        | pozitivna (0,5–15)                                                        |
| 4-fenilendiamin                      | 106-50-3   | trdna snov       | povzročitelj preobčutljivosti (močen)         | 5–95                                         | pozitivna (< 40)                                                          | negativna (> 1,5) <sup>3</sup>                                            |
| nikljev sulfat                       | 10101-97-0 | trdna snov       | povzročitelj preobčutljivosti (zmeren)        | 30–500                                       | pozitivna (< 100)                                                         | pozitivna (10–100)                                                        |
| 2-merkaptobenzotiazol                | 149-30-4   | trdna snov       | povzročitelj preobčutljivosti (zmeren)        | 30–400                                       | negativna (> 10) <sup>3</sup>                                             | pozitivna (10–140)                                                        |
| R(+)-limonen                         | 5989-27-5  | tekočina         | povzročitelj preobčutljivosti (šibek)         | > 20                                         | negativna (> 5) <sup>3</sup>                                              | pozitivna (< 250)                                                         |
| imidazolidinil urea                  | 39236-46-9 | trdna snov       | povzročitelj preobčutljivosti (šibek)         | 25–100                                       | pozitivna (20–90)                                                         | pozitivna (20–75)                                                         |
| izopropanol                          | 67-63-0    | tekočina         | ne povzroča preobčutljivosti                  | > 5 000                                      | negativna (> 5 000)                                                       | negativna (> 5 000)                                                       |
| glicerol                             | 56-81-5    | tekočina         | ne povzroča preobčutljivosti                  | > 5 000                                      | negativna (> 5 000)                                                       | negativna (> 5 000)                                                       |
| mlečna kislina                       | 50-21-5    | tekočina         | ne povzroča preobčutljivosti                  | 1 500–5 000                                  | negativna (> 5 000)                                                       | negativna (> 5 000)                                                       |
| 4-aminobenzojska kislina             | 150-13-0   | trdna snov       | ne povzroča preobčutljivosti                  | > 1 000                                      | negativna (> 1 000)                                                       | negativna (> 1 000)                                                       |

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS).

<sup>1</sup> Napoved nevarnosti (in moči) *in vivo* temelji na podatkih za preskus LLNA (3) (14). Moč *in vivo* se izpelje s pomočjo meril, ki jih je predlagal ECETOC (24).

<sup>2</sup> Na podlagi ugotovljenih vrednosti iz preteklih preskusov (13) (25).

<sup>3</sup> V preteklosti so bili za ta označevalec pridobljeni večinoma negativni rezultati, zato se največkrat pričakuje negativen rezultat. Navedeno območje je bilo opredeljeno na podlagi nekaj ugotovljenih pozitivnih rezultatov v preteklosti. Če je pridobljen pozitiven rezultat, mora biti vrednost EC v navedenem referenčnem območju.

## Dodatek 2

### **PREOBČUTLJIVOST KOŽE *IN VITRO*: PRESKUS AKTIVACIJE CELIČNE LINIJE U937 (U-SENS™)**

#### **ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE**

1. S preskusom U-SENS™ se kvantificirajo spremembe v izražanju celičnega površinskega označevalca, povezanega s procesom aktivacije monocitov in dendritskih celic (DC) (tj. CD86), v celični liniji U937 humanega histiocitnega limfoma po izpostavljenosti povzročiteljem preobčutljivosti (1). Izmerjene ravni izražanja celičnega površinskega označevalca CD86 v celični liniji U937 se nato uporabijo za podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože.
2. Preskus U-SENS™ je bil ocenjen v validacijski študiji (2) pod vodstvom družbe L'Oreal in nato z neodvisnim medsebojnim strokovnim pregledom, ki ga je izvedel Znanstveni svetovni odbor (ESAC) Referenčnega laboratorija Evropske unije za alternative testiranju na živalih (EURL ECVAM) (3). Ob upoštevanju vseh razpoložljivih dokazov ter prispevkov regulatorjev in deležnikov je EURL ECVAM (4) preskus U-SENS™ priporočil za uporabo v okviru IATA za podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, zaradi razvrstitve glede na nevarnost in označevanje. OECD v smernicah za poročanje o strukturiranih pristopih k povezovanju podatkov in posameznih virov informacij, ki se uporabljajo v okviru IATA za preobčutljivost kože, obravnava številne študije primerov, ki opisujejo različne strategije preskušanja in napovedne modele. Eden od različnih opredeljenih pristopov temelji na preskusu U-SENS (5). Primeri uporabe podatkov preskusa U-SENS™ v povezavi z drugimi informacijami, vključno s preteklimi podatki in obstoječimi veljavnimi podatki za ljudi (6), so navedeni tudi drugje v virih (4) (5) (7).
3. Izkazalo se je, da se lahko preskus U-SENS™ prenese v laboratorije, ki imajo izkušnje s tehnikami gojenja celičnih kultur in analizo s pretočno citometrijo. Stopnja ponovljivosti napovedi, ki jo je mogoče pričakovati pri preskusu, je v enem in več laboratorijih 90- oziroma 84-odstotna (8). Rezultati, pridobljeni z validacijsko študijo (8) in drugimi objavljenimi študijami (1), na splošno kažejo, da je v primerjavi z rezultati LLNA točnost pri razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože (tj. kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP) in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti, 86-odstotna (N = 166), pri čemer je občutljivost 91-odstotna (118/129) in specifičnost 65-odstotna (24/37). V primerjavi z rezultati za ljudi je točnost pri razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože (tj. kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP) in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti, 77-odstotna (N = 101), pri čemer je občutljivost 100-odstotna (58/58) in

specifičnost 47-odstotna (20/43). Lažno negativne napovedi pri preskusu U-SENS™ v primerjavi z LLNA se bodo bolj verjetno nanašale na kemikalije z nizko do zmerno stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (tj. podkategorija 1B po GHS ZN/uredbi CLP) kot na kemikalije z visoko stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (tj. podkategorija 1A po GHS ZN/uredbi CLP) (1) (8) (9). Vse te informacije skupaj kažejo, da preskus U-SENS™ uporabno prispeva k opredelitvi nevarnosti za povzročanje preobčutljivosti kože. Vendar so tukaj navedene vrednosti točnosti za preskus U-SENS™ kot samostojni preskus zgolj okvirne, saj ga je treba obravnavati skupaj z drugimi viri informacij v okviru IATA ter v skladu z določbami odstavkov 7 in 8 iz Splošnega uvoda. Poleg tega je treba pri ocenjevanju metod za preobčutljivost kože, ki se ne izvajajo na živalih, upoštevati, da preskus LLNA in druga testiranja na živalih ne odražajo v celoti razmer pri človeku.

4. Na podlagi trenutno razpoložljivih podatkov se je pokazalo, da se preskus U-SENS™ lahko uporablja za preskusne kemikalije (vključno s kozmetičnimi sestavinami, kot so konzervansi, površinsko aktivne snovi, aktivne snovi, barve), ki zajemajo različne organske funkcionalne skupine, fizikalno-kemijske lastnosti, stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (kot je določena v študijah *in vivo*) in spekter mehanizmov reakcije, za katere je znano, da so povezani s preobčutljivostjo kože (tj. Michaelov akceptor, nastanek Schiffove baze, sredstvo prenosa acilne skupine, bimolekularna nukleofilna substitucija [SN2] ali nukleofilna aromatska substitucija [SNAr]) (1) (8) (9) (10). Preskus U-SENS™ se uporablja za preskusne kemikalije, ki so topne ali tvorijo stabilno disperzijo (tj. koloid ali suspenzija, v kateri se preskusna kemikalija ne usede ali loči od topila/vehikla v različne faze) v ustreznem topilu/vehiklu (glej odstavek 13). Kemikalije v podatkovnem nizu, za katere je bilo navedeno, da so prehapteni (tj. snovi, ki se aktivirajo z oksidacijo) ali prohapteni (tj. snovi, ki potrebujejo encimsko aktivacijo, na primer z encimi P450), so bile s preskusom U-SENS™ pravilno napovedane (1) (10). Snovi, ki povzročajo motnje membrane, lahko privedejo do lažno pozitivnih rezultatov zaradi nespecifičnega povečanja izražanja CD86, saj so bili trije od sedmih lažno pozitivnih rezultatov v zvezi z referenčno klasifikacijo *in vivo* pri površinsko aktivnih snoveh (1). Kot take je treba pozitivne rezultate pri površinsko aktivnih snoveh obravnavati previdno, medtem ko je negativne rezultate pri površinsko aktivnih snoveh še vedno mogoče uporabiti za podporo opredelitvi preskusne kemikalije kot snovi, ki ne povzroča preobčutljivosti kože. Fluorescentne preskusne kemikalije se lahko ocenjujejo s preskusom U-SENS™ (1), vendar bodo močne fluorescentne preskusne kemikalije, ki svetlobo oddajajo na isti valovni dolžini kot fluorescein izotiocianat (FITC) ali propidijev jodid (PI), vplivale na zaznavanje s pretočno citometrijo, zato jih ni mogoče pravilno oceniti z uporabo protiteles, konjugiranih s FITC (morebitni lažno negativen rezultat), ali PI (viabilnost ni merljiva). V takem primeru se lahko uporabijo druga s fluorokromom označena protitelesa oziroma drugi označevalci citotoksičnosti, če je mogoče dokazati, da zagotavljajo podobne rezultate, kot s FITC označena protitelesa ali PI (glej odstavek 18),

npr. s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 2.2. Glede na navedeno je treba pozitivne rezultate pri površinsko aktivnih snoveh in negativne rezultate pri močnih fluorescentnih preskusnih kemikalijah razlagati v okviru navedenih omejitev in skupaj z drugimi viri informacij v okviru IATA. Kadar obstajajo dokazi, da preskusa U-SENS™ ni mogoče uporabiti za druge specifične kategorije preskusnih kemikalij, se ta preskus zanje ne bi smel uporabiti.

5. Kot je navedeno zgoraj, preskus U-SENS™ podpira razlikovanje med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože. Kadar se uporablja v celostnih pristopih, kot je IATA, pa lahko prispeva tudi k oceni stopnje povzročanja preobčutljivosti kože. Vendar je potrebno nadaljnje delo, ki po možnosti temelji na podatkih za ljudi, da se določi, kako bi lahko rezultati preskusa U-SENS™ prispevali k oceni stopnje povzročanja preobčutljivosti.
6. Opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 2.1.

## NAČELO PRESKUSA

7. Preskus U-SENS™ je preskus *in vitro*, s katerim se kvantificirajo spremembe v izražanju celičnega površinskega označevalca CD86 na celični liniji humanega histiocitnega limfoma, tj. celicah U937, po  $45 \pm 3$ -urni izpostavljenosti preskusni kemikaliji. Površinski označevalec CD86 je tipični označevalec aktivacije celic U937. Za CD86 je znano, da je kostimulatorna molekula, ki lahko posnema aktivacijo monocitov, ta pa ima ključno vlogo pri označevanju celic T. Spremembe v izražanju celičnega površinskega označevalca CD86 se merijo s pretočno citometrijo po obarvanju celic, običajno s protitelesi, označenimi s fluorescein izotiocianatom (FITC). Sočasno se tudi izmeri citotoksičnost (npr. z uporabo PI), da se oceni, ali se pri subcitotoksičnih koncentracijah pojavi povečano izražanje celičnega površinskega označevalca CD86. Izračuna se stimulacijski indeks (SI) celičnega površinskega označevalca CD86 v primerjavi s kontrolo s topilom/vehiklom in uporabi v napovednem modelu (glej odstavek 19), da se podpre razlikovanje med povzročitelji preobčutljivosti in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti.

## DOKAZOVANJE USPOSOBLJENOSTI

8. Pred redno uporabo preskusa, opisanega v tem dodatku k preskusni metodi B.71, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost, tako da v skladu z dobrimi praksami metode *in vitro* (11) uporabijo 10 snovi za preverjanje usposobljenosti, navedenih v Dodatku 2.2. Poleg tega morajo uporabniki preskusov vzdrževati zbirko preteklih podatkov, pridobljenih s preverjanji reaktivnosti (glej odstavek 11) ter pozitivnimi kontrolami in kontrolami s

topilom/vehiklom (glej odstavka 15 in 16), ter te podatke uporabiti za potrditev, da se v njihovem laboratoriju vzdržuje obnovljivost preskusa skozi čas.

## POSTOPEK

9. Ta preskus temelji na protokolu št. 183 storitve za podatkovne zbirke o alternativnih metodah namesto testiranja na živalih (DataBase service on Alternative Methods to animal experimentation (DB-ALM)) za preskus U-SENS™ (12). Pri izvajanju in uporabi preskusa U-SENS™ v laboratoriju je treba uporabljati standardne delovne postopke. Uporabi se lahko avtomatiziran sistem za izvajanje preskusa U-SENS™, če je mogoče dokazati, da zagotavlja podobne rezultate, na primer s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 2.2. V nadaljevanju so opisani glavni elementi in postopki za preskus U-SENS™.

## Priprava celic

10. Za izvedbo preskusa U-SENS™ je treba uporabiti celično linijo humanega histiocitnega limfoma, U937 (13). Celice (klon CRL1593.2) je treba pridobiti iz celične banke z dobrimi kvalifikacijami, kot je American Type Culture Collection.
11. Celice U937 se gojijo pri 37 °C v navlaženi atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub> v gojišču RPMI-1640, dopolnjenem z 10 % telečjega fetalnega seruma (FCS), 2 mM L-glutamina, 100 enotami/ml penicilina in 100 µg/ml streptomicina (kompletno gojišče). Celice U937 se rutinsko pasažirajo na 2 do 3 dni z gostoto od 1,5 oziroma  $3 \times 10^5$  celic/ml. Gostota celic ne bi smela presegati  $2 \times 10^6$  celic/ml, viabilnost celic, izmerjena z izključitvenim testom z barvilom tripan modro, pa mora biti  $\geq 90$  % (ne sme se uporabiti pri prvi pasaži po odtajanju). Preden se celice uporabijo za preskušanje, je treba vsako serijo celic, FCS ali protiteles kvalificirati s preverjanjem reaktivnosti. Reaktivnost celic je treba preveriti z uporabo pozitivne kontrole, tj. pikrilsulfonske kisline (2,4,6-trinitro-benzen-sulfonska kislina: TNBS) (št. CAS 2508-19-2,  $z \geq 99$ -odstotno čistostjo), in negativne kontrole, tj. mlečne kisline (LA) (št. CAS 50-21-5,  $z \geq 85$ -odstotno čistostjo), najmanj en teden po odtajanju. Za preverjanje reaktivnosti je treba za vsako od dveh kontrol preskusiti šest končnih koncentracij (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 µg/ml in LA: 1, 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml). TNBS, raztopljena v kompletnem gojišču, bi morala povzročiti pozitiven in s koncentracijo povezan odziv CD86 (npr. kadar pozitivni koncentraciji, SI CD86  $\geq 150$ , sledi koncentracija z naraščajočim SI CD86), LA, raztopljena v kompletnem gojišču, pa bi morala povzročiti negativen odziv CD86 (glej odstavek 21). Za poskus se lahko uporabi samo serija celic, ki so dvakrat uspešno prestale preverjanje reaktivnosti. Celice se lahko namnožujejo do sedem tednov po odtajanju. Število pasaž ne sme presegati 21. Preverjanje reaktivnosti je treba izvesti v skladu s postopki, opisanimi v odstavkih od 18 do 22.

12. Za preskušanje se celice U937 nasadijo z gostoto bodisi  $3 \times 10^5$  celic/ml bodisi  $6 \times 10^5$  celic/ml in predhodno gojijo v stekleničkah za gojenje celičnih kultur dva dni oziroma en dan. Poleg zgoraj opisanih pogojev predhodnega gojenja se lahko uporabijo tudi drugi, če je zagotovljena zadostna znanstvena utemeljitev in je mogoče dokazati, da dajejo podobne rezultate, na primer s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 2.2. Na dan preskusa se celice, odvzete iz stekleničke za gojenje celičnih kultur, znova suspendirajo v svežem gojišču z gostoto  $5 \times 10^5$  celic/ml. Nato se celice nanesejo na 96-jamično ploščo z ravnim dnom po 100  $\mu$ l (končna gostota celic je  $0,5 \times 10^5$  celic/jamico).

### **Priprava preskusnih kemikalij in kontrolnih snovi**

13. Pred preskusom se opravi ocena topnosti. V ta namen se preskusne kemikalije raztopijo ali stabilno dispergirajo pri koncentraciji 50 mg/ml v kompletnem gojišču kot prvi možnosti topila ali dimetil sulfoksidu (DMSO,  $\geq 99$ -odstotno čistostjo) kot drugi možnosti topila/vehikla, če preskusna kemikalija ni topna v topilu/vehiklu kompletnega gojišča. Za preskus se preskusna kemikalija raztopi do končne koncentracije 0,4 mg/ml v kompletnem gojišču, če je kemikalija topna v tem topilu/vehiklu. Če je kemikalija topna samo v DMSO, se raztopi pri koncentraciji 50 mg/ml. Poleg zgoraj opisanih topil/vehiklov se lahko uporabijo tudi drugi, če je zagotovljena zadostna znanstvena utemeljitev. Upoštevati je treba stabilnost preskusne kemikalije v končnem topilu/vehiklu.
14. Preskusne kemikalije in kontrolne snovi se pripravijo na dan preskusa. Ker se poskus za ugotavljanje odmerka ne izvede, je treba za prvo ponovitev preskusiti šest končnih koncentracij (1, 10, 20, 50, 100 in 200  $\mu$ g/ml) v ustreznem topilu/vehiklu bodisi v kompletnem gojišču bodisi v 0,4 % DMSO v gojišču. Za nadaljnje ponovitve se z raztopinami preskusne kemikalije, ki se začnejo pri 0,4 mg/ml v kompletnem gojišču ali 50 mg/ml v DMSO, z uporabo ustreznega topila/vehikla pripravijo vsaj štiri delovne raztopine (tj. vsaj štiri koncentracije). Delovne raztopine se nazadnje uporabijo za tretiranje, tako da se količini delovne raztopine na plošči doda enaka količina suspenzije celic U937 (glej odstavek 11 zgoraj), da se doseže nadaljnja dvakratna razredčitev (12). Koncentracije (najmanj štiri) za kakršno koli nadaljnjo ponovitev se izberejo na podlagi posameznih rezultatov vseh prejšnjih ponovitev (8). Uporabne končne koncentracije so 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 in 200  $\mu$ g/ml. Najvišja končna koncentracija je 200  $\mu$ g/ml. Če je pozitivna vrednost CD86 ugotovljena pri 1  $\mu$ g/ml, potem se oceni 0,1  $\mu$ g/ml, da se poišče koncentracija preskusne kemikalije, ki ne sproži CD86 nad pozitivnim pragom. Za vsako ponovitev se izračuna EC150 (koncentracija, pri kateri kemikalija doseže pozitivni prag CD86 v višini 150 %, glej odstavek 19), če je ugotovljen pozitiven odziv CD86, povezan s koncentracijo. Kadar preskusna kemikalija povzroči pozitiven odziv CD86, ki ni povezan s koncentracijo, izračun EC150 morda ne bo relevanten, kot je opisano v protokolu U-SENS<sup>TM</sup> DB-ALM



št. 183 (12). Kadar je to mogoče, se za vsako ponovitev izračuna CV70 (koncentracija, pri kateri kemikalija doseže 70-odstotni prag citotoksičnosti, glej odstavek 19) (12). Za preiskavo učinka odziva na koncentracijo za povečanje CD86 je treba vse koncentracije iz uporabnih koncentracij izbrati tako, da so enakomerno razporejene med EC150 (ali najvišjo necitotoksično koncentracijo, pri kateri je CD86 negativen) in CV70 (ali najvišjo dopustno koncentracijo, tj. 200 µg/ml). Za primerjavo je treba preskusiti najmanj štiri koncentracije na ponovitev, pri čemer morata biti vsaj dve koncentraciji enaki kot pri predhodnih ponovitvah.

15. Kontrola s topilom/vehiklom, uporabljena pri preskusu U-SENS™, je kompletno gojišče (za preskusne kemikalije, raztopljene ali stabilno dispergirane) (glej odstavek 4) ali 0,4 % DMSO v kompletnem gojišču (za preskusne kemikalije, raztopljene ali stabilno dispergirane v DMSO).
16. Pozitivna kontrola, uporabljena pri preskusu U-SENS™, je TNBS (glej odstavek 11), pripravljena v kompletnem gojišču. TNBS je treba kot pozitivno kontrolo za meritev izražanja CD86 uporabiti pri enotni končni koncentraciji na plošči (50 µg/ml), pri kateri je viabilnost celic več kot 70-odstotna. Za 50 µg/ml koncentracije TNBS na plošči se pripravi 1 M (tj. 293 mg/ml) osnovna raztopina TNBS v kompletnem gojišču in nadalje 2930-krat razredči s kompletnim gojiščem v 100 µg/ml delovno raztopino. Mlečno kislino (LA, CAS 50-21-5) je treba uporabiti kot negativno kontrolo pri 200 µg/ml, raztopljenih v kompletnem gojišču (iz 0,4 mg/ml osnovne raztopine). Na vsaki plošči vsake ponovitve se pripravijo trije ponovljeni vzorci netretirane kontrole s kompletnim gojiščem, kontrole s topilom/vehiklom ter negativne in pozitivne kontrole (12). Uporabijo se lahko tudi druge primerne pozitivne kontrole, če so na voljo podatki iz preteklih preskusov za izpeljavo primerljivih meril za sprejemljivost ponovitev. Merila za sprejemljivost ponovitev so enaka kot merila, opisana za preskusno kemikalijo (glej odstavek 12).

### **Nanos preskusnih kemikalij in kontrolnih snovi**

17. Kontrola s topilom/vehiklom ali delovne raztopine, opisane v odstavkih od 14 do 16, se zmešajo v razmerju 1 : 1 (v/v) s suspenzijami celic, pripravljenimi na 96-jamični plošči z ravnim dnom (glej odstavek 12). Obdelane plošče se nato inkubirajo  $45 \pm 3$  ure pri 37 °C v prisotnosti 5 % CO<sub>2</sub>. Pred inkubacijo se plošče zatesnijo s polprepustno membrano, da se preprečita izhlapevanje hlapnih preskusnih kemikalij in navzkrižna kontaminacija med celicami, tretiranimi s preskusnimi kemikalijami (12).

### **Barvanje celic**

18. Po  $45 \pm 3$ -urni izpostavljenosti se celice prenesejo na mikrotitrsko ploščo z jamicami v obliki črke V in zberejo s centrifugiranjem. Interferenca topnosti je opredeljena kot kristali ali kapljice, opažene pod mikroskopom  $45 \pm 3$  ure po tretiranju (pred barvanjem celic).

Supernatanti se zavržejo, preostale celice pa se enkrat sperejo s 100 µl ledeno mrzlega fosfatnega pufra s soljo (PBS), ki vsebuje 5 % telečjega fetalnega seruma (pufer za barvanje). Po centrifugiranju se celice znova suspendirajo s 100 µl pufra za barvanje in 30 minut barvajo s 5 µl (npr. 0,25 µg) s FITC označenih protiteles anti-CD86 ali mišjih protiteles (izotipa) IgG1 pri 4 °C, pri čemer so zaščitene pred svetlobo. Uporabiti je treba protitelesa, opisana v protokolu U-SENS™ DB-ALM št. 183 (12) (za CD86: BD-PharMingen #555657 klon: Fun-1, ali Caltag/Invitrogen # MHCD8601 klon: BU63; in za IgG1: BD-PharMingen #555748 ali Caltag/Invitrogen # GM4992). Na podlagi izkušenj razvijalcev preskusov je intenziteta fluorescence protiteles med različnimi serijami običajno konsistentna. Za poskus se lahko uporabijo tudi drugi kloni ali dobavitelji protiteles, ki so uspešno prestali preverjanje reaktivnosti (glej odstavek 11). Vendar lahko uporabniki razmislijo o titraciji protiteles v pogojih lastnega laboratorija, da se opredeli najboljša koncentracija za uporabo. Uporabijo se lahko tudi drugi sistemi zaznavanja, npr. s fluorokromom označena protitelesa anti-CD86, če je mogoče dokazati, da dajejo podobne rezultate kot s FITC konjugirana protitelesa, na primer s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 2.2. Po dvakratnem spiranju s 100 µl pufra za barvanje in enkratnem spiranju s 100 µl ledeno mrzlega PBS se celice znova suspendirajo v ledeno mrzlem PBS (npr. 125 µl za vzorce, ki se analizirajo ročno po posameznih epruvetah, ali 50 µl, če se uporablja avtomatski vzorčevalnik) in doda se raztopina PI (končna koncentracija 3 µg/ml). Uporabijo se lahko drugi označevalci citotoksičnosti, kot je 7-aminoactinomycin D (7-AAD) ali tripan modro, če je mogoče dokazati, da alternativna barvila dajejo podobne rezultate kot PI, na primer s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 2.2.

### Analiza s pretočno citometrijo

19. Raven izražanja CD86 in viabilnost celic se analizirata s pretočno citometrijo. Celice se prikažejo v točkovnem diagramu velikosti (FSC) in granuliranosti (SSC) na logaritemski skali, da se jasno opredeli populacija pri prvih vratih R1 in izločijo drobci. Za vsako jamico pri vratih R1 je cilj pridobiti 10 000 celic. Celice pri istih vratih R1 so prikazane v točkovnem diagramu FL3 ali FL4/SSC. Viabilne celice se prikažejo s postavitvijo drugih vrat R2, s čimer se izbere populacija celic, ki ne reagirajo na propidijev jodid (kanal FL3 ali FL4). Viabilnost celic se lahko izračuna z naslednjo enačbo v citometrijskem analiznem programu. Kadar je viabilnost celic majhna, se lahko pridobi do 20 000 celic, vključno z mrtvimi celicami. Alternativno se lahko podatki zajemajo eno minuto po začetku analize.

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

Delež FL1-pozitivnih celic se nato izmeri med temi viabilnimi celicami pri vratih R2 (znotraj R1). Izražanje CD86 na površini celic se analizira v točkovnem diagramu FL1/SSC

v okviru vrat za viabilne celice (R2).

Za jamice s kompletnim gojiščem/IgG1 se analizni označevalec nastavi blizu glavni populaciji, tako da imajo kontrole s kompletnim gojiščem IgG1 v ciljnem območju od 0,6 do 0,9 %.

Barvna interferenca je opredeljena kot sprememba točkovnega diagrama s FITC označenih IgG1 (geo. sr. SI FL1 IgG1  $\geq 150$  %).

Stimulacijski indeks (SI) CD86 za kontrolne celice (netretirane ali v 0,4 % DMSO) in celice, tretirane s kemikalijo, se izračuna v skladu z naslednjo enačbo:

$$S.I. = \frac{\% \text{ of } CD86^+ \text{ treated cells} - \% \text{ of } IgG1^+ \text{ treated cells}}{\% \text{ of } CD86^+ \text{ control cells} - \% \text{ of } IgG1^+ \text{ control cells}} \times 100$$

% netretiranih kontrolnih celic IgG1<sup>+</sup>: delež FL1-pozitivnih celic IgG1, opredeljenih z analiznim označevalcem (sprejemljiv razpon  $\geq 0,6$  % in  $< 1,5$  %, glej odstavek 22), med viabilnimi netretiranimi celicami.

% kontrolnih/tretiranih celic IgG1<sup>+</sup>/CD86<sup>+</sup>: delež FL1-pozitivnih celic IgG1/CD86, izmerjen brez premikanja analiznega označevalca med viabilnimi kontrolnimi/tretiranimi celicami.

## PODATKI IN POROČANJE

### Ocenjevanje podatkov

20. Pri preskusu U-SENS<sup>TM</sup> se izračunata naslednja parametra: vrednost CV70, tj. koncentracija, pri kateri se pokaže 70-odstotno preživetje celic U937 (30-odstotna citotoksičnost), in vrednost EC150, tj. koncentracija, pri kateri so preskusne kemikalije povzročile stimulacijski indeks (SI) CD86 150 %.

CV70 se izračuna z log-linearno interpolacijo z naslednjo enačbo:

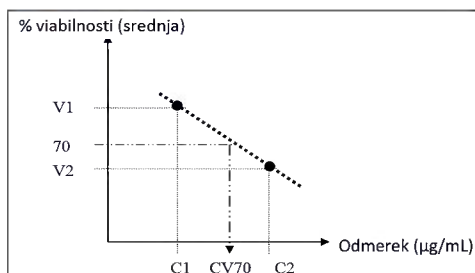
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

pri čemer je:

V1 najnižja vrednost viabilnosti celic nad 70 %,

V2 najvišja vrednost viabilnosti celic pod 70 %,

C1 in C2 sta koncentraciji, pri katerih se pokaže vrednost viabilnosti celic V1 oziroma V2.



Za pridobitev CV70 se lahko uporabijo tudi drugi pristopi, če se dokaže, da to ne vpliva na rezultate (npr. s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti).

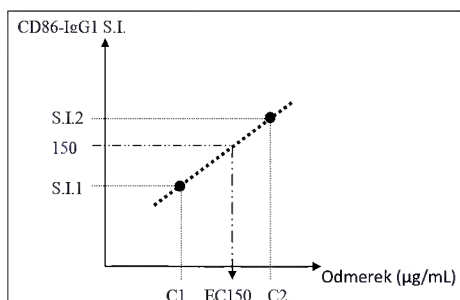
EC150 se izračuna z log-linearno interpolacijo z naslednjo enačbo:

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

pri čemer je:

C1 najvišja koncentracija v µg/ml s SI CD86 > 150 % (SI 1),

C2 najnižja koncentracija v µg/ml s SI CD86 ≥ 150 % (SI 2).



Vrednosti EC150 in CV70 se izračunata

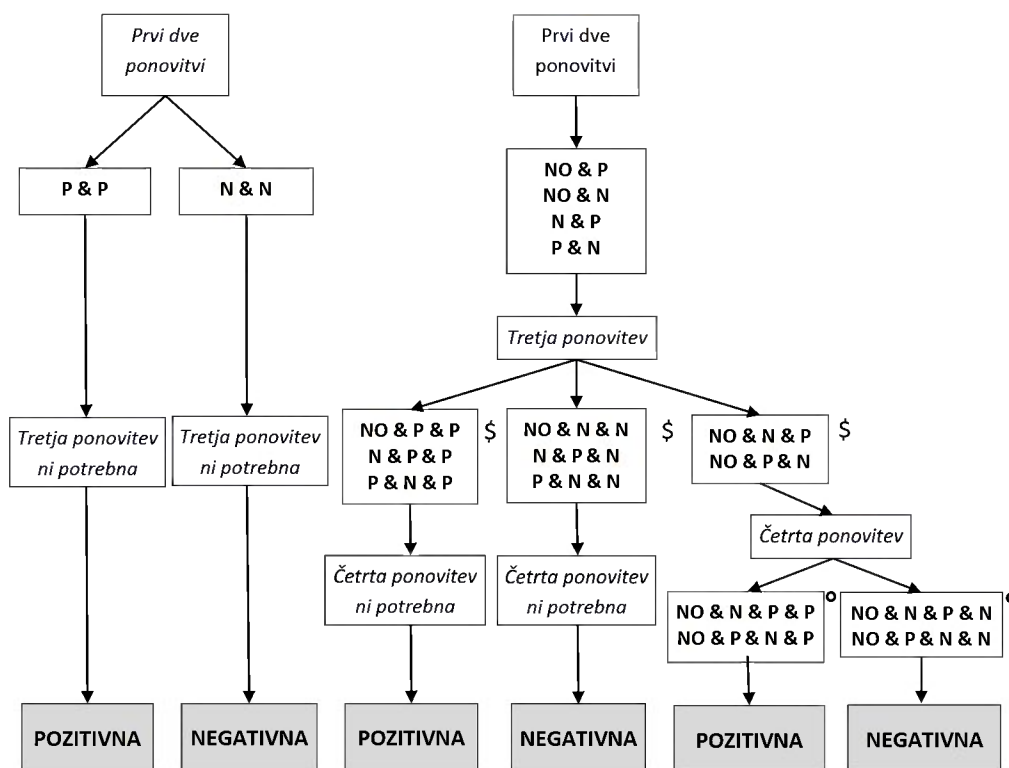
- za vsako ponovitev: posamezne vrednosti EC150 in CV70 se uporabijo kot orodja za preiskavo učinka odziva na koncentracijo za povečanje CD86 (glej odstavek 14);
- na podlagi povprečnih viabilnosti se določi skupna CV70 (12);
- na podlagi povprečnih vrednosti SI CD86 se določi skupna EC150 za preskusno kemikalijo, ki je s preskusom U-SENS™ napovedana kot POZITIVNA (glej odstavek 21) (12).

### Napovedni model

21. Za meritev izražanja CD86 se vsaka preskusna kemikalija preskusi v najmanj štirih koncentracijah in najmanj dveh neodvisnih ponovitvah (opravljenih na drug dan), iz katerih se izpelje ena sama napoved (NEGATIVNA ali POZITIVNA).

- Posamezna sklepna ugotovitev ponovitve v preskusu U-SENS™ se obravnava kot negativna (v nadaljnjem besedilu: N), če je SI CD86 manjši od 150 % pri vseh necitotoksičnih koncentracijah (viabilnost celic  $\geq 70\%$ ) in če ni ugotovljena nobena interferenca (citotoksičnost, topnost: glej odstavek 18; ali barva: glej odstavek 19 ne glede na to, pri katerih necitotoksičnih koncentracijah je interferenca zaznana). V vseh drugih primerih: če je SI CD86 večji od ali enak 150 % in/ali so ugotovljene interference, se posamezna sklepna ugotovitev ponovitve v preskusu U-SENS™ obravnava kot pozitivna (v nadaljnjem besedilu: P).
- Napoved U-SENS™ se obravnava kot NEGATIVNA, če sta vsaj dve neodvisni ponovitvi negativni (N) (slika 1). Če sta obe prvi ponovitvi negativni (N), se napoved U-SENS™ obravnava kot NEGATIVNA, tretje ponovitve pa ni treba izvesti.
- Napoved U-SENS™ se obravnava kot POZITIVNA, če sta vsaj dve neodvisni ponovitvi pozitivni (P) (slika 1). Če sta obe prvi ponovitvi pozitivni (P), se napoved U-SENS™ obravnava kot POZITIVNA, tretje ponovitve pa ni treba izvesti.
- Ker se poskus za ugotavljanje odmerka ne izvede, obstaja izjema, če je v prvi ponovitvi SI CD86 večji od 150 % ali enak 150 % samo pri najvišji necitotoksični koncentraciji. Za ponovitev se nato šteje, da je NEOPREDELJIVA (NO), tako da je treba preskusiti dodatne koncentracije (med najvišjo necitotoksično koncentracijo in najnižjo citotoksično koncentracijo – glej odstavek 20) v dodatnih ponovitvah. Če je ponovitev opredeljena kot NO, je treba izvesti najmanj dve dodatni ponovitvi in še četrto ponovitev, če druga in tretja ponovitev nista skladni (N in/ali P neodvisno) (slika 1). Nadaljnje ponovitve bodo obravnavane kot pozitivne, tudi če je CD86 enak ali večji od 150 % samo pri eni necitotoksični koncentraciji, ker je bila koncentracija prilagojena specifični preskusni kemikaliji. Končna napoved bo temeljila na večinskem rezultatu treh ali štirih posameznih ponovitev (tj. dveh od treh ali dveh od štirih) (slika 1).

**Slika 1:** Napovedni model, uporabljen pri preskusu U-SENS™. Napoved U-SENS™ je treba obravnavati v okviru IATA ter v skladu z določbami odstavka 4 ter odstavkov 7, 8 in 9 iz Splošnega uvoda.



N: ponovitev, pri kateri CD86 ni pozitiven ali interferenca ni ugotovljena;

P: ponovitev, pri kateri je CD86 pozitiven in/ali so interference ugotovljene;

NO: neopredeljiva. Prva ponovitev brez dokončne ugotovitve, kadar je CD86 pozitiven samo pri najvišji necitotoksični koncentraciji;

#: Posamezna neopredeljiva (NO) sklepna ugotovitev, pripisana samo prvi ponovitvi, samodejno vodi do tega, da je treba izvesti tretjo ponovitev, da se doseže večina pozitivnih (P) ali negativnih (N) sklepnih ugotovitev v vsaj dveh od treh neodvisnih ponovitev.

\$: Okenca prikazuje ustrezne kombinacije rezultatov iz treh ponovitev na podlagi rezultatov, pridobljenih v prvih dveh ponovitvah, prikazanih v zgornjem okencu.

°: Okenca prikazuje ustrezne kombinacije rezultatov iz štirih ponovitev na podlagi rezultatov, pridobljenih v prvih treh ponovitvah, prikazanih v zgornjem okencu.

## Merila za sprejemljivost

22. Pri uporabi preskusa U-SENS™ morajo biti izpolnjena naslednja merila za sprejemljivost (12).

- Po koncu  $45 \pm 3$ -urne izpostavljenosti mora biti srednja viabilnost tripleta netretiranih celic U937  $> 90 \%$ , v izražanju CD86 pa ni ugotovljen noben odmik. Bazalno izražanje CD86 pri netretiranih celicah U937 mora biti v območju  $\geq 2 \%$  in  $\leq 25 \%$ .

- Kadar se kot topilo uporabi DMSO, se veljavnost kontrole z vehiklom DMSO oceni z izračunom SI DMSO v primerjavi z netretiranimi celicami, srednja viabilnost tripleta celic pa je morala biti  $> 90 \%$ . Kontrola z vehiklom DMSO je veljavna, če je bila srednja vrednost SI CD86 njenega tripleta nižja od  $250 \%$  srednjega SI CD86 tripleta netretiranih celic U937.
- Ponovitve se štejejo za veljavne, če sta bili vsaj dve od treh vrednosti IgG1 netretiranih celic U937 v območju  $\geq 0,6 \%$  in  $< 1,5 \%$ .
- Sočasno preskušena negativna kontrola (mlečna kislina) se šteje za veljavno, če sta bila vsaj dva od treh ponovljenih vzorcev negativna (SI CD86  $< 150 \%$ ) in necitotoksična (viabilnost celic  $\geq 70 \%$ ).
- Pozitivna kontrola (TNBS) se šteje za veljavno, če sta bila vsaj dva od treh ponovljenih vzorcev pozitivna (SI CD86  $\geq 150 \%$ ) in necitotoksična (viabilnost celic  $\geq 70 \%$ ).

### Poročilo o preskusu

23. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

#### *Preskusna kemikalija*

Snov iz ene sestavine:

- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;
- fizični videz, topnost v kompletnem gojišču, topnost v DMSO, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo;
- čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
- preskušene koncentracije;
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;
- utemeljitev izbire topila/vehikla za vsako preskusno kemikalijo.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

- čim obsežnejša opredelitev lastnosti, na primer s kemijsko identiteto (glej zgoraj), čistostjo, kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi (glej zgoraj) sestavin, če so na voljo;
- fizični videz, topnost v kompletnem gojišču, topnost v DMSO in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo;

- molekulska masa ali navidezna molekulska masa v primeru zmesi/polimerov z znano sestavo ali drugi podatki, pomembni za izvedbo študije;
- obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
- preskušene koncentracije;
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;
- utemeljitev izbire topila/vehikla za vsako preskusno kemikalijo.

### *Kontrole*

#### Pozitivna kontrola:

- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;
- fizični videz, topnost v DMSO, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo in če je ustrezno;
- čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
- preskušene koncentracije;
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;
- sklicevanje na rezultate pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov, ki kažejo ustrezna merila za sprejemljivost ponovitev, če je to ustrezno.

#### Negativna kontrola in kontrola s topilom/vehiklom:

- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;
- čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- fizični videz, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če se uporabijo druga kontrolna topila/vehikli razen tistih, ki so navedeni v smernici za preskušanje, in če so na voljo;
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;
- utemeljitev izbire topila/vehikla za vsako preskusno kemikalijo.

### *Preskusni pogoji:*

- ime in naslov naročnika, preskuševalnega laboratorija in vodje študije;



- opis uporabljenega preskusa;
- uporabljena celična linija, pogoji njenega hranjenja in vir (npr. laboratorij, ki jo je zagotovil);
- uporabljena pretočna citometrija (npr. model), vključno z nastavitvami instrumenta, protitelesi in uporabljenim označevalcem citotoksičnosti;
- postopek, uporabljen za dokazovanje usposobljenosti laboratorija v zvezi z izvedbo preskusa s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti, in postopek, uporabljen za prikaz ponovljivosti izvedbe preskusa v daljšem časovnem obdobju, npr. podatki o kontrolah iz preteklih preskusov in/ali podatki iz preteklih preverjanj reaktivnosti.

*Merila za sprejemljivost preskusa:*

- viabilnost celic in vrednosti SI CD86, pridobljene s kontrolo s topilom/vehiklom, v primerjavi z območji sprejemljivosti;
- viabilnost celic in vrednosti SI, pridobljene s pozitivno kontrolo, v primerjavi z območji sprejemljivosti;
- viabilnost celic vseh preskušanih koncentracij preskušene kemikalije.

*Preskusni postopek:*

- uporabljeno število ponovitev;
- uporabljene koncentracije preskusnih kemikalij, nanašanje in čas izpostavljenosti (če je drugačen od priporočenega);
- trajanje izpostavljenosti;
- opis uporabljenih meril za ocenjevanje in odločitev;
- opis vseh prilagoditev preskusnega postopka.

*Rezultati:*

- preglednice s podatki, ki vključujejo vrednost CV70 (če je ustrezno), vrednosti viabilnosti celic in vrednosti EC150 (če je ustrezno), pridobljene za preskusno kemikalijo in pozitivno kontrolo v vsaki ponovitvi, ter indikacija ocene preskusne kemikalije glede na napovedni model;
- opis kakršnih koli drugih pomembnih opažanj, če je ustrezno.

*Razprava o rezultatih:*

- razprava o rezultatih, pridobljenih s preskusom U-SENS™;
- obravnavanje rezultatov v okviru IATA, če so na voljo druge pomembne informacije.

*Sklepne ugotovitve*

## VIRI

- (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. Na voljo na: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations](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. Na voljo na: [\[http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705\]](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. Na voljo na: <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/euro-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing>.
- (5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014. *Cosmetics* 3, 14.
- (6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment (št. 256), ENV/JM/MONO(2016)29. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na: <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. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD\\_Final\\_Draft\\_GIVIMP.pdf](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf).
- (12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS<sup>TM</sup>), 33 str. Na voljo na: [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. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (15) Združeni narodi (ZN) (2015). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, šesta revidirana izdaja, New York in Ženeva: United Nations Publications. Na voljo na: [http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf](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 (št. 168): The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na: <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, Bruselj. Na voljo na:  
[https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETO  
C\\_2003-TR87.pdf](https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETO_C_2003-TR87.pdf)

## Dodatek 2.1

### OPREDELITVE POJMOV

**Točnost:** stopnja ujemanja rezultatov preskusa s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusa in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz skladnost se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravih rezultatov preskusa (14).

**Potek neželenega izida (Adverse Outcome Pathway – AOP):** zaporedje dogodkov od kemijske strukture ciljne kemikalije ali skupine podobnih kemikalij prek začetnega dogodka na molekularni ravni do preiskovanega rezultata *in vivo* (15).

**Koncentracijski odziv CD86:** obstaja odvisnost od koncentracije (ali odziv na koncentracijo), kadar pozitivni koncentraciji (SI CD86  $\geq 150$ ) sledi koncentracija z naraščajočim SI CD86).

**Kemikalija:** snov ali zmes.

**CV70:** ocenjena koncentracija, pri kateri je viabilnost celic 70-odstotna.

**Odmik:** odmik je opredeljen tako: (i) popravljena vrednost %CD86<sup>+</sup> netretiranega kontrolnega ponovljenega vzorca 3 je nižja od 50 % srednje vrednosti popravljene vrednosti %CD86<sup>+</sup> netretiranih kontrolnih ponovljenih vzorcev 1 in 2; ter (ii) popravljena vrednost %CD86<sup>+</sup> negativnega kontrolnega ponovljenega vzorca 3 je nižja od 50 % srednje vrednosti popravljene vrednosti %CD86<sup>+</sup> negativnih kontrolnih ponovljenih vzorcev 1 in 2.

**EC150:** ocenjene koncentracije, pri katerih je SI izražanja CD86 150 %.

**Pretočna citometrija:** citometrična tehnika, pri kateri celice, suspendirane v tekočini, vsaka posebej potuje skozi ozek snop laserske svetlobe, ki se razprši v vzorcih, značilnih za celice in njihove komponente; celice se pogosto označijo s fluorescentnimi označevalci, tako da se svetloba najprej absorbira in nato oddaja pri spremenjenih frekvencah.

**Nevarnost:** neločljiva lastnost sredstva ali stanje, ki lahko ob izpostavljenosti temu sredstvu povzroči neželen učinek na organizem, sistem ali (pod)populacijo.

**IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment = celostni pristop k testiranju in ocenjevanju):** strukturiran pristop, ki se uporablja za ugotavljanje nevarnosti (potencial), opredeljevanje nevarnosti (moč) in/ali oceno varnosti (potencial/moč in izpostavljenost) kemikalije ali skupine kemikalij ter strateško zajame in oceni vse pomembne podatke, da se lahko sprejme regulativna odločitev v zvezi z morebitno nevarnostjo in/ali tveganjem in/ali potrebo po nadaljnjem, ciljno usmerjenem in s tem minimalnem preskušanju.

**Zmes:** zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi.

**Snov iz ene sestavine:** snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je vsaj 80 mas. % glavne sestavine.

**Snov z več sestavinami:** snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je več glavnih sestavin s koncentracijo  $\geq 10$  mas. % in  $< 80$  mas. %. Snov z več sestavinami je rezultat proizvodnega postopka. Razlika med zmesjo in snovjo z več sestavinami je v tem, da je zmes pridobljena z mešanjem dveh ali več snovi brez kemične reakcije. Snov z več sestavinami je rezultat kemične reakcije.

**Pozitivna kontrola:** ponovljen vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s snovjo, za katero je znano, da povzroči pozitiven odziv. Za zagotovitev, da se lahko variabilnost odziva pozitivne kontrole oceni v daljšem časovnem obdobju, pa stopnja pozitivnega odziva ne sme biti previsoka.

**Prehapteni:** kemikalije, ki postanejo povzročitelji preobčutljivosti kože z abiotsko pretvorbo, npr. oksidacijo.

**Prohapteni:** kemikalije, ki potrebujejo encimsko aktivacijo, da bi uresničevale potencial za povzročanje preobčutljivosti kože.

**Ustreznost:** opis razmerja med preskusom in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere preskus pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Pri ustreznosti se upošteva tudi točnost (skladnost) preskusa (14).

**Zanesljivost:** stopnja obnovljivosti preskusa v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih in interne laboratorijske ponovljivosti (14).

**Ponovitev:** ponovitev zajema eno ali več preskusnih kemikalij, preskušanih sočasno s kontrolo s topilom/vehiklom in pozitivno kontrolo.

**Občutljivost:** delež vseh pozitivnih/aktivnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskus, s katerim se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusa (14).

**SI:** stimulacijski indeks. Relativne vrednosti geometrijske srednje vrednosti intenzitete fluorescence pri celicah, tretiranih s kemikalijo, v primerjavi s celicami, tretiranimi s topilom.

**Kontrola s topilom/vehiklom:** netretiran vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema razen preskusne kemikalije, vključuje pa topilo/vehikel, ki se uporabi. Uporablja se za določanje izhodiščnega odziva za vzorce, tretirane s preskusno kemikalijo, raztopljeno ali stabilno dispergirano v istem topilu/vehiklu. Pri preskušanju s sočasno kontrolo z gojiščem ta vzorec tudi pokaže, ali topilo/vehikel reagira s preskusnim sistemom.

**Specifičnost:** delež vseh negativnih/neaktivnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskus, s katerim se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusa (14).

**Pufer za barvanje:** fosfatni pufer s soljo, ki vsebuje 5 % telečjega fetalnega seruma.

**Snov:** kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo.

**Preskusna kemikalija:** vsaka snov ali zmes, preskušena z uporabo tega preskusa.

**Globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN):** sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudi (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (16).

**UVCB:** snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

**Veljaven preskus:** preskus, ki se obravnava kot dovolj ustrezen in zanesljiv za določen namen ter temelji na znanstveno utemeljenih načelih. Preskus ni nikoli veljaven v absolutnem smislu, ampak samo v zvezi z opredeljenim namenom (14).



**Dodatek 2.2****SNOVI ZA PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI**

Pred redno uporabo preskusa, opisanega v tem dodatku k preskusni metodi B.71, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost tako, da pravilno pridobijo napovedi U-SENS™, pričakovane za 10 snovi, ki so priporočene v preglednici 1, ter vrednosti CV70 in EC150, ki so za vsaj 8 od 10 snovi za preverjanje usposobljenosti v ustreznem referenčnem območju. Snovi za preverjanje usposobljenosti so bile izbrane, ker predstavljajo celoten razpon odzivov pri nevarnostih v zvezi s povzročanjem preobčutljivosti kože. Druga merila za izbiro so bila razpoložljivost snovi na trgu, razpoložljivost visokokakovostnih referenčnih podatkov *in vivo* in razpoložljivost visokokakovostnih podatkov *in vitro*, pridobljenih s preskusom U-SENS™. Za preskus U-SENS™ so na voljo tudi objavljeni referenčni podatki (1) (8).

**Preglednica 1:** Priporočene snovi za dokazovanje tehnične usposobljenosti za preskus U-SENS™

| <b>Snovi za preverjanje usposobljenosti</b> | <b>Št. CAS</b> | <b>Agregatno stanje</b> | <b>Napoved <i>in vivo</i><sup>1</sup></b> | <b>U-SENS™<br/>Topilo/<br/>vehikel</b> | <b>U-SENS™<br/>CV70<br/>Referenčno<br/>območje v<br/>µg/ml<sup>2</sup></b> | <b>U-SENS™<br/>EC150<br/>Referenčno<br/>območje v<br/>µg/ml<sup>2</sup></b> |
|---------------------------------------------|----------------|-------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| 4-fenilendiamin                             | 106-50-3       | trdna snov              | povzročitelj preobčutljivosti (močen)     | kompletno gojišče <sup>3</sup>         | < 30                                                                       | pozitivna (≤ 10)                                                            |
| pikrilsulfonska kislina                     | 2508-19-2      | tekočina                | povzročitelj preobčutljivosti (močen)     | kompletno gojišče                      | > 50                                                                       | pozitivna (≤ 50)                                                            |
| dietil maleat                               | 141-05-9       | tekočina                | povzročitelj preobčutljivosti (zmeren)    | DMSO                                   | 10–100                                                                     | pozitivna (≤ 20)                                                            |
| rezorcinol                                  | 108-46-3       | trdna snov              | povzročitelj preobčutljivosti (zmeren)    | kompletno gojišče                      | > 100                                                                      | pozitivna (≤ 50)                                                            |
| cimetov alkohol                             | 104-54-1       | trdna snov              | povzročitelj preobčutljivosti (šibek)     | DMSO                                   | > 100                                                                      | pozitivna (10–100)                                                          |
| 4-alilanol                                  | 140-67-0       | tekočina                | povzročitelj preobčutljivosti (šibek)     | DMSO                                   | > 100                                                                      | pozitivna (< 200)                                                           |

|                   |         |            |                              |                   |       |                   |
|-------------------|---------|------------|------------------------------|-------------------|-------|-------------------|
| saharin           | 81-07-2 | trdna snov | ne povzroča preobčutljivosti | DMSO              | > 200 | negativna (> 200) |
| glicerol          | 56-81-5 | tekočina   | ne povzroča preobčutljivosti | kompletno gojišče | > 200 | negativna (> 200) |
| mlečna kislina    | 50-21-5 | tekočina   | ne povzroča preobčutljivosti | kompletno gojišče | > 200 | negativna (> 200) |
| salicilna kislina | 69-72-7 | trdna snov | ne povzroča preobčutljivosti | DMSO              | > 200 | negativna (> 200) |

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS).

<sup>1</sup> Napoved nevarnosti (in moči) *in vivo* temelji na podatkih za preskus LLNA (1) (8). Moč *in vivo* se izpelje s pomočjo meril, ki jih je predlagal ECETOC (17).

<sup>2</sup> Na podlagi ugotovljenih vrednosti iz preteklih preskusov (1) (8).

<sup>3</sup> Kompletno gojišče: gojišče RPMI-1640, dopolnjeno z 10 % telečjega fetalnega seruma, 2 mM L-glutamina, 100 enotami/ml penicilina in 100 µg/ml streptomocina (8).

### Dodatek 3

## PREOBČUTLJIVOST KOŽE *IN VITRO*: PRESKUS IL-8 LUC

### ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

1. V nasprotju s preskusi, s katerimi se analizira izražanje celičnih površinskih označevalcev, se s preskusom IL-8-Luc kvantificirajo spremembe v izražanju IL-8, tj. citokina, povezanega z aktivacijo dendritskih celic (DC). V reporterski celični liniji IL-8, pridobljeni iz celic THP-1 (THP-G8, pridobljen iz celične linije humane akutne monocitne levkemije THP-1), se izražanje IL-8 meri po izpostavljenosti povzročiteljem preobčutljivosti (1). Izražanje luciferaze se nato uporabi v podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože.
2. Preskus IL-8 Luc je bil ocenjen v validacijski študiji (2), ki so jo izvedli Japanese Centre for the Validation of Alternatives Methods (japonski center za validacijo alternativnih metod (JaCVAM), **ministrstvo za gospodarstvo, trgovino in industrijo** (MGTO) in Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments (**japonska družba za alternative poskusom na živalih**) (JSAAE), nato pa še z neodvisnim medsebojnim strokovnim pregledom (3) pod vodstvom JaCVAM ter ministrstva za zdravje, delo in blaginjo (MZDB) ob podpori **International Cooperation on Alternative Test Methods** (mednarodno sodelovanje pri alternativnih preskusnih metodah) (ICATM). Ob upoštevanju vseh razpoložljivih dokazov ter prispevkov regulatorjev in deležnikov se preskus IL-8 Luc šteje za koristen v okviru IATA za razlikovanje med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, zaradi razvrstitve glede na nevarnost in označevanje. Primeri uporabe podatkov preskusa IL-8 Luc v povezavi z drugimi informacijami so navedeni v virih (4) (5) (6).
3. Izkazalo se je, da se lahko preskus IL-8 Luc prenese v laboratorije, ki imajo izkušnje s tehnikami gojenja celičnih kultur in meritvami luciferaze. Obnovljivost v enem in več laboratorijih je bila 87,7-odstotna oziroma 87,5-odstotna (2). Podatki, pridobljeni z validacijsko študijo (2), in druga objavljena dela (1) (6) kažejo, da je bilo v primerjavi z LLNA s preskusom IL-8 Luc 118 od 143 kemikalij ocenjenih kot pozitivnih ali negativnih, 25 pa kot neopredeljivih, točnost preskusa IL-8 Luc pri razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože (kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP) in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti, pa je 86-odstotna (101/118), pri čemer je občutljivost 96-odstotna (92/96) in specifičnost 41-odstotna (9/22). Z izključitvijo snovi, ki ne spadajo na spodaj opisano področje uporabe (odstavek 5), je bilo s preskusom IL-8 Luc 113 od 136 kemikalij ocenjenih kot pozitivnih ali negativnih, 23 pa kot neopredeljivih, točnost preskusa IL-8 Luc pa je 89-odstotna (101/113), pri čemer je občutljivost 96-odstotna

(92/96) in specifičnost 53-odstotna (9/17). Z uporabo podatkov za ljudi, navedenih v Urbisch *et al.* (7), je bilo s preskusom IL-8 Luc 76 od 90 kemikalij ocenjenih kot pozitivnih ali negativnih, 14 pa kot neopredeljivih, točnost pa je 80-odstotna (61/76), pri čemer je občutljivost 93-odstotna (54/58) in specifičnost 39-odstotna (7/18). Z izključitvijo snovi, ki ne spadajo na področje uporabe, je bilo s preskusom IL-8 Luc 71 od 84 kemikalij ocenjenih kot pozitivnih ali negativnih, 13 pa kot neopredeljivih, točnost pa je 86-odstotna (61/71), pri čemer je občutljivost 93-odstotna (54/58) in specifičnost 54-odstotna (7/13). Lažno negativne napovedi pri preskusu IL-8 Luc se bodo bolj verjetno pojavile pri kemikalijah z nizko do zmerno stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (tj. podkategorija 1B po GHS ZN/uredbi CLP) kot pri kemikalijah z visoko stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (tj. podkategorija 1A po GHS ZN/uredbi CLP) (6). Vse te informacije skupaj podpirajo vlogo preskusa IL-8 Luc pri opredelitvi nevarnosti za povzročanje preobčutljivosti kože. Točnost, navedena za preskus IL-8 Luc kot samostojen preskus, je zgolj okvirna, saj ga je treba obravnavati skupaj z drugimi viri informacij v okviru IATA ter v skladu z določbami odstavkov 7 in 8 iz Splošnega uvoda. Poleg tega je treba pri ocenjevanju preskusov za preobčutljivost kože, ki se ne izvajajo na živalih, upoštevati, da preskus LLNA ter druga testiranja na živalih ne odražajo v celoti razmer pri človeku.

4. Na podlagi trenutno razpoložljivih podatkov se je pokazalo, da se preskus IL-8 Luc lahko uporablja za preskusne kemikalije, ki zajemajo različne organske funkcionalne skupine, mehanizme reakcije, stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (kot je določena v študijah *in vivo*) ter fizikalno-kemijske lastnosti (2) (6).
5. Čeprav se pri preskusu IL-8 Luc kot topilo uporablja X-VIVO™ 15, so bile z njim pravilno ocenjene kemikalije z vrednostjo  $\text{Log } K_{ow} > 3,5$  in kemikalije s topnostjo v vodi približno 100 µg/ml, kot je bila izračunana z EPI Suite™, njegova uspešnost zaznavanja povzročiteljev preobčutljivosti s slabo topnostjo v vodi pa je boljša kot pri preskusu IL-8 Luc, pri katerem se kot topilo uporabi dimetil sulfoksid (DMSO) (2). Vendar pa lahko negativni rezultati za preskusne kemikalije, ki niso topne pri 20 mg/ml, povzročijo lažno negativne rezultate, ker niso topne v X-VIVO™ 15. Zato se negativni rezultati za te kemikalije ne smejo upoštevati. V validacijski študiji je bila ugotovljena visoka lažno negativna stopnja za anhidride. Poleg tega se lahko zaradi omejene presnovne zmogljivosti celične linije (8) in poskusnih pogojev pri prohaptenuh (tj. snoveh, ki potrebujejo presnovno aktivacijo) in prehaptenuh (tj. snoveh, aktiviranih z oksidacijo z zrakom) v preskusu pojavijo negativni rezultati. Čeprav je treba negativne rezultate za domnevne pre/prohaptene razlagati previdno, pa je bilo s preskusom IL-8 Luc pravilno ocenjenih 11 od 11 prehaptenov, 6/6 prohaptenov ter 6/8 pre/prohaptenov v podatkovnem nizu preskusa IL-8 Luc (2). Na podlagi nedavnega obsežnega pregleda treh preskusov, ki se ne izvajajo na živalih (DPRA, KeratinoSens™ in h-CLAT), za odkrivanje prehaptenov in prohaptenov

(9) ter na podlagi dejstva, da so celice THP-G8, uporabljene v preskusu IL-8 Luc, celična linija, pridobljena iz celic THP-1, ki se uporabljajo v preskusu h-CLAT, lahko preskus IL-8 Luc tudi prispeva k povečanju občutljivosti preskusov, ki se ne izvajajo na živalih, za odkrivanje prehaptenov in prohaptenov v povezavi z drugimi preskusi. Do zdaj preskušene površinsko aktivne snovi so dale (lažno) pozitivne rezultate ne glede na svojo vrsto (npr. kationske, anionske ali neionske). Nazadnje, kemikalije, ki motijo lucifrazo, lahko motijo njeno aktivnost/meritev in povzročajo očitno zaviranje ali povečano luminiscenco (10). Poročalo se je na primer o tem, da koncentracije fitoestrogena, višje od 1  $\mu$ M, motijo luminiscenčne signale v drugih preskusih na luciferaznem poročevalskem genu zaradi prevelike aktivacije luciferaznega poročevalskega gena. Zato je treba izražanje luciferaze, pridobljeno pri visokih koncentracijah fitoestrogenov ali spojin, ki domnevno povzročajo fitoestrogenu podobno aktivacijo luciferaznega poročevalskega gena, pazljivo preučiti (11). Glede na navedeno so površinsko aktivne snovi, anhidridi in kemikalije, ki motijo lucifrazo, izključene s področja uporabe tega preskusa. Kadar obstajajo dokazi, da preskusa IL-8 Luc ni mogoče uporabiti za druge specifične kategorije preskusnih kemikalij, se ta preskus zanje ne sme uporabiti.

6. Kot je navedeno zgoraj, preskus IL-8 Luc podpira razlikovanje med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože. Potrebno je nadaljnje delo, ki po možnosti temelji na podatkih za ljudi, da bi se določilo, kako bi lahko rezultati preskusa IL-8 Luc prispevali k oceni stopnje povzročanja preobčutljivosti, kadar se obravnavajo v povezavi z drugimi viri informacij.
7. Opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 3.1.

## NAČELO PRESKUSA

8. Pri preskusu IL-8 Luc se uporabi celična linija humane monocitne levkemije, tj. THP-1, ki je bila pridobljena iz celične banke American Type Culture Collection (Manassas, Virginija, ZDA). Z uporabo te celične linije je oddelek za dermatologijo na fakulteti za medicino v Tohokuju izdelal THP-G8 reportersko celično linijo IL-8 na podlagi THP-1, ki vključuje luciferazna gena za SLO (stable luciferase orange) in SLR (stable luciferase red) pod kontrolo promotorjev IL-8 oziroma glicerinaldehid 3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH) (1). To omogoča kvantitativno merjenje indukcije luciferaznega gena z zaznavanjem luminiscence, pri čemer se kot kazalnik aktivnosti IL-8 in GAPDH v celicah po izpostavljenosti kemikalijam, ki povzročajo preobčutljivost, uporabijo dobro vzpostavljeni luciferazni substrati, ki oddajajo svetlobo.
9. Sistem preskusa z dvema barvama vključuje lucifrazo, ki oddaja oranžno svetlobo (SLO;  $\lambda$ maks. = 580 nm) (12), za izražanje gena promotorja IL-8 in lucifrazo, ki oddaja rdečo

svetlobo (SLR;  $\lambda_{\text{maks.}} = 630 \text{ nm}$ ) (13), za izražanje gena notranjega kontrolnega promotorja GAPDH. Luciferazi oddajata različno barvo po reakciji z d-luciferinom kresničke, njuna luminiscenca pa se izmeri sočasno v enostopenjski reakciji z delitvijo oddajanja iz zmesi za preskus z uporabo optičnega filtra (14) (Dodatek 3.2).

10. Celice THP-G8 se 16 ur tretirajo s preskusno kemikalijo, nakar se izmerita aktivnost luciferaze SLO (SLO-LA), ki izraža aktivnost promotorja IL-8, in aktivnost luciferaze SLR (SLR-LA), ki izraža aktivnost promotorja GAPDH. Zaradi lažjega razumevanja kratic sta SLO-LA in SLR-LA označeni kot IL8LA oziroma GAPLA. Preglednica 1 vsebuje opis izrazov, povezanih z aktivnostjo luciferaze v preskusu IL-8 Luc. Izmerjene vrednosti se uporabijo za izračun normalizirane IL8LA (nIL8LA), ki je razmerje med IL8LA in GAPLA; indukcije nIL8LA (Ind-IL8LA), ki je razmerje med aritmetičnimi sredinami štirikratnika izmerjenih vrednosti nIL8LA celic THP-G8, tretiranih s preskusno kemikalijo, in vrednostmi nIL8LA netretiranih celic THP-G8; in inhibicije GAPLA (Inh-GAPLA), ki je razmerje med aritmetičnimi sredinami štirikratnika izmerjenih vrednosti GAPLA celic THP-G8, tretiranih s preskusno kemikalijo, in vrednostmi GAPLA netretiranih celic THP-G8, ter uporabijo kot kazalnik za citotoksičnost.

**Preglednica 1:** Opis izrazov, povezanih z aktivnostjo luciferaze v preskusu IL-8 Luc

| Kratice   | Opredelitev                                                              |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------|
| GAPLA     | Aktivnost luciferaze SLR, ki izraža aktivnost promotorja GAPDH           |
| IL8LA     | Aktivnost luciferaze SLO, ki izraža aktivnost promotorja IL-8            |
| nIL8LA    | IL8LA/GAPLA                                                              |
| Ind-IL8LA | nIL8LA celic THP-G8, tretiranih s kemikalijami/nIL8LA netretiranih celic |
| Inh-GAPLA | GAPLA celic THP-G8, tretiranih s kemikalijami/GAPLA netretiranih celic   |
| CV05      | Najnižja koncentracija kemikalije, pri kateri Inh-GAPLA postane < 0,05   |

11. Na voljo so standardi izvajanja (15), da se olajša validacija prilagojenih luciferaznih preskusov z IL-8 *in vitro*, ki so podobni preskusu IL-8 Luc, in omogoči pravočasna sprememba Smernice OECD za preskušanje 442E za njihovo vključitev. Medsebojno priznavanje podatkov OECD bo zagotovljeno le za preskuse, validirane v skladu s standardi izvajanja, če je te preskuse pregledala OECD in jih vključila v Smernico za preskušanje 442E (16).

## DOKAZOVANJE USPOSOBLJENOSTI

12. Pred redno uporabo preskusa, opisanega v tem dodatku k preskusni metodi B.71, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost, tako da v skladu z dobrimi praksami metode

*in vitro* (17) uporabijo 10 snovi za preverjanje usposobljenosti, navedenih v Dodatku 3.3. Poleg tega morajo uporabniki preskusov vzdrževati zbirko preteklih podatkov, pridobljenih s preverjanji reaktivnosti (glej odstavek 15) ter pozitivnimi kontrolami in kontrolami s topilom/vehiklom (glej odstavke od 21 do 24), ter te podatke uporabiti za potrditev, da se v njihovem laboratoriju vzdržuje obnovljivost preskusa skozi čas.

## POSTOPEK

13. Na voljo je standardni delovni postopek za preskus IL-8 Luc, ki ga je treba uporabiti pri izvajanju preskusa (18). Laboratoriji, ki želijo izvesti preskus, lahko rekombinantno celično linijo THP-G8 pridobijo od družbe GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonska, če podpišejo sporazum o prenosu materiala v skladu s pogoji iz predloge OECD. V naslednjih odstavkih so opisani glavne sestavine in postopki preskusa.

### Priprava celic

14. Za izvedbo preskusa IL-8 Luc je treba uporabiti celično linijo THP-G8 družbe GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonska (glej odstavka 8 in 13). Celice se po prejemu namnožijo (od 2 do 4 pasaže) in shranijo zamrznjene kot homogena zaloga. Celice iz te zaloge se lahko namnožujejo do največ 12 pasaž ali največ 6 tednov. Gojišče, ki se uporablja za namnoževanje, je gojišče RPMI-1640, ki vsebuje 10 % fetusnega seruma goveda (FBS), antibiotično/antimikotično raztopino (100 U/ml penicilina G, 100 µg/ml streptomicina in 0,25 µg/ml amfotericina B in 0,85 % fiziološke raztopine) (npr. GIBCO Cat#15240-062), 0,15 µg/ml puromicina (npr. CAS:58-58-2) in 300 µg/ml G418 (npr. CAS:108321-42-2).
15. Preden se celice uporabijo za preskus, jih je treba kvalificirati s preverjanjem reaktivnosti. To preverjanje je treba opraviti od 1 do 2 tedna ali od 2 do 4 pasaže po odtajanju z uporabo pozitivne kontrole, tj. 4-nitrobenzil bromida (4-NBB) (CAS:100-11-8,  $\geq 99$ -odstotna čistost), in negativne kontrole, tj. mlečne kisline (LA) (CAS:50-21-5,  $\geq 85$ -odstotna čistost). 4-NBB bi moral povzročiti pozitiven odziv na Ind-IL8LA ( $\geq 1,4$ ), medtem ko bi morala LA povzročiti negativen odziv na Ind-IL8LA ( $< 1,4$ ). Za preskus se uporabijo samo celice, ki so uspešno prestale preverjanje reaktivnosti. Preverjanje reaktivnosti je treba izvesti v skladu s postopki, opisanimi v odstavkih od 22 do 24.
16. Za preskušanje se celice THP-G8 nasadijo z gostoto od 2 do  $5 \times 10^5$  celic/ml in predhodno gojijo v stekleničkah za gojenje celičnih kultur od 48 do 96 ur. Na dan preskusa se celice odvzamejo iz stekleničke za gojenje celičnih kultur in sperejo z RPMI-1640, ki vsebuje 10 % FBS brez kakršnih koli antibiotikov, nato pa se ponovno suspendirajo v RPMI-1640, ki vsebuje 10 % FBS brez kakršnih koli antibiotikov, z gostoto  $1 \times 10^6$  celic/ml. Celice se nato nanesejo na črno 96-jamično ploščo z ravnim dnom (npr. Costar Cat#3603) po 50 µl ( $5 \times 10^4$  celic/jamico).

### Priprava preskusne kemikalije in kontrolnih snovi

17. Preskusna kemikalija in kontrolne snovi se pripravijo na dan preskusa. Za preskus IL-8 Luc se preskusne kemikalije raztopijo v X-VIVO™ 15, tj. gojišču brez seruma, ki je na voljo na trgu (Lonza, 04-418Q), do končne koncentracije 20 mg/ml. X-VIVO™ 15 se doda 20 mg preskusne kemikalije (ne glede na topnost kemikalije) v mikrocentrifugirki do količine 1 ml ter nato 30 minut energično meša in stresa na rotorju pri največji hitrosti 8 vrt/min pri sobni temperaturi približno 20 °C. Če se trdne kemikalije še vedno ne raztopijo, se epruveta ultrazvočno obdela, dokler ni kemikalija popolnoma raztopljena ali stabilno dispergirana. Pri preskusnih kemikalijah, ki so topne v X-VIVO™ 15, se raztopina razredči s faktorjem 5 z X-VIVO™ 15 in uporabi kot osnovna raztopina preskusne kemikalije z X-VIVO™ 15 (4 mg/ml). Pri preskusnih kemikalijah, ki niso topne v X-VIVO™ 15, se zmes znova rotira najmanj 30 minut in nato 5 min centrifugira pri 15 000 vrt/min ( $\approx 20\,000\,g$ ); nastali supernatant se uporabi kot osnovna raztopina preskusne kemikalije z X-VIVO™ 15. Če se uporabijo druga topila, kot so DMSO, voda ali gojišče, je treba njihovo uporabo znanstveno utemeljiti. Podroben postopek za raztopitev kemikalij je opisan v Dodatku 3.5. Raztopine z X-VIVO™ 15, opisane v odstavkih od 18 do 23, se zmešajo v razmerju 1 : 1 (v/v) s suspenzijami celic, pripravljenimi na črni 96-jamični plošči z ravnim dnom (glej odstavek 16).
18. Prva ponovitev preskusa je namenjena določitvi citotoksične koncentracije in preučitvi potenciala kemikalij za povzročanje preobčutljivosti kože. Z uporabo X-VIVO™ 15 se osnovne raztopine preskusne kemikalije z X-VIVO™ 15 zaporedoma razredčijo s faktorjem redčenja 2 (glej Dodatek 3.5), za kar se uporabi 96-jamični preskusni blok (npr. Costar Cat#EW-01729-03). Nato se 50  $\mu$ l/jamico razredčene raztopine doda 50  $\mu$ l suspenzije celic na črni 96-jamični plošči z ravnim dnom. Pri preskusnih kemikalijah, ki so topne v X-VIVO™ 15, končne koncentracije preskusnih kemikalij torej segajo od 0,002 do 2 mg/ml (Dodatek 3.5). Pri preskusnih kemikalijah, ki niso topne v X-VIVO™ 15 pri 20 mg/ml, se določijo samo faktorji redčenja, ki segajo od 2 do  $2^{10}$ , čeprav dejanske končne koncentracije preskusnih kemikalij ostanejo negotove in so odvisne od nasičene koncentracije preskusnih kemikalij v osnovni raztopini z X-VIVO™ 15.
19. V naslednjih ponovitvah preskusa (tj. drugi, tretji in četrti ponovitvi) se osnovna raztopina z X-VIVO™ 15 pripravi pri koncentraciji, ki je 4-krat višja od koncentracije viabilnosti celic 05 (CV05; najnižja koncentracija, pri kateri Inh-GAPLA postane  $< 0,05$ ) v prvem poskusu. Če se Inh-GAPLA ne zniža pod 0,05 pri najvišji koncentraciji v prvi ponovitvi, se osnovna raztopina z X-VIVO™ 15 pripravi pri najvišji koncentraciji prve ponovitve. Koncentracija CV05 se izračuna z delitvijo koncentracije osnovne raztopine v prvi ponovitvi s faktorjem redčenja za CV05 (X) (faktor redčenja CV05 (X); faktor redčenja, potreben za razredčenje osnovne raztopine na CV05) (glej Dodatek 3.5). Za preskusne snovi, ki niso topne v X-VIVO pri 20 mg/ml, se CV05 določi s koncentracijo osnovne



raztopine x 1/X. Pri ponovitvah od 2 do 4 se druga osnovna raztopina pripravi kot 4 x CV50 (Dodatek 3.5).

20. Zaporedne razredčitve drugih osnovnih raztopin z X-VIVO™ 15 se pripravijo s faktorjem redčenja 1,5, pri čemer se uporabi 96-jamični preskusni blok. Nato se 50 µl/jamico razredčene raztopine doda 50 µl suspenzije celic v jamicah na črni 96-jamični plošči z ravnim dnom. Vsako koncentracijo vsake preskusne kemikalije je treba preskusiti v 4 jamicah. Vzorci se nato zmešajo na stresalniku za plošče in 16 ur inkubirajo pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>, nakar se izmeri luciferazna aktivnost, kot je opisano spodaj.
21. Kontrola s topilom je mešanica 50 µl/jamico X-VIVO™ 15 in 50 µl/jamico suspenzije celic v RPMI-1640, ki vsebuje 10 % FBS.
22. Priporočena pozitivna kontrola je 4-NBB. 20 mg 4-NBB se pripravi v 1,5-mililitrski mikrocentrifugirki, v katero se doda X-VIVO™ 15 do 1 ml. Epruveta se najmanj 30 minut energično meša in stresa na rotorju pri največji hitrosti 8 vrt/min. Po 5-minutnem centrifugiranju pri 20 000 g se supernatant razredči s faktorjem 4 z X-VIVO™ 15, 500 µl razredčenega supernatanta pa se prenese v jamico na 96-jamičnem preskusnem bloku. Razredčeni supernatant se nadalje razredči z X-VIVO™ 15 s faktorjema 2 in 4, 50 µl raztopine pa se doda 50 µl suspenzije celic THP-G8 v jamicah na črni 96-jamični plošči z ravnim dnom (Dodatek 3.6). Vsako koncentracijo pozitivne kontrole je treba preskusiti v 4 jamicah. Plošča se stresa na stresalniku za plošče in 16 ur inkubira v CO<sub>2</sub>-inkubatorju (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>), nakar se izmeri luciferazna aktivnost, kot je opisano v odstavku 29.
23. Priporočena negativna kontrola je LA. 20 mg LA se pripravi v 1,5-mililitrski mikrocentrifugirki, v katero se doda X-VIVO™ 15 do 1 ml (20 mg/ml). Raztopina z LA s koncentracijo 20 mg/ml se razredči s faktorjem 5 z X-VIVO™ 15 (4 mg/ml); 500 µl te raztopine z LA s koncentracijo 4 mg/ml se prenese na 96-jamični preskusni blok. Ta raztopina se razredči s faktorjem 2 z X-VIVO™ 15 in nato znova s faktorjem 2, da se dobijo raztopini 2 mg/ml in 1 mg/ml. 50 µl teh treh raztopin in kontrola z vehiklom (X-VIVO™ 15) se doda 50 µl suspenzije celic THP-G8 v jamicah na črni 96-jamični plošči z ravnim dnom. Vsako koncentracijo negativne kontrole je treba preskusiti v 4 jamicah. Plošča se stresa na stresalniku za plošče in 16 ur inkubira v CO<sub>2</sub>-inkubatorju (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>), nakar se izmeri luciferazna aktivnost, kot je opisano v odstavku 29.
24. Uporabijo se lahko tudi druge primerne pozitivne ali negativne kontrole, če so na voljo podatki iz preteklih preskusov za izpeljavo primerljivih meril za sprejemljivost ponovitev.
25. Paziti je treba, da hlapne preskusne kemikalije ne izhlapijo in da ne pride do navzkrižne kontaminacije med jamicami s preskusnimi kemikalijami, npr. z zatesnitvijo plošče pred inkubacijo s preskusnimi kemikalijami.

26. Za preskusne kemikalije in kontrolo s topilom so potrebne od 2 do 4 ponovitve, da se izpelje pozitivna ali negativna napoved (glej preglednico 2). Vsaka ponovitev se izvede na drug dan s svežo osnovno raztopino preskusnih kemikalij z X-VIVO™ 15 in neodvisno odvzetimi celicami. Celice lahko sicer izhajajo iz iste pasaže.

### **Meritve luciferazne aktivnosti**

27. Luminiscenca se meri z luminometrom za mikrotitrsko 96-jamično ploščo, opremljenim z optičnimi filtri, npr. Phelios (ATTO, Tokio, Japonska), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Nemčija) in serija ARVO (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, ZDA). Luminometer mora biti umerjen za vsak preskus, da se zagotovi obnovljivost (19). Za to umerjanje so na voljo rekombinantne luciferaze, ki oddajajo oranžno in rdečo svetlobo.
28. 100 µl predhodno segretega luciferaznega reagenta Tripluc® (Tripluc) se prenese v vsako jamico na plošči, ki vsebuje suspenzijo celic, tretirano s kemikalijo ali brez kemikalije. Plošča se stresa 10 minut pri sobni temperaturi približno 20 °C. Plošča se vstavi v luminometer, da se izmeri luciferazna aktivnost. Bioluminiscenca se meri po 3 sekunde v odsotnosti (F0) in prisotnosti (F1) optičnega filtra. Če se uporabijo drugačne nastavitve, npr. glede na uporabljeni model luminometra, jih je treba utemeljiti.
29. Parametri za vsako koncentracijo se izračunajo iz izmerjenih vrednosti, npr. IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, srednji  $\pm$ SD IL8LA, srednji  $\pm$ SD GAPLA, srednji  $\pm$ SD nIL8LA, srednji  $\pm$ SD Ind-IL8LA, srednji  $\pm$ SD Inh-GAPLA in 95-odstotni interval zaupanja za Ind-IL8LA. Opredelitve parametrov, uporabljenih v tem odstavku, so navedene v dodatkih I oziroma IV.
30. Pred meritvijo se običajno doseže barvno razlikovanje v večbarvnih poročevalskih poskusih z uporabo detektorjev (luminometer in čitalec plošče), opremljenih z optičnimi filtri, kot so ozko pasovno omejeni (dolgovalovni ali kratkovalovni prepustni) filtri ali pasovnoprepustni filtri. V skladu z Dodatkom 3.2 je treba koeficiente prepustnosti filtrov umeriti za vsako signalno barvo bioluminiscence.

## **PODATKI IN POROČANJE**

### **Ocenjevanje podatkov**

31. V skladu z merili za pozitivno/negativno odločitev je treba v vsaki ponovitvi:
- napoved preskusa IL-8 Luc oceniti kot pozitivno, če ima preskusna kemikalija Ind-IL8LA  $\geq 1,4$  in je spodnja meja 95-odstotnega intervala zaupanja Ind-IL8LA  $\geq 1,0$ ;
  - napoved preskusa IL-8 Luc oceniti kot negativno, če ima preskusna kemikalija Ind-IL8LA  $< 1,4$  in/ali je spodnja meja 95-odstotnega intervala zaupanja Ind-IL8LA  $< 1,0$ .

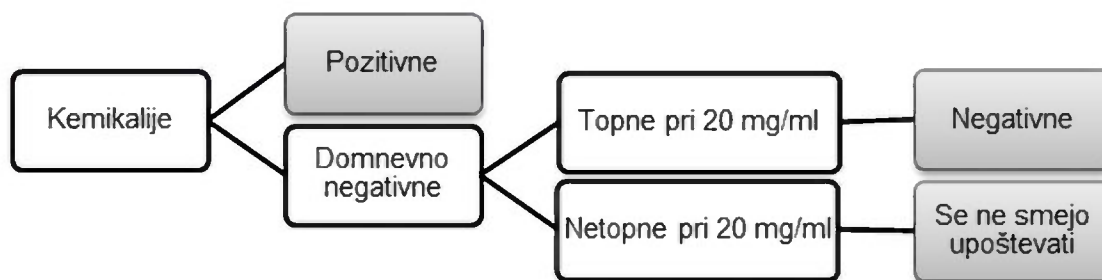
### Napovedni model

32. Preskusne kemikalije, ki dajo pri prvi, drugi, tretji ali četrti ponovitvi dva pozitivna rezultata, se opredelijo kot pozitivne, medtem ko se preskusne kemikalije, ki dajo pri prvi, drugi, tretji ali četrti ponovitvi tri negativne rezultate, opredelijo kot domnevno negativne (preglednica 2). Med domnevno negativnimi kemikalijami se kemikalije, ki se raztopijo pri 20 mg/ml X-VOVO™ 15, ocenijo kot negativne, medtem ko se kemikalije, ki se ne raztopijo pri 20 mg/ml X-VOVO™ 15, ne smejo upoštevati (slika 1).

**Preglednica 2:** Merila za opredelitev pozitivnih in domnevno negativnih kemikalij

| 1. ponovitev | 2. ponovitev | 3. ponovitev | 4. ponovitev | Končna napoved     |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------------|
| pozitivna    | pozitivna    | –            | –            | pozitivna          |
|              | negativna    | pozitivna    | –            | pozitivna          |
|              |              | negativna    | pozitivna    | pozitivna          |
|              |              |              | negativna    | domnevno negativna |
| negativna    | pozitivna    | pozitivna    | –            | pozitivna          |
|              |              | negativna    | pozitivna    | pozitivna          |
|              |              |              | negativna    | domnevno negativna |
|              | negativna    | pozitivna    | pozitivna    | pozitivna          |
|              |              |              | negativna    | domnevno negativna |
|              |              | negativna    | –            | domnevno negativna |

**Slika 1:** Napovedni model za končno oceno



### Merila za sprejemljivost

33. Pri uporabi preskusa IL-8 Luc morajo biti izpolnjena naslednja merila za sprejemljivost.

- Ind-IL8LA mora biti večji od 5,0 pri vsaj eni koncentraciji pozitivne kontrole, tj. 4-NBB, in to v vsaki ponovitvi.
- Ind-IL8LA mora biti manjši od 1,4 pri kateri koli koncentraciji negativne kontrole, tj. mlečne kisline, in to v vsaki ponovitvi.
- Podatke s plošč, za katere je GAPLA kontrolnih jamic s celicami in Triplucom, vendar brez kemikalij, manjši od 5-kratnika GAPLA jamice, ki vsebuje samo preskusno gojišče (50 µl/jamico RPMI-1640, ki vsebuje 10 % FBS, in 50 µl/jamico X-VIVO™ 15), je treba zavrniti.
- Podatke s plošč, za katere je Inh-GAPLA vseh koncentracij preskusnih ali kontrolnih kemikalij manjši od 0,05, je treba zavrniti. V takem primeru je treba prvi preskus ponoviti, tako da je najvišja končna koncentracija ponovljenega preskusa najnižja končna koncentracija prejšnjega preskusa.

### **Poročilo o preskusu**

34. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

#### *Preskusne kemikalije*

Snov iz ene sestavine:

- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;
- fizični videz, topnost v vodi, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo;
- čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
- topnost v X-VIVO™ 15. Za kemikalije, ki niso topne v X-VIVO™ 15, ali sta po centrifugiranju ugotovljena obarvanje ali flotacija;
- preskušene koncentracije;
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;
- utemeljitev izbire topila/vehikla za vsako preskusno kemikalijo, če X-VIVO™ 15 ni bil uporabljen.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

- čim obsežnejša opredelitev lastnosti, na primer s kemijsko identiteto (glej zgoraj), čistostjo, kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi (glej zgoraj) sestavin, če so na voljo;
- fizični videz, topnost v vodi in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo;
- molekulska masa ali navidezna molekulska masa v primeru zmesi/polimerov z znano sestavo ali drugi podatki, pomembni za izvedbo študije;
- obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
- topnost v X-VIVO™ 15. Za kemikalije, ki niso topne v X-VIVO™ 15, ali sta po centrifugiranju ugotovljena obarjanje ali flotacija;
- preskušene koncentracije;
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;
- utemeljitev izbire topila/vehikla za vsako preskusno kemikalijo, če X-VIVO™ 15 ni bil uporabljen.

#### *Kontrole*

##### Pozitivna kontrola:

- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;
- fizični videz, topnost v vodi, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo in če je ustrezno;
- čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
- preskušene koncentracije;
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;
- sklicevanje na rezultate pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov, ki kažejo ustrezna merila za sprejemljivost ponovitev, če je to ustrezno.

##### Negativna kontrola:

- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS in/ali drugi identifikatorji;
- čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;

- fizični videz, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če se uporabijo druge negativne kontrole razen tistih, ki so navedene v smernici za preskušanje, in če so na voljo;
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;
- utemeljitev izbire topila za vsako preskusno kemikalijo.

*Preskusni pogoji:*

- ime in naslov naročnika, preskuševalnega laboratorija in vodje študije;
- opis uporabljenega preskusa;
- uporabljena celična linija, pogoji njenega hranjenja in vir (npr. laboratorij, ki jo je zagotovil);
- številka serije in izvor FBC, ime dobavitelja, številka serije črne 96-jamične plošče z ravnim dnom ter številka serije reagenta Tripluc;
- število pasaj in gostota celic, uporabljenih za preskušanje;
- metoda štetja celic, uporabljena za nasaditev pred preskušanjem, in ukrepi, sprejeti za zagotovitev homogene porazdelitve števila celic;
- uporabljeni luminometer (npr. model), vključno z nastavitvami instrumenta, uporabljenim substratom luciferaze in prikazom ustreznih meritev luminiscence, ki temeljijo na kontrolnem preskusu, opisanem v Dodatku 3.2;
- postopek, uporabljen za dokazovanje usposobljenosti laboratorija v zvezi z izvedbo preskusa (npr. s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti) ali za prikaz ponovljivosti izvedbe preskusa v daljšem časovnem obdobju.

*Preskusni postopek:*

- število ponovljenih vzorcev in izvedenih ponovitev;
- uporabljene koncentracije preskusnih kemikalij, postopek dodajanja in čas izpostavljenosti (če so drugačni od priporočenih);
- opis uporabljenih meril za ocenjevanje in odločitev;
- opis uporabljenih meril za sprejemljivost študije;
- opis vseh prilagoditev preskusnega postopka.

*Rezultati:*

- meritve IL8LA in GAPLA;
- izračuni za nIL8LA, Ind-IL8LA in Inh-GAPLA;

- 95-odstotni interval zaupanja Ind-IL8LA;
- graf, ki prikazuje krivulje odziva na odmere za indukcijo luciferazne aktivnosti in viabilnost;
- opis kakršnih koli drugih pomembnih opažanj, če je ustrezno.

*Razprava o rezultatih:*

- razprava o rezultatih, pridobljenih s preskusom IL-8 Luc;
- obravnavanje rezultatov preskusa v okviru IATA, če so na voljo druge pomembne informacije.

*Sklepna ugotovitev*

## VIRI

- (1) Takahashi, T., Kimura, Y., Saito, R., Nakajima, Y., Ohmiya, Y., Yamasaki, K., in 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 (št. 267), ENV/JM/MONO(2017)19. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na: <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 (št. 258), ENV/JM/MONO(2017)20. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na: <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 (št. 256), ENV/JM/MONO(2016)29. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (5) van der Veen, J. W., Rorije, E., Emter, R., Natsch, A., van Loveren, H., in 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., in Aiba, S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 29:1816-30.
- (7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P. S., Gerberick, F., et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol* 71:337-51.
- (8) Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., Kosaka, N., Ishikawa, M., Nukada, Y., Miyazawa, M., Ito, Y., Nishiyama, N., in Itagaki, H. (2010). A



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

- (9) Patlewicz, G., Casati, S., Basketter, D. A., Asturiol, D., Roberts, D. W., Lepoittevin, J.-P., Worth, A., in 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., in Auld, D. S. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.
- (11) OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Pariz. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en>.
- (12) Viviani, V., Uchida, A., Suenaga, N., Ryufuku, M., in Ohmiya, Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286-91.
- (13) Viviani, V. R., Bechara, E. J., in 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., in 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). Še ni objavljeno – 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, Pariz, Francija.
- (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 (št. 34). OECD, Pariz, Francija.
- (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. Organizacija za gospodarsko

- sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na:  
[http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD\\_Final\\_Draft\\_GIVIMP.pdf](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf).
- (18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, na voljo na:  
[http://www.jacvam.jp/en\\_effort/effort02.html](http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html).
- (19) Niwa, K., Ichino, Y., Kumata, S., Nakajima, Y., Hiraishi, Y., Kato, D., Viviani, V. R., in 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 (št. 168). OECD, Pariz, Francija.
- (21) Združeni narodi (2015). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS). Šesta revidirana izdaja. New York in Ženeva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Na voljo na:  
[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev05/05files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html).

### Dodatek 3.1

#### OPREDELITVE POJMOV

**Točnost:** stopnja ujemanja rezultatov preskusa s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusa in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz skladnost se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusa (16).

**Potek neželenega izida (Adverse Outcome Pathway – AOP):** zaporedje dogodkov od kemijske strukture ciljne kemikalije ali skupine podobnih kemikalij prek začetnega dogodka na molekularni ravni do preiskovanega rezultata *in vivo* (20).

**Kemikalija:** snov ali zmes.

**CV05:** viabilnost celic 05, tj. najmanjša koncentracija, pri kateri je Inh-GAPLA kemikalij manjša od 0,05.

**FInSLO-LA:** kratica, uporabljena v validacijskem poročilu in prejšnjih publikacijah v zvezi s preskusom IL-8 Luc za sklicevanje na Ind-IL8LA. Glej Ind-IL8LA za opredelitev pojma.

**GAPLA:** luciferazna aktivnost stabilne luciferaze rdeča (SLR) ( $\lambda_{\text{maks.}} = 630 \text{ nm}$ ), ki jo regulira promotor GAPDH ter izkazuje viabilnost celic in število viabilnih celic.

**Nevarnost:** neločljiva lastnost sredstva ali stanje, ki lahko ob izpostavljenosti temu sredstvu povzroči neželen učinek na organizem, sistem ali (pod)populacijo.

**IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment = celostni pristop k testiranju in ocenjevanju):** strukturiran pristop, ki se uporablja za ugotavljanje nevarnosti (potencial), opredeljevanje nevarnosti (moč) in/ali oceno varnosti (potencial/moč in izpostavljenost) kemikalije ali skupine kemikalij ter strateško zajame in oceni vse pomembne podatke, da se lahko sprejme regulativna odločitev v zvezi z morebitno nevarnostjo in/ali tveganjem in/ali potrebo po nadaljnjem, ciljno usmerjenem in s tem minimalnem preskušanju.

**II-SLR-LA:** kratica, uporabljena v validacijskem poročilu in prejšnjih publikacijah v zvezi s preskusom IL-8 Luc za sklicevanje na Inh-GAPLA. Glej Inh-GAPLA za opredelitev pojma.

**IL-8 (interlevkin-8):** citokin, ki izhaja iz endotelijskih celic, fibroblastov, keratinocitov, makrofagov in monocitov ter povzroča kemotakso nevtrofilcev in limfocitov T.

**IL8LA:** luciferazna aktivnost stabilne luciferaze oranžna (SLO) ( $\lambda_{\text{maks.}} = 580 \text{ nm}$ ), ki jo regulira promotor IL-8.

**Ind-IL8LA:** stopnja indukcije IL8LA. Dobi se z delitvijo nIL8LA celic THP-G8, tretiranih s kemikalijami, z nIL8LA nestimuliranih celic THP-G8 in predstavlja indukcijo aktivnosti promotorja IL-8 s strani kemikalij.

**Inh-GAPLA:** inhibicija GAPLA. Dobi se z delitvijo GAPLA celic THP-G8, tretiranih s kemikalijami, z GAPLA netretiranih celic THP-G8 in predstavlja citotoksičnost kemikalij.

**Najnižji prag indukcije (MIT):** najnižja koncentracija, pri kateri kemikalija izpolnjuje pozitivna merila.

**Zmes:** zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi.

**Snov iz ene sestavine:** snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je vsaj 80 mas. % glavne sestavine.

**Snov z več sestavinami:** snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je več glavnih sestavin s koncentracijo  $\geq 10$  mas. % in  $< 80$  mas. %. Snov z več sestavinami je rezultat proizvodnega postopka. Razlika med zmesjo in snovjo z več sestavinami je v tem, da je zmes pridobljena z mešanjem dveh ali več snovi brez kemične reakcije. Snov z več sestavinami je rezultat kemične reakcije.

**nIL8LA:** aktivnost luciferaze SLO, ki izraža aktivnost promotorja IL-8 (IL8LA), normalizirana z aktivnostjo luciferaze SLR, ki izraža aktivnost promotorja GAPDH (GAPLA). Predstavlja aktivnost promotorja IL-8 po upoštevanju viabilnosti celic ali števila celic.

**nSLO-LA:** kratica, uporabljena v validacijskem poročilu in prejšnjih publikacijah v zvezi s preskusom IL-8 Luc za sklicevanje na nIL8LA. Glej nIL8LA za opredelitev pojma.

**Pozitivna kontrola:** ponovljen vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s snovjo, za katero je znano, da povzroči pozitiven odziv. Za zagotovitev, da se lahko variabilnost odziva pozitivne kontrole oceni v daljšem časovnem obdobju, pa stopnja pozitivnega odziva ne sme biti previsoka.

**Prehapteni:** kemikalije, ki postanejo povzročitelji preobčutljivosti kože z abiotsko pretvorbo.

**Prohapteni:** kemikalije, ki potrebujejo encimsko aktivacijo, da bi uresničevale potencial za povzročanje preobčutljivosti kože.

**Ustreznost:** opis razmerja med preskusom in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere preskus pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Pri ustreznosti se upošteva tudi točnost (skladnost) preskusa (16).

**Zanesljivost:** stopnja obnovljivosti preskusa v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih in interne laboratorijske ponovljivosti (16).

**Ponovitev:** ponovitev zajema eno ali več preskusnih kemikalij, preskušanih sočasno s kontrolo s topilom/vehiklom in pozitivno kontrolo.

**Občutljivost:** delež vseh pozitivnih/aktivnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskus, s katerim se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusa (16).

**SLO-LA:** kratica, uporabljena v validacijskem poročilu in prejšnjih publikacijah v zvezi s preskusom IL-8 Luc za sklicevanje na IL8LA. Glej IL8LA za opredelitev pojma.

**SLR-LA:** kratica, uporabljena v validacijskem poročilu in prejšnjih publikacijah v zvezi s preskusom IL-8 Luc za sklicevanje na GAPLA. Glej GAPLA za opredelitev pojma.

**Kontrola s topilom/vehiklom:** netretiran vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema razen preskusne kemikalije, vključuje pa topilo/vehikel, ki se uporabi. Uporablja se za določanje izhodiščnega odziva za vzorce, tretirane s preskusno kemikalijo, raztopljeno ali stabilno dispergirano v istem topilu/vehiklu. Pri preskušanju s sočasno kontrolo z gojiščem ta vzorec tudi pokaže, ali topilo/vehikel reagira s preskusnim sistemom.

**Specifičnost:** delež vseh negativnih/neaktivnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskus, s katerim se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusa (16).

**Snov:** kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo.

**Površinsko aktivna snov:** snov, kot je detergent, ki lahko zmanjša površinsko napetost tekočine in tako omogoči, da se speni ali prodre v trdne snovi; znana je tudi kot omakalno sredstvo. (TG437)

**Preskusna kemikalija:** vsaka snov ali zmes, preskušena z uporabo te metode.

**THP-G8:** reporterska celična linija IL-8, uporabljena v preskusu IL-8 Luc. Humana makrofagna celična linija THP-1 je bila transfecirana z luciferaznima genom SLO in SLR pod kontrolo promotorjev IL-8 oziroma GAPDH.

**Globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN):** sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudje (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (21).

**UVCB:** snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

**Veljavna preskusna metoda:** preskus, ki se obravnava kot dovolj ustrezen in zanesljiv za določen namen ter temelji na znanstveno utemeljenih načelih. Preskus ni nikoli veljaven v absolutnem smislu, ampak samo v zvezi z opredeljenim namenom.

### Dodatek 3.2

#### **NAČELO MERITVE LUCIFERAZNE AKTIVNOSTI IN DOLOČITEV KOEFICIENTOV PREPUSTNOSTI OPTIČNEGA FILTRA ZA SLO IN SLR**

MultiReporter Assay System – Tripluc se lahko uporabi z luminometrom za mikrotitrne plošče z večbarvnim sistemom zaznavanja, s katerim je lahko opremljen optični filter (npr. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). Optični filter, ki se uporabi pri meritvi, je 600–620-nanometrski dolgovalovni ali kratkovalovni prepustni filter ali 600–700-nanometrski pasovnoprepustni filter.

#### **Meritev dvobarvnih luciferaz z optičnim filtrom**

To je primer uporabe filtra Phelios AB-2350 (ATTO). Ta luminometer je opremljen s 600-nanometrskim dolgovalovnim prepustnim filtrom (R60 HOYA Co., 600 nm LP, filter 1) za razdelitev luminiscence SLO ( $\lambda_{\text{maks.}} = 580 \text{ nm}$ ) in SLR ( $\lambda_{\text{maks.}} = 630 \text{ nm}$ ).

Za določitev koeficientov prepustnosti 600-nanometriškega LP se najprej z uporabo prečiščenih luciferaznih encimov SLO in SLR izmeri (i) intenziteta bioluminiscence SLO in SLR brez filtra (F0), (ii) intenziteta bioluminiscence SLO in SLR pri prehodu čez 600-nanometrski LP (filter 1) in (iii) izračunata koeficienta prepustnosti 600-nanometriškega LP za SLO in SLR, navedena spodaj.

| Transmission coefficients |                                          | Abbreviation     | Definition                                        |
|---------------------------|------------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------|
| SLO                       | Filter 1<br>Transmission<br>coefficients | $\kappa O_{R60}$ | The filter's transmission coefficient for the SLO |
| SLR                       | Filter 1<br>Transmission<br>coefficients | $\kappa R_{R60}$ | The filter's transmission coefficient for the SLR |

Kadar je intenziteta SLO in SLR v preskusnem vzorcu opredeljena kot O oziroma R, se (i) intenziteta svetlobe brez filtra (vse optično) F0 in (ii) intenziteta svetlobe, ki prehaja skozi 600-nanometrski LP (filter 1) F1, opišeta, kot je navedeno spodaj.

$$F0 = O + R$$

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

Ti formuli je mogoče zapisati tudi tako:

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

Z uporabo izračunanih faktorjev prepustnosti ( $\kappa O_{R60}$  in  $\kappa R_{R60}$ ) ter izmerjenih F0 in F1 se lahko nato vrednost O in R izračuna tako:

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

## Materiali in metode za določitev faktorja prepustnosti

### (1) Reagenti

Enkratna prečiščena encima luciferaze:

lioofilizirani prečiščeni encim SLO

lioofilizirani prečiščeni encim SLR

(ki sta bila za validacijsko delo pridobljena od GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonska, s celično linijo THP-G8)

Preskusni reagent:

luciferazni reagent Tripluc® (na primer iz TOYOBO Cat#MRA-301)

Gojišče: za luciferazni preskus (30 ml, shranjeno pri od 2 do 8 °C)

| Reagent   | Konc. | Končna konc.<br>v gojišču | Potrebna<br>količina |
|-----------|-------|---------------------------|----------------------|
| RPMI-1640 | –     | –                         | 27 ml                |
| FBS       | –     | 10 %                      | 3 ml                 |

### (2) Priprava encimske raztopine

Liofilizirani prečiščeni encim luciferaze raztopite v epruveti, tako da dodate 200 µl 10~100 mM Tris/HCl ali Hepes/HCl (pH 7,5~8,0) z dodatkom 10 % (w/v) glicerola, encimsko raztopino razdelite na 10-mikrolitrskale alikvote v 1,5-mililitrske epruvete za enkratno uporabo ter jih shranite v zamrzovalniku pri –80 °C. Zamrznjena encimska raztopina je uporabna do 6 mesecev. Ob uporabi dodajte 1 ml gojišča za luciferazni preskus (RPMI-1640 z 10 % FBS) v vsako epruveto, v kateri je encimska raztopina (razredčena encimska raztopina), in jih hranite na hladnem, da preprečite deaktivacijo.

### (3) Meritev bioluminiscence

Luciferazni reagent Tripluc® (Tripluc) odtajajte in ga hranite pri sobni temperaturi bodisi v vodni kopeli bodisi pri temperaturi zraka okolice. Luminometer vključite 30 minut pred začetkom meritve, da omogočite stabilizacijo fotopomnoževalnika. 100 µl razredčene encimske raztopine prenesite na črno 96-jamično ploščo (ravno dno) (referenčni vzorec SLO na #B1, #B2, #B3, referenčni vzorec SLR na #D1, #D2, #D3).



Nato s pipetmanom prenesite 100 µl predhodno segretega reagenta Tripluc v vsako jamico na plošči, ki vsebuje razredčeno encimsko raztopino. Ploščo s stresalnikom plošč 10 minut stresajte pri sobni temperaturi (približno 25 °C). Iz raztopin v jamicah odstranite mehurčke, če se pojavijo. Ploščo vstavite v luminometer, da se izmeri luciferazna aktivnost. Bioluminiscenca se meri po 3 sekunde v odsotnosti (F0) in prisotnosti (F1) optičnega filtra.

Koeficient prepustnosti optičnega filtra je bil izračunan tako:

koeficient prepustnosti (SLO ( $\kappa_{O_{R60}}$ )) =  $(\#B1 \text{ F1} + \#B2 \text{ F1} + \#B3 \text{ F1}) / (\#B1 \text{ F0} + \#B2 \text{ F0} + \#B3 \text{ F0})$

koeficient prepustnosti (SLR ( $\kappa_{R_{60}}$ )) =  $(\#D1 \text{ F1} + \#D2 \text{ F1} + \#D3 \text{ F1}) / (\#D1 \text{ F0} + \#D2 \text{ F0} + \#D3 \text{ F0})$

Izračunani faktorji prepustnosti se uporabijo za vse meritve, izvedene z istim luminometrom.

### **Nadzor nad kakovostjo opreme**

Uporabiti je treba postopke, opisane v protokolu IL-8 Luc (18).

**Dodatek 3.3****SNOVI ZA PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI**

Pred redno uporabo preskusa, opisanega v tem dodatku k preskusni metodi B.71, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost tako, da pridobijo napovedi preskusa IL-8 Luc, pričakovane za 10 snovi, ki so priporočene v preglednici 1, ter vrednosti, ki so za vsaj 8 od 10 snovi za preverjanje usposobljenosti (izbranih za predstavljanje območja odzivov za nevarnosti za preobčutljivost kože) v ustreznem referenčnem območju. Druga merila za izbiro so bila razpoložljivost snovi na trgu, razpoložljivost visokokakovostnih referenčnih podatkov *in vivo* in razpoložljivost visokokakovostnih podatkov *in vitro*, pridobljenih s preskusom IL-8 Luc. Za preskus IL-8 Luc so na voljo tudi objavljeni referenčni podatki (6) (1).

**Preglednica 1:** Priporočene snovi za dokazovanje tehnične usposobljenosti za poskus IL-8 Luc

| Snovi za preverjanje usposobljenosti | Št. CAS   | Stanje     | Topnost<br>v<br>X-<br>VIVO15<br>pri<br>20 mg/ml | Napoved <i>in vivo</i> <sup>1</sup>           | Napoved<br>IL-8 Luc <sup>2</sup> | Referenčno območje<br>(µg/ml) <sup>3</sup> |                           |
|--------------------------------------|-----------|------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------|
|                                      |           |            |                                                 |                                               |                                  | CV05 <sup>4</sup>                          | MIT IL-8 Luc <sup>5</sup> |
| 2,4-dinitroklorobenzen               | 97-00-7   | trdna snov | netopen                                         | povzročitelj preobčutljivosti (izjemno močen) | pozitivna                        | 2,3–3,9                                    | 0,5–2,3                   |
| formaldehid                          | 50-00-0   | tekočina   | topen                                           | povzročitelj preobčutljivosti (močen)         | pozitivna                        | 9–30                                       | 4–9                       |
| 2-merkaptobenzotiazol                | 149-30-4  | trdna snov | netopen                                         | povzročitelj preobčutljivosti (zmeren)        | pozitivna                        | 250–290                                    | 60–250                    |
| etilendiamin                         | 107-15-3  | tekočina   | topen                                           | povzročitelj preobčutljivosti (zmeren)        | pozitivna                        | 500–700                                    | 0,1–0,4                   |
| etilenglikol dimetakrilat            | 97-90-5   | tekočina   | netopen                                         | povzročitelj preobčutljivosti (šibek)         | pozitivna                        | > 2 000                                    | 0,04–0,1                  |
| 4-alilanzol (estragol)               | 140-67-0  | tekočina   | netopen                                         | povzročitelj preobčutljivosti (šibek)         | pozitivna                        | > 2 000                                    | 0,01–0,07                 |
| streptomycin sulfat                  | 3810-74-0 | trdna snov | topen                                           | ne povzroča preobčutljivosti                  | negativna                        | > 2 000                                    | > 2 000                   |
| glicerol                             | 56-81-5   | tekočina   | topen                                           | ne povzroča preobčutljivosti                  | negativna                        | > 2 000                                    | > 2 000                   |
| izopropanol                          | 67-63-0   | tekočina   | topen                                           | ne povzroča preobčutljivosti                  | negativna                        | > 2 000                                    | > 2 000                   |

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov.

<sup>1</sup> Moč *in vivo* se izpelje s pomočjo meril, ki jih je predlagal ECETOC (19).

<sup>2</sup> Na podlagi ugotovljenih vrednosti iz preteklih preskusov (1) (6).

<sup>3</sup> CV05 in MIT IL-8 Luc sta bila izračunana z uporabo topnosti v vodi, pridobljeno z EPI Suite™.

<sup>4</sup> CV05: najnižja koncentracija, pri kateri je Inh-GAPLA kemikalij manjša od 0,05.

<sup>5</sup> MIT: najnižje koncentracije, pri katerih kemikalija izpolnjuje pozitivna merila.

### Dodatek 3.4

## INDEKSI IN MERILA ZA PRESOJO

### nIL8LA (nSLO-LA)

J-ta ponovitev ( $j = 1-4$ ) i-te koncentracije ( $i = 0-11$ ) se izmeri za IL8LA (SLO-LA) oziroma GAPLA (SLR-LA). Normalizirana IL8LA, navedena kot nIL8LA (nSLO-LA), je opredeljena kot:

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

To je osnovna merska enota v tem preskusu.

### Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Primarno merilo tega preskusa je stopnja povečanja povprečne nIL8LA (nSLO-LA) za ponovitev pri i-ti koncentraciji v primerjavi z njo pri koncentraciji 0, tj. Ind-IL8LA. To razmerje je zapisano z naslednjo formulo:

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

Vodilni laboratorij je predlagal, naj vrednost 1,4 ustreza pozitivnemu rezultatu za preskusno kemikalijo. Ta vrednost temelji na preiskavi preteklih podatkov vodilnega laboratorija. Ekipa za upravljanje podatkov je nato to vrednost uporabila v vseh fazah validacijske študije. Glavni rezultat, Ind-IL8LA, je razmerje dveh aritmetičnih sredin, kot je prikazano v enačbi.

### 95-odstotni interval zaupanja (95 % CI)

Za 95-odstotni interval zaupanja (95 % CI), ki temelji na razmerju, se lahko šteje, da prikazuje natančnost tega primarnega merila izida. Spodnja meja 95 % CI  $\geq 1$  kaže, da je nIL8LA pri i-ti koncentraciji bistveno večja kot pri kontroli s topilom. 95 % CI je mogoče oblikovati na več načinov. V tej študiji smo uporabili metodo, znano kot Fiellerjev teorem. Ta teorem 95-odstotnega intervala zaupanja izhaja iz naslednje formule:

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

pri čemer je:

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

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

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

$t_{0.975(v)}$  97,5 percentila osrednje t-porazdelitve z  $v$  stopnjo svobode, pri čemer je

$$v = \left( \frac{\text{sd}_0^2}{n_0} + \frac{\text{sd}_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / \left\{ \left( \frac{\text{sd}_0^2}{n_0} \right)^2 / (n_0 - 1) + \left( \frac{\text{sd}_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

### Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

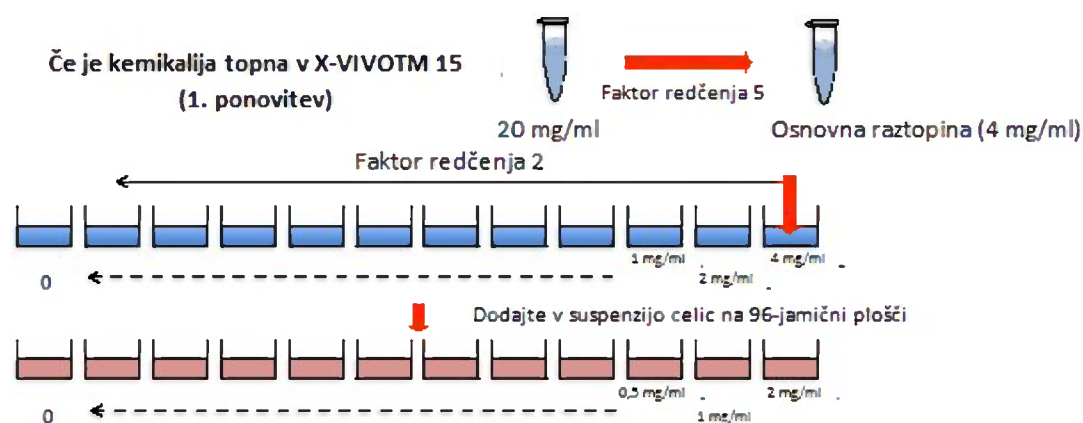
Inh-GAPLA je razmerje med povprečno GAPLA (SLR-LA) za ponovitev pri  $i$ -ti koncentraciji in povprečno GAPLA pri kontroli s topilom, ki se zapiše tako:

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

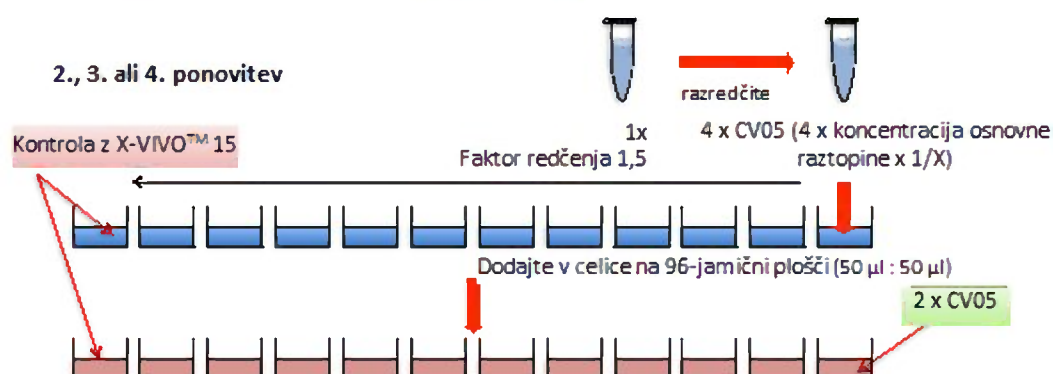
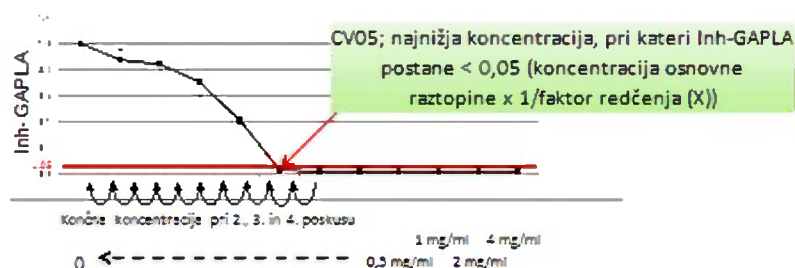
Ker je GAPLA imenovalec nIL8LA, zelo majhna vrednost povzroči veliko spremembo v nIL8LA. Zato se lahko vrednosti Ind-IL8LA z zelo majhno vrednostjo Inh-GAPLA (manj kot 0,05) štejejo za nenatančne.

**Dodatek 3.5****SHEMA METOD ZA RAZTOPITEV KEMIKAJIJ ZA PRESKUS IL-8 LUC**

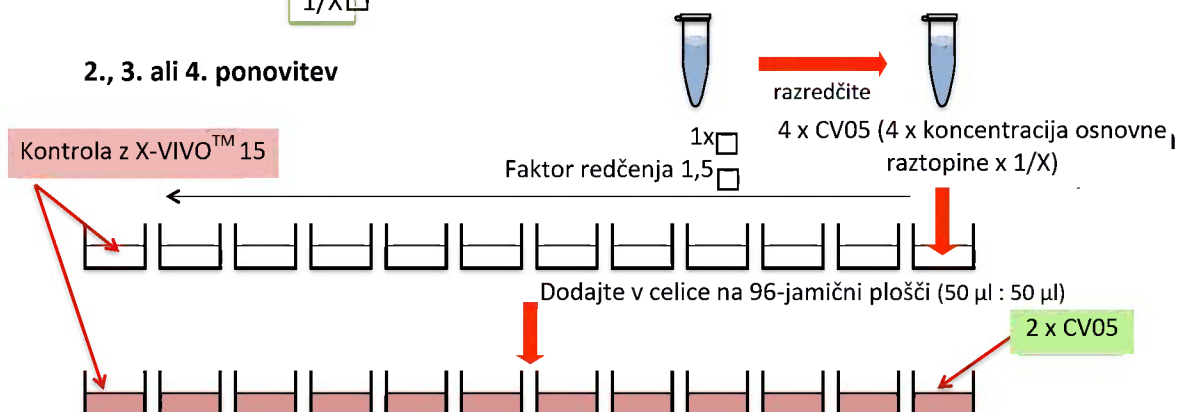
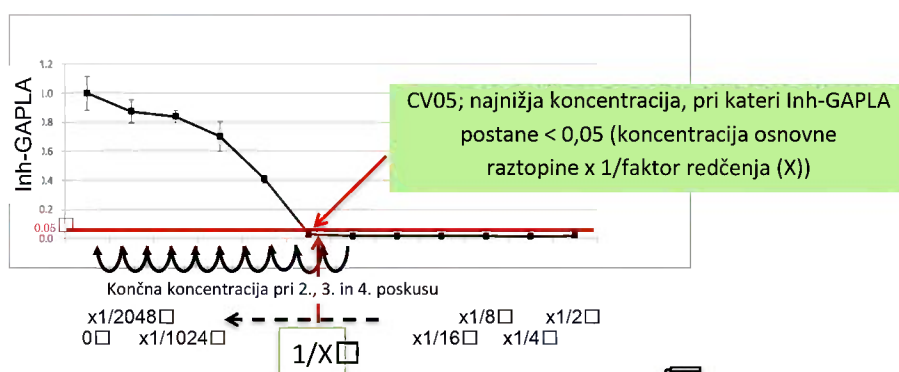
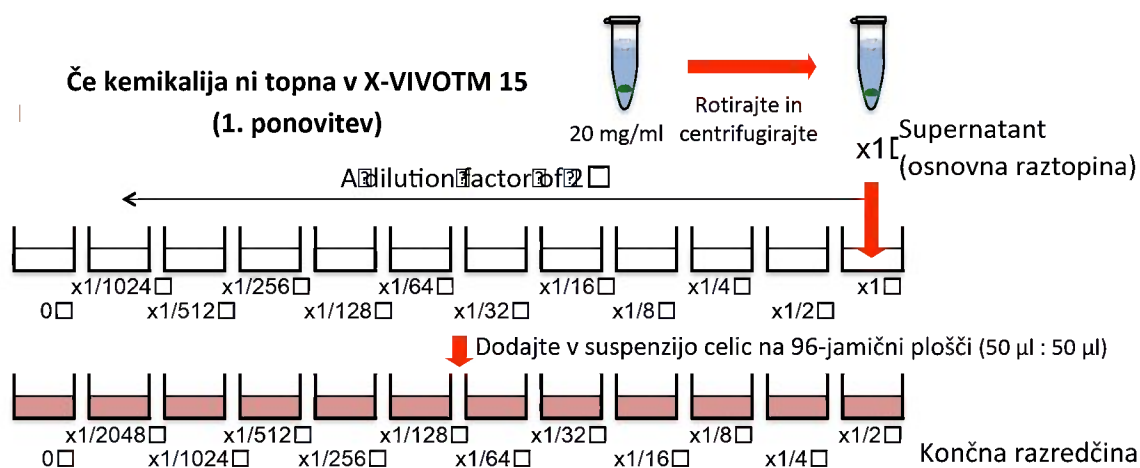
(a) Za kemikalije, raztopljene v X-VIVO™ 15 pri 20 mg/ml



Določite najvišjo koncentracijo naslednjih poskusov

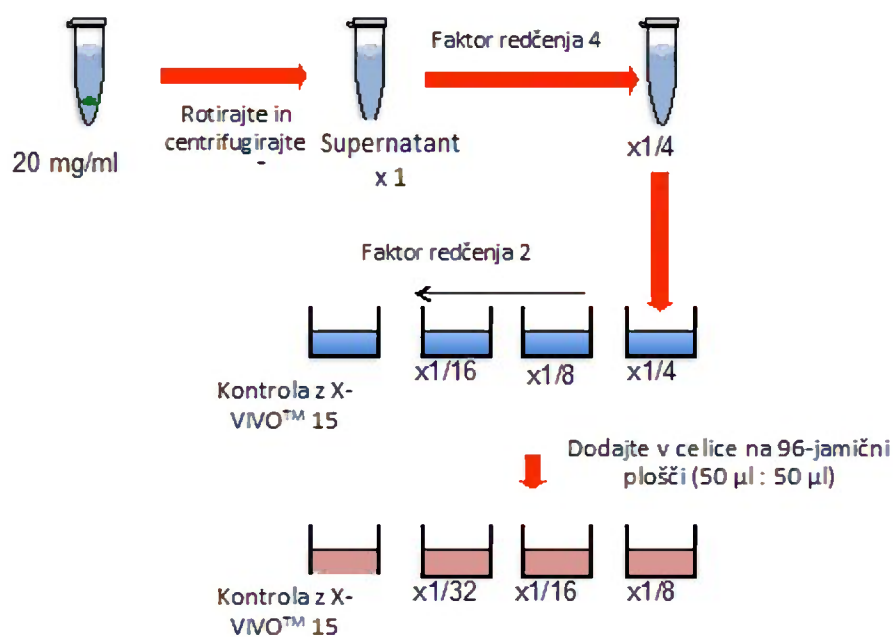


(b) Za kemikalije, ki niso topne v X-VIVO™ 15 pri 20 mg/ml



**Dodatek 3.6****SHEMA METODE ZA RAZTOPITEV 4-NBB ZA POZITIVNO KONTROLO PRESKUSA IL-8 LUC**

Pozitivna kontrola: 4-NBB (netopen v X-VIVO™ 15)



“



(9) V delu C se dodata naslednji poglavji:

## **„C.52 RAZŠIRJENI ENOGENERACIJSKI PRESKUS RAZMNOŽEVANJA MEDAKE (MEOGRT)**

### **UVOD**

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 240 (2015). Razširjeni enogeneracijski preskus razmnoževanja medake (Medaka Extended One Generation Test, MEOGRT) opisuje izčrpno preskusno metodo, temelječo na ribah, izpostavljenih v več generacijah, za pridobitev podatkov, pomembnih za ekološko nevarnost in oceno tveganja kemikalij, vključno z domnevnimi endokrinimi motilci (endocrine disrupting chemicals, EDC). Izpostavljenost pri preskusu MEOGRT traja do izvalitve (do dveh tednov po oploditvi, tpo) v drugi generaciji (F2). Za utemeljitev koristnosti razširitve generacije F2 na čas po izvalitvi bi bile potrebne dodatne raziskave; trenutno pa ni dovolj informacij za zagotovitev ustreznih pogojev ali meril za utemeljitev razširitve generacije F2. Ta preskusna metoda bo sicer lahko posodobljena, ko se bodo upoštevale nove informacije in podatki. Na primer smernice o razširitvi generacije F2, tako da bi bilo vključeno razmnoževanje, bodo lahko koristne v nekaterih okoliščinah (npr. pri kemikalijah z velikim biokoncentracijskim potencialom ali znakovnih čezgeneracijskih učinkov pri drugih taksonih). Ta preskusna metoda se lahko uporabi za oceno morebitnih kroničnih učinkov kemikalij, vključno s potencialnimi endokrinimi motilci, na ribe. Glavni poudarek te metode je na morebitnih učinkih, pomembnih za populacijo (tj. škodljivih učinkih na preživetje, razvoj, rast in razmnoževanje), za izračun koncentracije brez opaznega učinka (NOEC) ali učinkovite koncentracije (ECx), čeprav je treba navesti, da so pristopi z ECx redko primerni za tovrstne velike študije, pri katerih bo morda povečanje števila preskusnih koncentracij, da bi se omogočila določitev zelene ECx, neizvedljivo in lahko tudi povzroči precejšnje pomisleke glede dobrobiti živali zaradi velikega števila uporabljenih živalih. Za kemikalije, pri katerih ni potrebna ocena v ‚več generacijah‘, ali kemikalije, ki niso potencialni endokrini motilci, bodo morda ustreznejše druge preskusne metode (1). Ustrezna vrsta za uporabo v tej preskusni metodi je japonska medaka zaradi kratkega življenjskega cikla in možnosti določitve njenega genetskega spola (2), ki se v tej preskusni metodi šteje za kritično komponento. Posebne metode in opazovane končne točke, ki so podrobno navedene pri tej metodi, se uporabljajo samo za japonsko medako. Podobnemu preskusnemu protokolu se lahko prilagodijo druge vrste majhnih rib (npr. cebraica).
2. S to preskusno metodo se meri več bioloških končnih točk. Prvotni poudarek je na morebitnih škodljivih učinkih na parametre, pomembne za populacijo, ki vključujejo preživetje, razvoj, rast in razmnoževanje. Drugič, da se zagotovijo mehanistični podatki in

povezava z rezultati iz drugih vrst terenskih in laboratorijskih študij, kadar obstajajo naknadni dokazi, da je kemikalija potencialni endokrini motilec (npr. androgeno ali estrogeno delovanje iz drugih preskusov in poskusov), se druge koristne informacije pridobijo z merjenjem mRNK *vitelogenina* (*vtg*) (ali proteina vitelogenin, VTG), fenotipskih sekundarnih spolnih značilnosti (SSZ), kot so povezane z genetskim spolom, in histopatološko oceno. Opozoriti je treba, da če za preskusno kemikalijo ali njene metabolite ne obstaja sum, da so EDC, morda ne bo treba izmeriti teh sekundarnih končnih točk, zato bodo morda primernejše študije, za katere bo potrebnih manj virov in manj živali (1). Pojmi, uporabljeni v tej preskusni metodi, so opredeljeni v Dodatku 1.

### ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

3. Zaradi omejenega števila preskušanih kemikalij in laboratorijev, vključenih v validacijo tega razmeroma kompleksnega preskusa, se predvideva, da bo preskusna metoda pregledana in po potrebi spremenjena glede na pridobljene izkušnje, ko bo na voljo zadostno število študij za potrditev učinka tega novega koncepta študije. Podatki se lahko uporabijo na ravni 5 temeljnega okvira OECD za preskušanje in ocenjevanje endokrinih motilcev (OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters) (3). Preskusna metoda se začne z izpostavitvijo odraslih rib (generacija F0) preskusni kemikaliji v fazi razmnoževanja. Izpostavljenost se nadaljuje med razvojem in razmnoževanjem v generaciji F1 in izvalitvijo v generaciji F2; preskus tako omogoča oceno strukturnih in aktivacijskih endokrinih poti. Pri razlagi končnih točk, povezanih z endokrinim sistemom, se lahko uporabi pristop, ki temelji na zanesljivosti dokazov.
4. V preskus mora biti vključeno zadostno število osebkov, da se zagotovi zadostna moč za oceno končnih točk, pomembnih za razmnoževanje (glej Dodatek 3), obenem pa je treba poskrbeti, da je zaradi dobrobiti živali uporabljeno najmanjše potrebno število živali. Glede na veliko število uporabljenih preskusnih živali je pomembno, da se skrbno presodi potreba po preskusu glede na obstoječe podatke, ki že lahko vsebujejo ustrezne informacije o številnih končnih točkah preskusa MEOGRT. Določeno pomoč v zvezi s tem je mogoče najti v okviru OECD za preskušanje toksičnosti za ribe (OECD Fish Toxicity Testing Framework) (1).
5. Preskusna metoda je bila oblikovana predvsem za prepoznavanje učinkov posamezne snovi. Če pa je potreben preskus zmesi, je treba preučiti, ali bo zagotovil sprejemljive rezultate za predvideni regulativni namen.
6. Pred začetkom preskusa je pomembno imeti informacije o fizikalno-kemijskih lastnostih preskusne kemikalije, zlasti da se omogoči priprava stabilnih raztopin kemikalije. Prav tako je treba imeti ustrezno občutljivo analitsko metodo za preverjanje koncentracij preskusne kemikalije.

## NAČELO PRESKUSA

7. Preskus se začne s tritedensko izpostavitvijo spolno zrelih samcev in samic (najmanj 12 tpo) v parih za razmnoževanje, med katero se preskusna kemikalija vnaša v organizem starševske generacije (F0) glede na njeno toksikokinetično obnašanje. Čim bližje prvemu dne četrtega tedna se odvzamejo iker, da se začne generacija F1. Med vzrejo generacije F1 (skupaj 15 tednov) se ocenita valilnost in preživetje. Poleg tega se odvzame vzorec rib pri 9. do 10. tpo za razvojne končne točke, drstenje pa se ocenjuje tri tedne od 12. do 14. tpo. Generacija F2 se začne po tretjem tednu od ocene razmnoževanja in vzreja do konca izvalitve.

## MERILA ZA VELJAVNOST PRESKUSA

8. Uporabljajo se naslednja merila za veljavnost preskusa:
  - koncentracija raztopljenega kisika mora biti med celotnim preskusom  $\geq 60$  % nasičenosti z zrakom;
  - srednja temperatura vode mora biti med celotnim trajanjem študije med 24 in 26 °C. Kratkotrajna odstopanja od srednje vrednosti v posameznih akvarijih ne smejo presegati 2 °C;
  - srednja plodnost kontrol v vsaki generaciji (F0 in F1) mora biti večja od 20 iker na par na dan. Fertilitnost vseh iker, odloženih med oceno, mora biti več kot 80-odstotna. Poleg tega mora 16 od priporočenih 24 kontrolnih parov za razmnoževanje ( $> 65$  %) proizvesti več kot 20 iker na par na dan;
  - valilnost iker mora biti  $\geq 80$  % (povprečno) v kontrolah (v vsaki od generacij F1 in F2);
  - preživetje po izvalitvi do 3 tpo in od 3 tpo do konca za generacijo F1 (tj. 15 tpo) mora biti  $\geq 80$ -odstotno (povprečno) oziroma  $\geq 90$ -odstotno (povprečno) v kontrolah (F1);
  - na voljo morajo biti dokazi, da so se koncentracije preskusne kemikalije v raztopini zadovoljivo vzdrževale v okviru  $\pm 20$  % srednjih izmerjenih vrednosti.

Kar zadeva temperaturo vode, čeprav to ni merilo za veljavnost, se ponovljeni vzorci v okviru tretiranja ne smejo statistično razlikovati drug od drugega in tretirane skupine v okviru preskusa se ne smejo statistično razlikovati druga od druge (na podlagi dnevnih meritev temperature in brez kratkotrajnih odstopanj).

9. Čeprav se lahko v bolj izpostavljenih skupinah ugotovi zmanjšano razmnoževanje, je potrebno zadostno razmnoževanje v vsaj tretji najbolj izpostavljeni skupini in vseh manj izpostavljenih skupinah generacije F0, da se zapolnijo valilniki. Poleg tega je potrebno zadostno preživetje zarodkov v tretji najbolj izpostavljeni skupini in manj izpostavljenih

skupinah v generaciji F1, da se omogoči ocena končnih točk pri vzorčenju mladostnih osebkov (glej odstavka 36 in 38 ter Dodatek 9). Poleg tega je potrebno vsaj minimalno preživetje po izvalitvi (~ 20-odstotno) v drugi najbolj izpostavljeni skupini generacije F1. To niso merila veljavnosti kot taka, ampak priporočila, da se omogoči izračun približnih NOEC.

10. Če je ugotovljeno odstopanje od meril za veljavnost preskusa, je treba posledice obravnavati glede na zanesljivost rezultatov preskusa ter ta odstopanja in razmisleke vključiti v poročilo o preskusu.

## OPIS METODE

### Oprema

11. Običajna laboratorijska oprema in zlasti naslednje:

- (a) oksimetri in merilniki pH;
- (b) oprema za določanje trdote in alkalnosti vode;
- (c) ustrezne naprave za nadzor temperature in, po možnosti, stalno spremljanje;
- (d) akvariji iz kemijsko inertnih materialov in primerne prostornine glede na priporočeno obremenitev in gostoto rib (glej Dodatek 3);
- (e) ustrezno natančna tehnika (tj. natančna na 0,5 mg).

### Voda

12. Za preskusno vodo se lahko uporabi katera koli voda, v kateri preskusna vrsta kaže primerno dolgotrajno preživetje in rast. Kakovost vode mora biti ves čas trajanja preskusa konstantna. Za zagotovitev, da voda za redčenje ne bi neprimerno vplivala na rezultat preskusa (na primer s kompleksacijo preskusne kemikalije) ali škodljivo učinkovala na produktivnost plemenskih rib, je treba v časovnih razmikih jemati vzorce za analizo. Meritve težkih kovin (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), glavnih anionov in kationov (npr.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ), pesticidov, skupnega organskega ogljika in suspendiranih trdnih snovi je treba izvesti na primer vsakih šest mesecev, kadar se ve, da je kakovost vode za redčenje relativno konstantna. Nekatere kemijske značilnosti sprejemljive vode za redčenje so navedene v Dodatku 2. Vrednost pH vode mora biti med 6,5 in 8,5, znotraj enega preskusa pa mora biti v območju  $\pm 0,5$  pH enote.

### Sistem izpostavljenosti

13. Koncept in materiali, uporabljeni za sistem izpostavljenosti, niso določeni. Za postavitev preskusnega sistema je treba uporabiti steklo, nerjavno jeklo ali druge kemijsko inertne materiale, ki med predhodnimi preskusi niso bili kontaminirani. Za namen tega preskusa

lahko primeren sistem izpostavljenosti zajema kontinuiran pretočni sistem (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13).

### **Preskusne raztopine**

14. Osnovno raztopino preskusne kemikalije je treba v sistem izpostavljenosti dovajati z ustrežno črpalko. Pretok osnovne raztopine je treba pred začetkom izpostavljenosti umeriti v skladu z analitsko potrditvijo preskusnih raztopin in ga med preskusom redno volumetrično preverjati. Preskusna raztopina v vsaki komori se ustrezno obnavlja (npr. najmanj 5 izmenjav količine/dan do 16 izmenjav količine/dan ali pretok 20 ml/min), odvisno od stabilnosti preskusne kemikalije in kakovosti vode.
15. Preskusne raztopine izbranih koncentracij se pripravijo z redčenjem osnovne raztopine. Osnovno raztopino je treba po možnosti pripraviti preprosto z mešanjem ali stresanjem preskusne kemikalije v vodi za redčenje z uporabo mehanskih sredstev (npr. z mešanjem in/ali ultrazvokom). Za pridobitev primerno koncentrirane osnovne raztopine se lahko uporabijo saturacijske kolone/sistemi ali metode pasivnega odmerjanja (14). Čim bolj si je treba prizadevati za neuporabo topil ali nosilcev, ker: (1) lahko nekatera topila povzročijo toksičnost in/ali neželene ali nepričakovane odzive, (2) lahko preskušanje kemikalij nad njihovo vodotopnostjo (kar se lahko pogosto zgodi pri uporabi topil) privede do netočnih določitev učinkovitih koncentracij, (3) lahko uporaba topil v dolgotrajnejših preskusih privede do znatne stopnje razvoja biofilma, povezanega z mikrobno dejavnostjo, kar lahko vpliva na okoljske pogoje in zmožnost vzdrževanja koncentracij izpostavljenosti, ter (4) ob neobstoju preteklih podatkov, ki kažejo, da topilo ne vpliva na rezultat študije, uporaba topil zahteva kontrolno tretiranje s topilom, kar ima posledice za dobrobit živali, saj so za izvedbo preskusa potrebne dodatne živali. Za kemikalije, ki jih je težko preskusiti, se lahko kot zadnja rešitev uporabi topilo, pri čemer je treba za določitev najboljše metode upoštevati Smernico OECD št. 23 za preskušanje toksičnosti zahtevnih snovi in zmesi v vodnem okolju (15). Topilo se izbere na podlagi kemijskih lastnosti preskusne kemikalije in razpoložljivosti preteklih podatkov o uporabi topila. Če se uporabijo topila kot nosilci, je treba poleg (negativnih) kontrol brez topila (samo voda za redčenje) oceniti ustrezne kontrole s topilom. Če se uporabi topila ni mogoče izogniti in se pojavi mikrobna dejavnost (razvoj biofilma), se med celotnim preskusom priporoča evidentiranje/sporočanje razvoja biofilma po akvarijih (vsaj tedensko). V idealnih razmerah bi morala biti koncentracija topila konstantna v kontroli s topilom in vseh preskusnih tretiranjih. Če koncentracija topila ni konstantna, je treba v kontroli s topilom uporabiti najvišjo koncentracijo topila v preskusnem tretiranju. Kadar se uporabi topilo kot nosilec, najvišje koncentracije topila ne smejo presegati 100 µl/l ali 100 mg/l (15), priporočljivo pa je tudi, da koncentracija topila ostane čim nižja (npr. < 20 µl/l), da bi se izognili morebitnemu učinku topila na izmerjene končne točke (16).

## Preskusne živali

### *Izbira in vzdrževanje rib*

16. Preskusna vrsta je japonska medaka *Oryzias latipes*, in sicer zaradi kratkega življenjskega cikla in možnosti določitve genetskega spola. Čeprav se lahko podobnemu preskusnemu protokolu prilagodijo druge vrste majhnih rib, se posebne metode in opazovane končne točke, ki so podrobno predstavljene pri tej preskusni metodi, uporabljajo samo za japonsko medako (glej odstavek 1). Medaka je že pripravljena za razmnoževanje v ujetništvu; objavljene so metode za njeno gojenje (17) (18) (19), poleg tega so na voljo podatki iz preskusov v zvezi s kratkoročno smrtnostjo, zgodnjo življenjsko fazo in celotnim življenjskim ciklom (5) (6) (8) (9) (20). Za vse ribe velja svetlobni cikel, v katerem svetloba traja 16 ur, tema pa 8 ur. Ribe se hranijo z živimi navpliji solinskih rakcev vrste *Artemia*, ki se lahko po potrebi dopolnijo s hrano v kosmičih, ki je na voljo na trgu. Hrano v kosmičih, ki je na voljo na trgu, je treba redno analizirati glede prisotnosti onesnaževal.
17. Če se upoštevajo ustrezne ribogojске prakse, poseben protokol gojenja ni potreben. Medake se lahko na primer gojijo v dvolitrskih akvarijih z 240 larvalnimi ribami na akvarij do 4. tpo, nato se lahko gojijo v dvolitrskih akvarijih z 10 ribami na akvarij do 8. tpo, nato pa se v parih za razmnoževanje prenesejo v dvolitrske akvarije.

### *Aklimatizacija in izbira rib*

18. Preskusne ribe je treba izbrati iz enega samega laboratorijskega staleža, ki se je vsaj dva tedna pred preskusom aklimatiziral v podobnih pogojih kakovosti vode in osvetljenosti, kot so tisti, ki se uporabijo v preskusu (opomba: to obdobje aklimatizacije ni *in situ* obdobje pred izpostavljenostjo). Priporočljivo je, da se preskusne ribe odvzamejo iz internega gojišča, saj je prestavljanje odraslih rib stresno in lahko vpliva na zanesljivo drstenje. Ribe je treba v celotnem obdobju vzdrževanja in med fazo izpostavljenosti hraniti dvakrat na dan z navpliji solinskih rakcev, ki se po potrebi dopolnijo s hrano v kosmičih, ki je na voljo na trgu. Za začetek tega preskusa in zagotovitev ustreznega števila ponovitev je potrebnih najmanj 42 parov za razmnoževanje (54 parov za razmnoževanje, če je potrebna kontrola s topilom, delno zaradi nepopolnih preteklih podatkov za podporo uporabi samo kontrole s topilom). Poleg tega je treba za vsak par za razmnoževanje iz generacije F0 preveriti, da je XX-XY (tj. običajni par spolnih kromosomov pri vsakem spolu), da se prepreči morebitna vključitev spontanega XX-samcev (glej odstavek 39).
19. Med fazo aklimatizacije je treba evidentirati pogine pri gojenih ribah in po 48-urnem obdobju prilagajanja uporabiti naslednja merila:
  - več kot 10-odstotna smrtnost gojene populacije v sedmih dneh pred prenosom v preskusni sistem: celotna serija se zavrne;

- od 5- do 10-odstotna smrtnost populacije v sedmih dneh pred prenosom v preskusni sistem: dvotedensko obdobje aklimatizacije se podaljša za dodatnih sedem dni; če je v teh dodatnih sedmih dneh smrtnost večja od 5 %, se celotna serija zavrne;
  - manj kot 5-odstotna smrtnost populacije v sedmih dneh pred prenosom v preskusni sistem: serija se sprejme.
20. Ribe se v dvotedenskem obdobju aklimatizacije pred preskusom in v obdobju izpostavljenosti ne smejo zdraviti zaradi bolezni, zdravljenju bolezni pa se je treba po možnosti popolnoma izogniti. V študiji se ne smejo uporabiti ribe s kliničnimi znaki bolezni. Voditi je treba evidenco opažanj in kakršnih koli profilaktičnih ali terapevtskih zdravljenj bolezni v obdobju gojenja pred preskusom.
21. Fazo izpostavljenosti je treba začeti s spolno dimorfnimi odraslimi ribami z določenim genetskim spolom iz laboratorijske zaloge razmnoževalno zrelih živali, gojenih pri  $25 \pm 2$  °C. Ribe morajo biti v tednu pred izpostavljenostjo opredeljene kot dokazane plemenske ribe (tj. so že proizvedle viabilne potomce). Za celotno skupino rib, uporabljenih v preskusu, je treba teže posameznih rib po spolu na začetku preskusa vzdrževati v območju  $\pm 20$  % aritmetične sredine teže istega spola. Pred preskusom je treba stehtati pod vzorec rib, da se oceni srednja teža. Izbrane ribe morajo biti najmanj 12 tpo, samice morajo tehtati  $\geq 300$  mg, samci pa  $\geq 250$  mg.

## NAČRT PRESKUSA

### Preskusne koncentracije

22. Priporoča se uporaba petih koncentracij kemikalije in kontrol. Pri izbiri območja preskusnih koncentracij je treba upoštevati vse vire informacij, vključno s kvantitativnimi razmerji med strukturo in aktivnostjo (QSAR), navzkrižnim branjem iz podobnih preskusov, rezultati preskusov pri ribah, kot so preskusi akutne smrtnosti (poglavje C.1 te priloge), kratkotrajni preskus razmnoževanja rib (poglavje C.48 te priloge) in druge preskusne metode, npr. poglavja C.15, C.37, C.41, C.47 ali C.49 te priloge (21) (22) (23) (24) (25) (26), če so na voljo, ali po potrebi iz preskusa za določanje območja, ki po možnosti vključuje fazo razmnoževanja. Preskus za določanje območja se po potrebi lahko izvede pod podobnimi pogoji (kakovost vode, preskusni sistem, število živali), kot se uporabijo za končni preskus. Če je treba uporabiti topilo in pretekli podatki niso na voljo, se lahko za opredelitev primernosti topila uporabi preskus za določanje območja. Najvišja preskusna koncentracija ne sme preseči topnosti v vodi, 10 mg/l ali 1/10 96h-LC50 (27). Najnižja koncentracija mora biti za 10- do 100-krat nižja od najvišje koncentracije. Uporaba petih koncentracij v tem preskusu omogoča ne samo meritev razmerja med odmerkom in odzivom, ampak zagotavlja tudi najnižjo koncentracijo z opaženim učinkom (LOEC) in NOEC, ki sta potrebni za oceno tveganja v nekaterih regulativnih programih ali

jurisdikcijah. Na splošno je faktor razmika med nominalnimi koncentracijami preskusne kemikalije med sosednjimi stopnjami tretiranja  $\leq 3,2$ .

### **Ponovljeni vzorci v okviru tretiranih skupin in kontrol**

23. Uporabiti je treba najmanj šest ponovitvenih preskusnih komor na preskusno koncentracijo (glej Dodatek 7). Med fazo razmnoževanja (razen generacije F0) se ponovitvena struktura podvoji za oceno plodnosti, vsak ponovljeni vzorec pa ima samo en par za razmnoževanje (glej odstavek 42).
24. Poleg preskusnih koncentracij je treba izvesti tudi kontrolo z vodo za redčenje in po potrebi kontrolo s topilom. Uporabiti je treba podvojeno število ponovitvenih komor za kontrole, da se zagotovi ustrezna statistična moč (tj. za kontrole je treba uporabiti vsaj 12 ponovljenih vzorcev). V fazi razmnoževanja se število ponovljenih vzorcev v kontrolah podvoji (tj. najmanj 24 ponovljenih vzorcev, vsak ponovljeni vzorec ima samo en paritveni par). Po razmnoževanju lahko kontrolni ponovljeni vzorci vsebujejo največ 20 zarodkov (rib).

## **POSTOPEK**

### **Začetek preskusa**

25. Spolno aktivne odrasle ribe, uporabljene za začetek generacije F0 za preskus, se izberejo na podlagi dveh meril: starosti (običajno več kot 12 tpo, vendar se priporoča, da ne več 16 tpo) in teže (ki mora biti  $\geq 300$  mg za samice in  $\geq 250$  mg za samce).
26. Pari samic in samcev, ki izpolnjujejo zgornje specifikacije, se kot posamezni pari prenesejo v vsak ponovitveni akvarij, tj. 12 ponovljenih vzorcev v kontrolah in šest ponovljenih vzorcev v tretiranih skupinah s kemikalijo na začetku preskusa. Tem akvarijem se naključno dodelita tretirana skupina (npr. T1–T5 in kontrola) in ponovljeni vzorec (npr. A–L v kontrolah in A–F v tretirani skupini), nato pa se vstavijo v sistem izpostavljenosti z ustreznim tokom v vsak akvarij.

### **Pogoji izpostavljenosti**

27. Celotni povzetek parametrov in pogojev preskusa je na voljo v Dodatku 3. Ob upoštevanju teh specifikacij bi morale imeti kontrolne ribe vrednosti končnih točk podobne tistim, ki so navedene v Dodatku 4.
28. Med preskusom je treba meriti raztopljeni kisik, pH in temperaturo v vsaj eni preskusni posodi vsake tretirane skupine in kontrole. Te meritve, razen temperature, je treba izvesti vsaj enkrat tedensko v celotnem obdobju izpostavljenosti. Srednja temperatura vode med celotnim trajanjem študije mora biti med 24 in 26 °C. Temperaturo je treba meriti vsak dan



v celotnem obdobju izpostavljenosti. Vrednost pH vode mora biti med 6,5 in 8,5, znotraj enega preskusa pa mora biti v območju  $\pm 0,5$  pH enote. Ponovljeni vzorci v okviru tretiranja se ne smejo statistično razlikovati drug od drugega in tretirane skupine v okviru preskusa se ne smejo statistično razlikovati druga od druge (na podlagi dnevnih meritev temperature in brez kratkotrajnih odstopanj).

### **Trajanje izpostavljenosti**

29. V preskusu so spolno aktivne ribe iz generacije F0 izpostavljene tri tedne. V četrtem tednu se približno na 24. dan preskusa vzpostavi generacija F1, pari za razmnoževanje generacije F0 pa se humano usmrtijo, pri čemer se evidentirata teža in dolžina (glej odstavek 34). Temu sledi izpostavljenost generacije F1 dodatnih 14 tednov (skupaj 15 tednov za generacijo F1) in generacije F2 dva tedna do izvalitve. Skupno trajanje preskusa je v glavnem 19 tednov (tj. do izvalitve generacije F2). Časovni okviri za preskus so prikazani v preglednici 2 in podrobneje pojasnjeni v Dodatku 9.

### **Način hranjenja**

30. Ribe se lahko hranijo s solinskimi rakci vrste *Artemia* (24 ur starimi navpliji) *ad libitum*, ki se lahko po potrebi dopolnijo s hrano v kosmičih, ki je na voljo na trgu. Hrano v kosmičih, ki je na voljo na trgu, je treba redno analizirati glede prisotnosti onesnaževal, kot so organoklorni pesticidi, policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH) in poliklorirani bifenili (PCB). Izogibati se je treba hrani z visoko ravno endokrinih aktivnih snovi (tj. fitoestrogenov), ki bi lahko ogrozila odziv preskusa. Nezaužito hrano in iztrebke je treba odstraniti iz preskusnih posod v skladu z zahtevami, npr. s previdnim čiščenjem dna posameznega akvarija z uporabo sesalne natege. Enkrat ali dvakrat na teden je treba očistiti tudi stranice in dno vsakega akvarija (npr. s krtačenjem). Primer časovnega razporeda hranjenja je v Dodatku 5. Stopnja hranjenja temelji na številu rib na ponovljeni vzorec in se torej zmanjša v primeru poginov v ponovljenem vzorcu.

### **Analitsko določanje in meritve**

31. Pred začetkom obdobja izpostavljenosti je treba zagotoviti ustrezno delovanje sistema za dovajanje kemikalije. Vzpostaviti je treba vse potrebne analitske metode, vključno z zadostnim znanjem o stabilnosti kemikalije v preskusnem sistemu. Med preskusom se koncentracije preskusne kemikalije določajo v ustreznih časovnih razmikih, po možnosti vsaj vsak teden v enem ponovljenem vzorcu za vsako tretirano skupino, pri čemer se vsak teden rotira med ponovljenimi vzorci iste tretirane skupine.
32. Med preskusom je treba v časovnih razmikih ustrezno preverjati pretok razredčila in osnovne raztopine (npr. najmanj trikrat tedensko). Priporočljivo je, da rezultati temeljijo na izmerjenih koncentracijah. Če pa se je koncentracija preskusne kemikalije v raztopini zadovoljivo vzdrževala znotraj  $\pm 20$  % srednjih izmerjenih vrednosti ves čas preskusa,

lahko rezultati temeljijo na nominalnih ali izmerjenih vrednostih. V primeru kemikalij, ki se opazno kopičijo v ribah, se lahko preskusne koncentracije znižajo, ko ribe zrastejo. V takih primerih je priporočljivo, da se v vsaki komori prilagodi stopnja izmenjave preskusne raztopine, da bi preskusne koncentracije ostale čim bolj konstantne.

### ***Opažanja in izmerjene končne točke***

33. Izmerjene končne točke za oceno mogočih učinkov na ravni populacije vključujejo plodnost, fertilnost, izvalitev, rast in preživetje. Vsak dan je treba opazovati tudi obnašanje in zabeležiti vsako neobičajno obnašanje. Druge mehanistične končne točke vključujejo mRNK *vtg* ali ravni proteina VTG v jetrih z imunološkim preskusom (28), spolne fenotipske označevalce, kot so značilne papile na predrepni plavuti pri samcih, histološko oceno gonadnega spola in histopatološko oceno ledvic, jeter in spolnih žlez (glej seznam končnih točk v preglednici 1). Vse te specifične končne točke se ocenijo v okviru določitve genetskega spola posameznega osebk na podlagi prisotnosti ali odsotnosti gena za določitev moškega spola *dmy* pri medaki (glej odstavek 41). Poleg tega se oceni tudi čas za drstenje. Na podlagi informacij iz štetja papil na predrepni plavuti se lahko izpeljejo tudi preprosta fenotipska razmerja med spoloma, da se posamezne medake fenotipsko opredelijo kot samci ali samice. Za to preskusno metodo se ne pričakuje, da bodo z njo zaznana majhna odstopanja od pričakovanega razmerja med spoloma, ker razmeroma majhno število rib na ponovljeni vzorec ne bo zagotovilo zadostne statistične moči. Prav tako se med histopatološko oceno ocenijo spolne žleze in izvedejo veliko močnejše analize za oceno fenotipa spolnih žlez v okviru genetskega spola.
34. Glavni namen te preskusne metode je oceniti morebitne učinke preskusne kemikalije, ki so pomembni za populacijo. Tudi mehanistične končne točke (VTG, SSZ in nekateri učinki na histopatološke spremembe spolnih žlez) lahko pomagajo pri ugotovitvi, ali endokrino delovanje sproži kakršen koli učinek. Vendar pa lahko na te mehanistične končne točke vplivajo tudi systemske in druge toksičnosti. Zato se lahko podrobno ocenijo tudi histopatološke spremembe jeter in ledvic, da bi bolje razumeli kakršne koli odzive v mehanističnih končnih točkah. Če se te podrobne ocene ne izvedejo, je treba še vedno zabeležiti in sporočiti večje nepravilnosti, naključno ugotovljene med histopatološko oceno.

### ***Humana usmrtnitev rib***

35. Ob končani izpostavljenosti generacij F0 in F1, ko se vzamejo podvzorci mladostnih osebkov, je treba ribe evtanazirati s primernimi količinami raztopine za anestezijo (npr. trikain metan sulfonat, MS-222 (št. CAS 886-86-2, 100–500 mg/l), pufran s 300 mg/l NaHCO<sub>3</sub> (natrijev bikarbonat, št. CAS 144-55-8)), da se zmanjša draženje sluznice. Če so pri ribah vidni znaki precejšnjega trpljenja (zelo hudo trpljenje, pogin je mogoče zanesljivo napovedati) in se obravnavajo kot umirajoče, je treba živali anestezirati in evtanazirati ter

jih za analizo podatkov obravnavati kot smrtne primere. Kadar se ribe evtanazirajo zaradi obolevnosti, je to treba zabeležiti in sporočiti. Odvisno od tega, kdaj med študijo so ribe evtanazirane, se lahko zadržijo za histopatološko analizo (fiksiranje rib za morebitno histopatologijo).

### ***Ravnanje z ikrami in larvalnimi ribami***

#### *Odvzem iker od parov za razmnoževanje za razmnožitev naslednje generacije*

36. Ikre se odvzamejo prvi dan (ali po potrebi prva dva dneva) 4. tedna preskusa za prehod z generacije F0 na generacijo F1 in 18. tedna preskusa za prehod z generacije F1 na generacijo F2. 18. teden preskusa ustreza generaciji F1, odraslim ribam 15 tpo (tednov po oploditvi). Pomembno je, da se dan pred začetkom odvzema iker odstranijo vse ikre iz vsakega akvarija, s čimer se zagotovi, da so vse ikre, odvzete od para za razmnoževanje, iz enega drstenja. Po drstenju samice medake včasih ikre nosijo blizu zadnjične odprtine, dokler iker ni mogoče odložiti na substrat. Če v akvariju ni substrata, je mogoče ikre najti pritrjene na samico ali na dnu akvarija. Odvisno od tega, kje so, se ikre bodisi previdno odstranijo s samice bodisi izsesajo z dna v 4. tednu preskusa pri generaciji F0 in 18. tednu preskusa pri generaciji F1. Vse ikre, odvzete v okviru tretiranja, se pred razdelitvijo v inkubacijske komore združijo.
37. Filamente iker, ki povezujejo odložene ikre, je treba odstraniti. Oplojene ikre (do 20) se odvzamejo od vsakega para za razmnoževanje (1 par na ponovljeni vzorec), združijo po tretiranjih in sistematično razdelijo v primerne inkubacijske komore (dodatka 6 in 7). Z zelo kakovostnim stereomikroskopom je mogoče videti znake zgodnje oploditve/razvoja, kot so dvig oploditvene membrane (horija), delitev celic ali oblikovanje blastule. Inkubacijske komore se lahko vstavijo v ločene „inkubacijske akvarije“, vzpostavljene za vsako tretiranje (v takem primeru je treba v njih meriti parametre kakovosti vode in koncentracije preskusne kemikalije), ali v ponovitveni akvarij, v katerem bodo izvaljene ličinke (npr. zarod z mešičkom). Če je potreben drugi dan odvzema (23. dan preskusa), je treba združiti vse ikre obeh dni in jih nato sistematično porazdeliti v vsakega od ponovljenih vzorcev tretiranja.

#### *Gojenje iker do izvalitve*

38. Oplojene ikre se stalno mešajo, npr. z zračnimi mehurčki v inkubatorju za ikre ali navpičnim nihanjem inkubatorja za ikre. Vsak dan se preverja in evidentira smrtnost oplojenih iker (zarodkov). Odmrle ikre se odstranijo iz inkubatorjev (Dodatek 9). 7. dan po oploditvi (dpo) se mešanje ustavi ali zmanjša, da se oplojene ikre usedejo na dno inkubatorja. S tem se spodbudi izvalitev, ki se običajno zgodi naslednjega dne ali v naslednjih dveh dneh. Za vsako tretiranje in kontrolo se preštejejo izvaljene ličinke (mlade ličinke; zarod z mešičkom) (na podlagi združitve ponovljenih vzorcev). Oplojene ikre, ki

se ne izvalijo do dvakratnika srednjega dne izvalitve v kontroli (običajno 16. ali 18. dpo), se štejejo za neviabilne in se zavržejo.

39. V vsak ponovitveni akvarij se prenese dvanajst izvaljenih ličink. Izvaljene ličinke iz inkubacijskih komor se združijo in sistematično razdelijo v ponovitvene akvarije (Dodatek 7). To je mogoče storiti tako, da se izvaljene ličinke naključno izberejo iz tretirane skupine in nato nediskriminatorno zaporedoma dodajajo v ponovitvene akvarije. Vsak akvarij mora vsebovati enako število ( $n = 12$ ) izvaljenih ličink (vsak največ 20 ličink). Če ni dovolj izvaljenih ličink za zapolnitev vseh ponovljenih vzorcev tretiranja, je priporočljivo zagotoviti, da ima čim več ponovljenih vzorcev 12 izvaljenih ličink. Z ličinkami je mogoče varno ravnati s steklenimi pipetami s široko odprtino. Vse dodatne izvaljene ličinke je treba humano usmrtiti z anestetikom. V nekaj tednih pred vzpostavitvijo parov za razmnoževanje je treba evidentirati dan, ko je v posameznem ponovljenem vzorcu opaženo prvo drstenje.

### **Vzpostavitev parov za razmnoževanje**

#### *Odščip plavuti in določitev genotipskega spola*

40. Genotipski spol z odščipom plavuti se določi od 9 do 10 tpo (tj. 12.–13. teden preskusa za generacijo F1). Vse ribe v akvariju se anestezirajo (z odobrenimi metodami, npr. IACUC), z zgornjega ali spodnjega konca repne plavuti vsake ribe pa se odvzame majhen vzorec tkiva za določitev genotipskega spola osebka (29). Ribe iz ponovljenega vzorca se lahko namestijo v majhnih kletkah, po možnosti ena na kletko, v ponovitvenem akvariju. Alternativno sta lahko v vsaki kletki dve ribi, če ju je mogoče razlikovati. Ena metoda je, da se pri odvzemu vzorca tkiva različno odreže repna plavut (npr. z zgornjega ali spodnjega konca repne plavuti).
41. Genotipski spol medake se določi z identificiranim in sekvenciranim genom (*dmy*), ki se nahaja na kromosomu Y. Prisotnost *dmy* kaže osebek z geni XY ne glede na fenotip, medtem ko odsotnost *dmy* kaže osebek z geni XX ne glede na fenotip (30); (31). Iz vsakega dela odščipljene plavuti se ekstrahira deoksiribonukleinska kislina (DNK), prisotnost ali odsotnost *dmy* pa se lahko določi z metodami verižne reakcije s polimerazo (PCR) (glej Dodatek 9 v poglavju C.41 te priloge ali dodatka 3 in 4 v (29)).

#### *Vzpostavitev parov za razmnoževanje*

42. Informacije o genotipskem spolu se uporabijo za vzpostavitev parov za razmnoževanje XX-XY ne glede na zunanji fenotip, ki se lahko spremeni z izpostavljenostjo preskusni kemikaliji. Na dan po določitvi genotipskega spola vsake ribe se iz vsakega ponovljenega vzorca naključno izbereta dve ribi XX in dve ribi XY ter vzpostavita dva para za razmnoževanje XX-XY. Če v ponovljenem vzorcu ni bodisi dveh rib XX bodisi dveh rib XY, je treba ustrezne ribe pridobiti iz drugih ponovljenih vzorcev v okviru tretiranja.

Prednostna naloga je, da je v vsakem tretiranju in v kontrolah (24) priporočeno število ponovitvenih parov za razmnoževanje (12). Ribe z očitnimi nepravilnostmi (težave s plavalnim mehurjem, deformacije hrbtenice, izjemne razlike v velikosti itd.) se pri vzpostavljanju parov za razmnoževanje izključijo. V fazi razmnoževanja za generacijo F1 mora vsak ponovitveni akvarij vsebovati le en par za razmnoževanje.

### **Vzorčenje mladostnih osebkov in ocena končnih točk**

#### *Vzorčenje rib, ki niso vključene v pare za razmnoževanje*

43. Po vzpostavitvi parov za razmnoževanje se ribe, ki niso bile izbrane za nadaljnje razmnoževanje, humano usmrtijo za meritev končnih točk pri mladostnih osebkih v 12.–13. tednu preskusa (F1). Izjemno pomembno je, da se z ribami ravna tako, da je pri posamezni ribi še vedno mogoče ugotoviti genotipski spol, določen za izbiro parov za razmnoževanje. Vsi zbrani podatki se analizirajo v okviru genotipskega spola posameznih rib. Vsaka riba se uporabi za različne meritve končnih točk, med drugim za: določitev stopenj preživetja mladic/mladostnih osebkov (7.–12./13. teden preskusa (F1)), rasti v dolžino (standardna dolžina se lahko izmeri, če je bila repna plavut skrajšana zaradi vzorčenja za analizo genetskega spola. Skupna dolžina se lahko izmeri, če se za *dmy* vzorči le delček zgornjega ali spodnjega konca repne plavuti) in telesne teže (tj. mokra teža, osušena s pivnikom), mRNK *vtg* (ali VTG) v jetrih in papil na predrepni plavuti (glej preglednici 1 in 2). Upoštevajte, da so za izračun srednje rasti v tretirani skupini potrebne tudi teže in dolžine parov za razmnoževanje.

#### *Vzorčenje tkiva in meritev vitelogenina*

44. Jetra se do meritev mRNK *vtg* (ali VTG) secirajo in shranijo pri  $\leq -70^{\circ}\text{C}$ . Rep ribe, vključno s predrepno plavutjo, se shrani v ustreznem fiksativu (npr. Davidsonovem) ali fotografira, tako da je mogoče pozneje prešteti papile na predrepni plavuti. Po želji se lahko sočasno vzorčijo in shranijo druga tkiva (tj. spolne žleze). Koncentracijo VTG v jetrih je treba kvantificirati s homologno tehniko ELISA (glej priporočene postopke za medako v Dodatku 6 in poglavju C.48 te priloge). Agencija U.S EPA je vzpostavila tudi metode za kvantificiranje mRNK *vtg*, tj. ekstrakcijo mRNK gena *vtg I* iz vzorca jeter in kvantificiranje števila kopij gena *vtg I* (na ng skupne mRNK) s kvantitativno metodo PCR (29). Namesto določitve števila kopij gena *vtg* v kontrolnih in tretiranih skupinah je virom bolj prijazna in tehnično ne tako težavna metoda določitev relativne (stopenjske) spremembe v izražanju *vtg I* v kontrolnih in tretiranih skupinah.

#### *Sekundarne spolne značilnosti*

45. V običajnih okoliščinah imajo samo spolno zreli samci medake papile, ki se razvijejo na ploščicah nekaterih plavutnic predrepne plavuti kot sekundarna spolna značilnost in so lahko potencialni biooznačevalec za motnje endokrinega sistema. Metoda štetja papil na

predrepni plavuti (število ploščic s papilami) je navedena v Dodatku 8. Število papil na predrepni plavuti na posamezni osebek se uporabi tudi, da se navedeni osebek glede na zunanji fenotip kategorizira kot samec ali samica za namen izračuna preprostega razmerja med spoloma v ponovljenem vzorcu. Medaka, pri kateri število presega 0, je opredeljena kot samec; medaka, pri kateri je število papil na predrepni plavuti 0, je opredeljena kot samica.

### **Ocena plodnosti in fertilnosti**

46. Plodnost in fertilnost se v generaciji F0 ocenjujeta od 1. do 3. tedna preskusa, v generaciji F1 pa od 15. do 17. tedna preskusa. Ikre se pri vsakem paru za razmnoževanje odvzemajo vsak dan 21 zaporednih dni. Ikre se vsako jutro nežno odstranijo z ujetih samic in/ali izsesajo z dna akvarija. Za vsak ponovitveni par za razmnoževanje se vsak dan evidentirata plodnost in fertilnost. Plodnost je opredeljena kot število odloženih iker, fertilnost pa je funkcionalno opredeljena kot število oplojenih in viabilnih iker v času štetja. Ikre je treba prešteti čim prej po odvzemu.
47. Plodnost v ponovljenem vzorcu se vsak dan evidentira kot število iker na par za razmnoževanje, ki se analizira s priporočenimi statističnimi postopki z uporabo srednjih vrednosti za ponovljeni vzorec. Fertilnost v ponovljenem vzorcu je vsota števila fertilnih iker, ki jih proizvede par za razmnoževanje, deljena z vsoto števila iker, ki jih proizvede ta par. Statistično se fertilnost analizira kot delež na ponovljeni vzorec. Valilnost v ponovljenem vzorcu je število izvaljenih ličink, deljeno s številom vnesenih zarodkov (običajno 20). Statistično se valilnost analizira kot delež na ponovljeni vzorec.

### **Vzorčenje odraslih rib in ocena končnih točk**

*Vzorčenje rib, ki so vključene v pare za razmnoževanje*

48. Po 17. tednu preskusa (tj. potem ko se je generacija F2 uspešno začela) se odrasle ribe generacije F1 humano usmrtijo in ocenijo različne končne točke (glej preglednici 1 in 2). Predrepna plavut se slika za oceno papil na predrepni plavuti (glej Dodatek 8) in/ali pa se rep takoj za zadnjično odprtino odstrani in fiksira za poznejše štetje papil. Ob tem se lahko po želji vzame vzorec dela repne plavuti in shrani za preverjanje genetskega spola (*dmy*). Po potrebi se lahko vzame vzorec tkiva, da se ponovi analiza *dmy* za preverjanje genetskega spola posameznih rib. Telesna votlina se odpre, da se omogoči perfuzija z ustreznimi fiksativi (npr. Davidsonovim), preden se celoten trup potopi v fiksativ. Če pa se pred fiksacijo opravi ustrezna permeabilizacija, telesne votline ni treba odpirati.

### *Histopatologija*

49. Pri vsaki ribi se histološko ocenijo patološke spremembe tkiva spolnih žlez (30); (29). Kot je navedeno v odstavku 33, lahko na druge mehanistične končne točke, ocenjene v tem

preskusu (tj. VTG, SSZ in nekateri učinki na histopatološke spremembe spolnih žlez), vplivajo sistemske ali druge toksičnosti. Zato se lahko podrobno ocenijo tudi histopatološke spremembe jeter in ledvic, da bi bolje razumeli kakršne koli odzive v mehanističnih končnih točkah. Če se te podrobne ocene ne izvedejo, je treba še vedno zabeležiti in sporočiti večje nepravilnosti, naključno ugotovljene med histopatološko oceno. Čeprav se priporoča upoštevanje smernic o histopatologiji (29), bi bilo mogoče pregledati in primerjati (‘reading down’) tretirane skupine z največjim učinkom (v primerjavi s kontrolo) in tretirane skupine brez učinka. Običajno se vsi vzorci obdelajo/segmentirajo, nakar jih preuči patolog. Če se uporabi tak primerjalni pristop (‘read-down’), je treba navesti, da se pri postopku Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS) uporablja pričakovanje, da se s povečanjem odmerka poveča tudi biološki učinek (patologija). Če se torej proučuje samo en velik odmerek brez kakršnih koli vmesnih odmerkov, bo moč izgubljena. Če statistična analiza ni potrebna za ugotovitev, da velik odmerek nima učinka, potem je ta pristop lahko sprejemljiv. Iz te ocene se izpelje tudi fenotip spolnih žlez.

#### *Druga opazanja*

50. S preskusom MEOGRT se zagotovijo podatki, ki se lahko uporabijo (npr. pri pristopu, ki temelji na zanesljivosti dokazov), da se sočasno ocenita najmanj dve splošni vrsti poteka neželenega izida (AOP), ki se konča z reproduktivno okvaro: (a) endokrine poti, ki vključujejo motnje na endokrini osi hipotalamus–hipofiza–spolne žleze (HPG), ter (b) poti, ki povzročajo zmanjšanja preživetja, rasti (dolžina in teža) in razmnoževanja z neendokrino toksičnostjo. V ta preskus so vključene tudi končne točke, ki se običajno merijo pri preskusih kronične toksičnosti, kot sta preskus v celotnem življenjskem ciklu in preskus v zgodnjem življenjskem obdobju, ter se lahko uporabijo za oceno nevarnosti, ki jo predstavljata neendokrino toksično delovanje in mehanizem endokrine toksičnosti. Med preskusom je treba obnašanje opazovati dnevno in zabeležiti vsako neobičajno obnašanje. Poleg tega je treba evidentirati vsak pogin ter izračunati preživetje do izločitve rib (6. do 7. teden preskusa), preživetje po izločitvi do vzorčenja mladostnih osebkov (9. do 10. tpo) in preživetje od vzpostavitve parov do vzorčenja odraslih rib.

**Preglednica 1:** Pregled končnih točk preskusa MEOGRT\*

| <b>Življenjsko obdobje</b> | <b>Končna točka</b>               | <b>Generacija</b> |
|----------------------------|-----------------------------------|-------------------|
| Zarodek<br>(2 tpo)         | Izvalitev (% in čas do izvalitve) | F1, F2            |
| Mladica<br>(4 tpo)         | Preživetje                        | F1                |
| Mladostni                  | Preživetje                        | F1                |

|                                |                                                                |        |
|--------------------------------|----------------------------------------------------------------|--------|
| osebek<br>(9 ali 10 tpo)       | Rast<br>(dolžina in teža)                                      |        |
|                                | Vitelogenin<br>(mRNK ali protein)                              |        |
|                                | Sekundarne spolne značilnosti<br>(papile na predrepni plavuti) |        |
|                                | Zunanje razmerje med spoloma                                   |        |
|                                | Čas do 1. drstenja                                             |        |
| Odrasla riba<br>(12 do 14 tpo) | Razmnoževanje<br>(plodnost in fertilnost)                      | F0, F1 |
| Odrasla riba<br>(15 tpo)       | Preživetje                                                     | F1     |
|                                | Rast<br>(dolžina in teža)                                      |        |
|                                | Sekundarne spolne značilnosti<br>(papile na predrepni plavuti) |        |
|                                | Histopatologija<br>(spolne žleze, jetra, ledvice)              |        |

\*Te končne točke je treba statistično analizirati.

## ČASOVNI OKVIR

51. Časovni okvir za preskus MEOGRT v preglednici 2 prikazuje preskus. Preskus MEOGRT vključuje 4 tedne izpostavljenosti odraslih rib generacije F0 in 15 tednov izpostavljenosti generacije F1 ter obdobje izpostavljenosti druge generacije (F2) do izvalitve (2 tpo). Dejavnost v času preskusa MEOGRT je povzeta v Dodatku 9.



**Preglednica 2:** Časovni okvir izpostavljenosti in meritev končnih točk za preskus MEOGRT

| Časovni okvir izpostavljenosti in končnih točk za preskus 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  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |  |              |  |
| Teden                                                            | 1              | 2 | 3 | 4              | 5              | 6              | 7 | 8 | 9 | 10      | 11 | 12             | 13 | 14 | 15             | 16 | 17 | 18             | 19 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |  |              |  |
| Ključno življenjsko obdobje                                      |                |   |   |                | Zarodek        |                |   |   |   | Ličinka |    |                |    |    | Mladica        |    |    |                |    | Mladostni osebek                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |  | Odrasla riba |  |
| Končne točke                                                     |                |   |   |                |                |                |   |   |   |         |    |                |    |    |                |    |    |                |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |  |              |  |
| Plodnost                                                         | F <sub>0</sub> |   |   |                |                |                |   |   |   |         |    |                |    |    | F <sub>1</sub> |    |    |                |    | <div><div></div><div>V načrtu poskusa je 7 skupin ponovljenih vzorcev<ul style="list-style-type: none"><li>5 za tretiranja s preskusno kemikalijo</li><li>2 za kontrolna tretiranja (4, če se uporabi topilo)</li></ul></div><div><div></div><div>Zasnova v skupini<ul style="list-style-type: none"><li>12 ponovljenih vzorcev za razmnoževanje, patologijo odraslih osebkov in SSZ (od 10. do 18. ted.)</li><li>6 ponovljenih vzorcev za izvalitev, preživetje, Vtg; ter SSZ in rast pri mladostnih osebkih (od 1. do 9. ted.)</li></ul></div></div><div>SSZ: sekundarne spolne značilnosti; ted.: tedni;<br/>Vtg: vitelogenin</div></div> |  |              |  |
| Fertilnost                                                       | F <sub>0</sub> |   |   |                |                |                |   |   |   |         |    |                |    |    | F <sub>1</sub> |    |    |                |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |  |              |  |
| Izvalitev                                                        |                |   |   |                | F <sub>1</sub> |                |   |   |   |         |    |                |    |    |                |    |    | F <sub>2</sub> |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |  |              |  |
| Preživetje                                                       |                |   |   |                |                | F <sub>1</sub> |   |   |   |         |    | F <sub>1</sub> |    |    |                |    |    | F <sub>1</sub> |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |  |              |  |
| Rast                                                             |                |   |   | F <sub>0</sub> |                |                |   |   |   |         |    | F <sub>1</sub> |    |    |                |    |    | F <sub>1</sub> |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |  |              |  |
| Vitelogenin                                                      |                |   |   |                |                |                |   |   |   |         |    | F <sub>1</sub> |    |    |                |    |    |                |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |  |              |  |
| Sekundarne spolne                                                |                |   |   |                |                |                |   |   |   |         |    | F <sub>1</sub> |    |    |                |    |    | F <sub>1</sub> |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |  |              |  |
| Histopatologija                                                  |                |   |   |                |                |                |   |   |   |         |    |                |    |    |                |    |    | F <sub>1</sub> |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |  |              |  |
| Teden preskusa                                                   | 1              | 2 | 3 | 4              | 5              | 6              | 7 | 8 | 9 | 10      | 11 | 12             | 13 | 14 | 15             | 16 | 17 | 18             | 19 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |  |              |  |

## SPOROČANJE PODATKOV

### Statistična analiza

52. Ker je genotipski spol določen za vse preskusne ribe, je treba podatke analizirati ločeno za vsak genotipski spol (tj. XY samce in XX samice). Brez tega se bo statistična moč analize močno zmanjšala. Priporočljivo je, da se pri statističnih analizah podatkov upoštevajo postopki, opisani v dokumentu OECD z naslovom Sedanji pristopi k statistični analizi podatkov o ekotoksičnosti: smernice za uporabo (32). Dodatek 10 vsebuje nadaljnje smernice za statistično analizo.

53. Načrt preskusa in izbira statističnih testov morata zagotavljati ustrezno moč opazovanja biološko pomembnih sprememb pri končnih točkah, kjer se poroča o NOEC (32). Poročanje o pomembnih koncentracijah z učinkom in parametrih je lahko odvisno od regulativnega okvira. Opredeliti je treba odstotek spremembe pri vsaki končni točki, ki je pomemben za zaznavanje ali oceno. Poskus mora biti zasnovan tako, da to omogoča. Enak odstotek spremembe najverjetneje ne bo veljal za vse končne točke, poleg tega

izvedljivega poskusa najverjetneje ne bo mogoče zasnovati tako, da bodo ta merila izpolnjena pri vseh končnih točkah, zato se je treba pri ustreznem načrtovanju poskusa osredotočiti na končne točke, ki so pomembne za poskus. Statistični diagram in smernice so na voljo v Dodatku 10; namenjeni so pomoči pri obdelavi podatkov in izbiri najustrežnejšega statističnega testa ali modela. Lahko se uporabijo tudi drugi statistični pristopi, vendar le, če so znanstveno utemeljeni.

54. Variacije je treba v vsakem nizu ponovljenih vzorcev analizirati z analizo variance ali s postopki kontingenčne tabele ter na podlagi zgornje analize izbrati zadostne in ustrezne metode statistične analize. Da bi naredili večkratno primerjavo med rezultati pri posameznih koncentracijah in rezultati kontrol, se za zvezne odzive priporoča uporaba regresijskega postopka (npr. testa po Jonckheere-Terpstraju). Kadar podatki niso skladni z monotonim odzivom na koncentracijo, je treba uporabiti Dunnettov test ali Dunnov test (po ustrezni pretvorbi podatkov, če je to potrebno).
55. Za opredelitev plodnosti se ike štejejo dnevno, vendar se lahko analizirajo kot skupno število iker ali kot ponovljena meritev. Dodatek 10 vsebuje podrobnosti o tem, kako se analizira ta končna točka. Za histopatološke podatke, ki so v obliki ocen resnosti, je bil razvit nov statistični test, tj. Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS) (33).
56. Poročati je treba o vseh končnih točkah, opaženih pri tretiranjih s kemikalijo, ki se bistveno razlikujejo od ustreznih kontrol.

### **Pomisleki o analizi podatkov**

#### *Uporaba ogroženih stopenj tretiranja*

57. Pri določanju, ali se očitna toksičnost kaže pri ponovljenem vzorcu ali celotnem tretiranju, se obravnava več dejavnikov, ki jih je treba izključiti iz analize. Očitna toksičnost je opredeljena kot  $> 4$  smrtni primeri v katerem koli ponovljenem vzorcu med 3. in 9. tpo, ki jih ni mogoče pojasniti s tehnično napako. Drugi znaki očitne toksičnosti vključujejo hemoragijo, nenormalno obnašanje, nenormalne načine plavanja, anoreksijo in katere koli druge klinične znake bolezni. Za subletalne znake toksičnosti bodo lahko potrebne kvalitativne ocene, ki jih je vedno treba izvesti za kontrolno skupino z vodo za redčenje (samo čista voda). Če je očitna toksičnost opazna pri najbolj obremenjenih tretiranjih, je priporočljivo, da se ta tretiranja izključijo iz analize.

#### *Kontrole s topilom*

58. Uporabo topila je treba obravnavati le kot zadnjo možnost, ko so bile obravnavane že vse druge možnosti dovajanja kemikalije. Če se uporabi topilo, je treba skladno izvesti kontrolo z vodo za redčenje. Ob koncu preskusa je treba izvesti oceno potencialnih

učinkov topila. Ocena se izvede s statistično primerjavo kontrolne skupine s topilom in kontrolne skupine z vodo za redčenje. Najpomembnejše končne točke, ki jih je treba obravnavati v tej analizi, so dejavniki rasti (teža), saj lahko nanje vplivajo splošne toksičnosti. Če se pri teh končnih točkah ugotovijo statistično značilne razlike med kontrolno skupino z vodo za redčenje in kontrolno skupino s topilom, je treba za ugotovitev, ali je veljavnost preskusa ogrožena, uporabiti najboljšo strokovno presojo. Če se dve kontrolni skupini razlikujeta, je treba tretirane skupine, izpostavljene kemikaliji, primerjati s kontrolo s topilom, razen če je znano, da je zaželena primerjava s kontrolo z vodo za redčenje. Če med dvema kontrolnima skupinama ni statistično značilne razlike, se priporoča, da se tretirane skupine, izpostavljene preskusni kemikaliji, primerjajo z združenima kontrolnima skupinama (kontrolno skupino s topilom in kontrolno skupino z vodo za redčenje), razen če je znano, da je zaželena le primerjava s kontrolno skupino z vodo za redčenje ali kontrolno skupino s topilom.

## Poročilo o preskusu

59. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

*Preskusna kemikalija: fizikalne lastnosti in, če je ustrezno, fizikalno-kemijske lastnosti;*

- kemijski identifikacijski podatki.

Snov iz ene sestavine:

- fizični videz, topnost v vodi in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti;
- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo itd. (vključno z vsebnostjo organskega ogljika, če je to ustrezno).

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

- čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

*Preskusna vrsta:*

- znanstveno ime, sev, če je na voljo, vir, metoda zbiranja oplojenih iker in nadaljnje ravnanje.

*Preskusni pogoji:*

- obdobje osvetljenosti;
- načrt preskusa (npr. velikost, material in vodna prostornina komor, število preskusnih komor in ponovljenih vzorcev, število izvaljenih ličink na ponovljeni vzorec);

- metoda priprave osnovnih raztopin in pogostost obnavljanja (navesti je treba sredstvo za raztapljanje in njegovo koncentracijo, če je uporabljeno);
- metoda odmerjanja preskusne kemikalije (npr. črpalke, sistemi za redčenje);
- analitski izkoristek metode in nominalne preskusne koncentracije, meja določljivosti, srednje izmerjene vrednosti in njihovi standardni odkloni v preskusnih posodah ter metoda, po kateri so bile pridobljene, in dokazi, da se meritve nanašajo na koncentracije preskusne kemikalije v dejanski raztopini;
- značilnosti vode za redčenje: pH, trdota, temperatura, koncentracija raztopljenega kisika, ravni preostalega klora (če so bile merjene), skupni organski ogljik (če je bil merjen), suspendirane trdne snovi (če so bile merjene), slanost preskusnega medija (če je bila merjena) in druge izvedene meritve;
- nominalne preskusne koncentracije, srednje izmerjene vrednosti in njihovi standardni odkloni;
- kakovost vode v preskusnih posodah: pH, temperatura (merjena vsak dan) in koncentracija raztopljenega kisika;
- podrobne informacije o hranjenju (npr. vrsta hrane, vir, dana količina in pogostost).

#### *Rezultati:*

- dokazi, da so kontrole izpolnjevale splošna merila za veljavnost;
- podatki za kontrolno skupino (in kontrolo s topilom, kadar se uporabi) in tretirano skupino, kot so izvalitev (valilnost in čas do izvalitve) za F1 in F2, preživetje po izvalitvi za F1, rast (dolžina in telesna teža) za F1, genotipski spol in razlikovanje med spoloma (npr. sekundarne spolne značilnosti na podlagi papil na predrepni plavuti in histologije spolnih žlez) za F1, fenotipski spol za F1, sekundarne spolne značilnosti (papile na predrepni plavuti) za F1, mRNK vtg (ali protein VTG) za F1, histopatološka ocena (spolne žleze, jetra in ledvice) za F1 in razmnoževanje (plodnost in fertilnost) za F0, F1; (glej preglednici 1 in 2);
- pristop k statistični analizi (regresijska analiza ali analiza variance) in obdelava podatkov (uporabljeni statistični testi in modeli);
- koncentracija brez opaznega učinka (NOEC) za vsak ocenjeni odziv;
- najnižja koncentracija z opaženim učinkom (LOEC) ) za vsak ocenjeni odziv ( $p = 0,05$ );  $EC_x$  za vsak ocenjeni odziv, če je ustrezno, intervali zaupanja (npr. 90- ali 95-odstotni) in graf prilagojenega modela, uporabljenega za izračun, naklon krivulje odziva na koncentracijo, formula regresijskega modela, ocenjeni parametri modela in njihove standardne napake;

- vsako odstopanje od te preskusne metode in odkloni od meril za sprejemljivost ter razmisleki o morebitnih posledicah za rezultat preskusa.
60. Za rezultate meritev končnih točk je treba predstaviti srednje vrednosti in njihove standardne odklone (na podlagi ponovljenih vzorcev in koncentracij, če je mogoče).

## VIRI

- (1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 171), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (1) Padilla, S., Cowden, J., Hinton, D. E., Yuen, B., Law, S., Kullman, S. W., Johnson, R., Hardman, R. C., Flynn, K., in Au, D. W. T. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. *Current Protocols in Toxicology* 39: 1–36.
- (2) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 150), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (3) Benoit, D. A., Mattson, V. R., Olson, D. L. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. *Water Research* 16: 457–464.
- (4) Yokota, H., Tsuruda, Y., Maeda, M., Oshima, Y., Tadokoro, H., Nakazono, A., Honjo, T., in 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., in Kobayashi, K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2552–2560.
- (6) Kang, I. J., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Yamaguchi, T., Maeda, M., Imada, N., Tadokoro, H., in Honjo, T. (2002). Effects of 17 $\beta$ -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., in 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., in 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., in Tatarazako, N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to

- 17 $\beta$ -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., in Tatarazako, N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 $\beta$ -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., in 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. Na voljo na: <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html>.
- (13) Adolfsson-Erici, M., Åkerman, G., Jahnke, A., Mayer, P., in 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 (št. 23.), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (15) Hutchinson, T. H., Shillabeer, N., Winter, M. J., in Pickford, D. B. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. *Aquatic Toxicology* 76: 69–92.
- (16) Denny, J. S., Spehar, R. L., Mead, K. E., in Yousuff, S. C. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.
- (17) Koger, C. S., Teh, S. J., in Hinton, D. E. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Biology of Reproduction* 61: 1287–1293.
- (18) Kinoshita, M., Murata, K., Naruse, K., in Tanaka, M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.
- (19) Gormley, K., in 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) Poglavje C.15 te priloge: Ribe, preskus kratkotrajne toksičnosti na embriih in mladiah s hranilnim mešičkom.
- (21) Poglavje C.37 te priloge: 21-dnevni preskus rib: Kratkotrajno presejalno preskušanje estrogenega in androgenega delovanja ter zaviranja aromataze.
- (22) Poglavje C.41 te priloge: Preskus spolnega razvoja rib.
- (23) Poglavje C.48 te priloge: Kratkotrajni preskus razmnoževanja rib.
- (24) Poglavje C.47 te priloge: Ribe, preskus toksičnosti za zgodnje razvojne stopnje.
- (25) Poglavje C.49 te priloge: Preskus akutne toksičnosti ribjega zarodka.
- (26) Wheeler, J. R., Panter, G. H., Weltje, L., in Thorpe, K. L. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. *Chemosphere* 92: 1067–1076.
- (27) Tatarazako, N., Koshio, M., Hori, H., Morita, M., in 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 (št. 227). Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (29) Nanda, I., Hornung, U., Kondo, M., Schmid, M., in Scharthl, 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., in 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, Pariz.
- (32) Green, J. W., Springer, T. A., Saulnier, A. N., in Swintek, J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1108–1116.



DODATEK 1**OPREDELITVE POJMOV**

**Kemikalija:** snov ali zmes.

**ELISA:** encimski imunski test.

**Plodnost** = število iker.

**Fertilnost** = število viabilnih iker/plodnost.

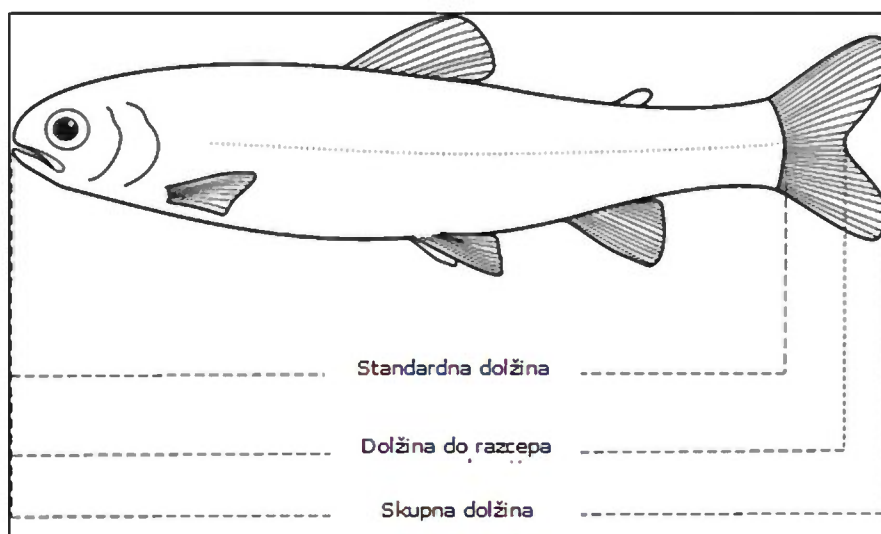
**Dolžina do razcepa repne plavuti (FL):** je dolžina od konice nosu do konca zajede med repnima plavutnicama in se uporablja za ribe, pri katerih je težko določiti, kje se konča hrbtenica ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)).

**Valilnost** = izvaljene ličinke/število zarodkov, vloženih v inkubator.

**IACUC:** odbor za varstvo in uporabo živali v laboratorijskih poskusih (Institutional Animal Care and Use Committee).

**Standardna dolžina (SL):** je dolžina ribe od konice nosu do posteriornega konca zadnjega hrbtениčnega vretenca ali posteriornega konca osrednjega dela hipuralne plošče, kjer se konča hrbtenica. Ta meritev torej ne vključuje dolžine repne plavuti ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)).

**Skupna dolžina (TL):** je dolžina od konice nosu do skrajnega dela daljšega režnja repne plavuti in se običajno izmeri tako, da sta režnja stisnjena ob sredinski črti. To je meritev, ki se izvede v ravni črti in ne upošteva oblike telesa ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)).



**Slika 1:** Opis različnih uporabljenih dolžin

**EC<sub>x</sub>**: (učinkovita koncentracija za x-odstotni učinek) je koncentracija, ki v primerjavi s kontrolo povzroči x-odstotni učinek na preskusni organizem v danem obdobju izpostavljenosti. EC<sub>50</sub> je na primer koncentracija, pri kateri je ocenjeno, da bo imela v določenem obdobju izpostavljenosti učinek na končno točko preskusa pri 50 % izpostavljene populacije.

**Pretočni preskus**: preskus, pri katerem se preskusne raztopine med izpostavljenostjo neprekinjeno pretakajo skozi preskusni sistem.

**Os HPG**: os hipotalamus–hipofiza–spolne žleze.

**IUPAC**: Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo.

**Stopnja obremenitve**: mokra teža rib na prostornino vode.

**Najnižja koncentracija z opaženim učinkom (LOEC)**: je najnižja preskušena koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri se opazi, da ima kemikalija statistično značilen učinek (pri  $p < 0,05$ ) v primerjavi s kontrolo. Vendar bi morale imeti vse preskusne koncentracije nad vrednostjo LOEC škodljiv učinek, ki je enak ali večji od škodljivega učinka, opaženega pri vrednosti LOEC. Če teh dveh pogojev ni mogoče izpolniti, je treba podrobno pojasniti način izbire vrednosti LOEC (in posledično NOEC). Smernice so zajete v dodatkih 5 in 6.

**Srednja smrtna koncentracija (LC<sub>50</sub>)**: je koncentracija preskusne kemikalije, za katero se oceni, da je med preskusom smrtonosna za 50 % preskusnih organizmov.

**Koncentracija brez opaznega učinka (NOEC)**: je preskusna koncentracija takoj pod vrednostjo LOEC, ki v primerjavi s kontrolo nima statistično značilnega učinka ( $p < 0,05$ ) v danem obdobju izpostavljenosti.

**SMILES**: sistem za poenostavljen zapis strukture molekul.

**Gostota rib**: število rib na prostornino vode.

**Preskusna kemikalija**: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

**UVCB**: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

**VTG**: vitelogenin je fosfolipoglikoprotein in predstopnja beljakovin jajčnega rumenjaka, ki se običajno pojavi pri spolno aktivnih samicah vseh oviparnih vrst.

**TPO**: tedni po oploditvi.

DODATEK 2**NEKATERE KEMIJSKE LASTNOSTI SPREJEMLJIVE VODE ZA REDČENJE**

| <b>Snov</b>                                             | <b>Mejna koncentracija</b> |
|---------------------------------------------------------|----------------------------|
| delci                                                   | 5 mg/l                     |
| skupni organski ogljik                                  | 2 mg/l                     |
| neionizirani amoniak                                    | 1 µg/l                     |
| preostali klor                                          | 10 µg/l                    |
| skupni organofosforni pesticidi                         | 50 ng/l                    |
| skupni organoklorni pesticidi in poliklorirani bifenili | 50 ng/l                    |
| skupni organski klor                                    | 25 ng/l                    |
| aluminij                                                | 1 µg/l                     |
| arzen                                                   | 1 µg/l                     |
| krom                                                    | 1 µg/l                     |
| kobalt                                                  | 1 µg/l                     |
| baker                                                   | 1 µg/l                     |
| železo                                                  | 1 µg/l                     |
| svinec                                                  | 1 µg/l                     |
| nikelj                                                  | 1 µg/l                     |
| cink                                                    | 1 µg/l                     |
| kadmij                                                  | 100 ng/l                   |
| živo srebro                                             | 100 ng/l                   |
| srebro                                                  | 100 ng/l                   |

DODATEK 3**PRESKUSNI POGOJI ZA PRESKUS MEOGRT**

- |                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Priporočena vrsta                               | Japonska medaka ( <i>Oryzias latipes</i> ).                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 2. Vrsta preskusa                                  | Kontinuirani pretočni sistem.                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 3. Temperatura vode                                | Nominalna temperatura pri preskusu je 25 °C. Srednja temperatura med celotnim preskusom v vsakem akvariju je od 24 do 26 °C.                                                                                                                                                                            |
| 4. Kakovost osvetlitve                             | Fluorescenčne sijalke (široki spekter in ~ 150 lumnov/m <sup>2</sup> ) (~ 150 luksov).<br><br>16 ur svetlobe, 8 ur teme.                                                                                                                                                                                |
| 6. Stopnja obremenitve                             | F0: 2 odrasla osebka/ponovljeni vzorec; F1: začne se z največ 20 ikrami (zarodki)/ponovljeni vzorec, pri izvalitvi se zmanjša na 12 zarodkov/ponovljeni vzorec, nato na dva odrasla osebka (XX-XY par za razmnoževanje) pri 9. do 10. tpo za fazo razmnoževanja.                                        |
| 7. Najmanjša uporabna prostornina preskusne komore | 1,8 l (npr. velikost preskusne komore: 18 x 9 x 15 cm).                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 8. Izmenjave količine preskusnih raztopin          | Najmanj 5 izmenjav količine/dan do 16 izmenjav količine/dan (ali pretok 20 ml/min).                                                                                                                                                                                                                     |
| 9. Starost preskusnih organizmov na začetku        | F0: > 12 tpo, vendar je priporočljivo, da ne več kot 16 tpo.                                                                                                                                                                                                                                            |
| 10. Število organizmov na ponovljeni vzorec        | F0: 2 ribi (par samca in samice); F1: največ 20 rib (iker)/ponovljeni vzorec (iz parov za razmnoževanje F0 in F1).                                                                                                                                                                                      |
| 11. Število tretiranj                              | 5 tretiranj s preskusno kemikalijo in ustrezne kontrole.                                                                                                                                                                                                                                                |
| 12. Število ponovljenih vzorcev na tretiranje      | Najmanj 6 ponovljenih vzorcev na tretiranje za preskusno kemikalijo in najmanj 12 ponovljenih vzorcev za kontrolo ter za kontrolo s topilom, če se uporabi (število ponovljenih vzorcev je podvojeno v fazi razmnoževanja v F1).                                                                        |
| 13. Število organizmov na preskus                  | Najmanj 84 rib v F0 in 504 v F1. (Če se uporabi kontrola s topilom, potem 108 rib v F0 in 648 v F1.) Enota, ki se šteje, je zarodek v fazi brez mešička.                                                                                                                                                |
| 14. Način hranjenja                                | Ribe se hranijo s solinskimi rakci vrste <i>Artemia</i> (24 ur starimi navpliji) <i>ad libitum</i> , ki se lahko po potrebi dopolnijo s hrano v kosmičih, ki je na voljo na trgu (primer načrta hranjenja za zagotovitev ustrezne rasti in razvoja, da se podpre zanesljivo razmnoževanje, je naveden v |

|                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                      | Dodatku 6).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 15. Prezračevanje                    | Brez prezračevanja, razen če se raztopljeni kisik približa < 60 % vrednosti nasičenosti z zrakom.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 16. Voda za redčenje                 | Čista površinska voda, voda iz vodnjaka ali modelna razredčevalna voda ali deklorirana vodovodna voda.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 17. Obdobje izpostavljenosti         | V glavnem 19 tednov (od F0 do izvalitve F2).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 18. Biološke končne točke (primarne) | Valilnost (F1 in F2); preživetje (F1, od izvalitve do 4. tpo (konec obdobja ličinke/začetek obdobja mladice), od 4. do 9. (ali 10.) tpo (začetek obdobja mladice do obdobja mladostnega osebka) in od 9. do 15. tpo (obdobje mladostnega osebka do konca odraslega osebka)); rast (F1, dolžina in teža pri 9 in 15 tpo); sekundarne spolne značilnosti (F1, papile na predrepni plavuti pri 9 in 15 tpo); vitelogenin (F1, mRNK <i>vtg</i> ali protein VTG pri 15 tpo); fenotipski spol (F1, na podlagi histologije spolnih žlez pri 15 tpo); razmnoževanje (F0 in F1, plodnost in fertilnost za 21 dni); čas do drstenja (F1) in histopatologija (F1, spolne žleze, jetra in ledvice pri 15 tpo). |
| 19. Merila za veljavnost preskusa    | Raztopljeni kisik $\geq 60$ % vrednosti nasičenosti z zrakom; srednja temperatura vode od 24 do 26 °C med celotnim preskusom; uspešno razmnoževanje $\geq 65$ % samic v kontrolah; srednja dnevna plodnost $\geq 20$ iker v kontrolah; valilnost $\geq 80$ -odstotna (povprečno) v kontrolah (v vsaki od generacij F1 in F2); preživetje po izvalitvi do 3. tpo $\geq 80$ -odstotna (povprečno) in od 3. tpo do konca za generacijo $\geq 90$ -odstotna (povprečno) v kontrolah (F1), koncentracije preskusne kemikalije v raztopini je treba zadovoljivo vzdrževati v okviru $\pm 20$ % srednjih izmerjenih vrednosti.                                                                            |

## Dodatek 4

### SMERNICE O OBIČAJNIH KONTROLNIH VREDNOSTIH

Navesti je treba, da te kontrolne vrednosti temeljijo na omejenem številu validacijskih študij in se lahko spremenijo na podlagi nadaljnjih izkušenj.

#### Rast

Teža in dolžina se pri vseh vzorčenih ribah izmerita pri 9 ali (10) in 15 tednih po oploditvi (tpo). Z upoštevanjem tega protokola bo pričakovana mokra teža pri 9 tpo 85–145 mg za samce in 95–150 mg za samice. Pričakovana teža pri 15 tpo je 250–330 mg za samce in 280–350 mg za samice. Čeprav lahko pri posameznih ribah obstajajo precejšnja odstopanja od teh vrednosti, kontrolne srednje teže, ki bistveno odstopajo od teh razponov, zlasti nižje, kažejo na težave s hranjenjem, nadzorom temperature, kakovostjo vode, bolezen ali kombinacijo teh dejavnikov.

#### Izvalitev

Uspešnost izvalitve v kontrolah je običajno približno 90-odstotna, vendar tudi tako nizke vrednosti, kot je 80 %, niso neobičajne. Manj kot 75-odstotna uspešnost izvalitve lahko kaže na nezadostno mešanje razvijajočih se iker ali nezadostno skrb pri ravnanju z njimi, kot je nepravočasna odstranitev odmrlih iker, zaradi česar se lahko razvijejo glivične okužbe.

#### Preživetje

Stopnje preživetja do 3. tpo od izvalitve in po 3. tpo so običajno 90-odstotne ali višje pri kontrolah, vendar tudi tako nizke stopnje preživetja v zgodnjih življenjskih fazah, kot je 80 %, niso skrb vzbujajoče. Manj kot 80-odstotne stopnje preživetja v kontrolah so vzrok za zaskrbljenost in lahko kažejo na nezadostno čiščenje akvarija, ki vodi do izgube larvalnih rib zaradi bolezni ali zadušitve zaradi nizkih ravni raztopljenega kisika. Vzrok za pogine so lahko tudi poškodbe med čiščenjem bazena in izguba larvalnih rib prek sistema odtekanja vode iz akvarija.

#### Gen vitelogenin

Čeprav se lahko absolutne ravni gena *vitelogenin* (*vtg*), izraženega kot kopije/ng celokupne mRNK, med laboratoriji zelo razlikujejo zaradi uporabljenih postopkov ali instrumentov, mora biti delež *vtg* pri kontrolnih samicah približno 200-krat večji kot pri kontrolnih samcih. Nič neobičajnega ni, če to razmerje sega celo od 1 000 do 2 000, vendar pa so razmerja, manjša od 200, sumljiva in lahko kažejo na težave z okužbo vzorca ali težave z uporabljenim postopkom in/ali reagenti.

#### Sekundarne spolne značilnosti

Pri samcih je običajni razpon sekundarnih spolnih značilnosti, opredeljen kot skupno število

segmentov papil na plavutnicah predrepne plavuti, od 40 do 80 segmentov pri 9 do 10 tpo. Pri 15 tpo mora biti razpon pri kontrolnih samcih približno od 80 do 120 in 0 pri kontrolnih samicah. Iz nepojasnjenih razlogov nekateri samci v redkih primerih do 9. tpo nimajo prisotnih papil, ker pa vsi kontrolni samci razvijejo papile do 15. tpo, je vzrok za to verjetno zapoznel razvoj. Prisotnost papil pri kontrolnih samicah kaže na prisotnost XX-samcev v populaciji.

#### XX-samci

Običajna pojavnost XX-samcev v kulturi se zdi približno 4-odstotna ali nižja pri 25 °C, pri čemer se pojavnost zvišuje z zviševanjem temperature. Sprejeti je treba ukrepe za zmanjšanje deleža XX-samcev v populaciji. Ker se zdi, da je pojavnost XX-samcev genetsko pogojena in torej dedna, je spremljanje staleža, ki se goji, in zagotavljanje, da se XX-samci ne uporabijo za razmnoževanje staleža, učinkovito sredstvo za zmanjšanje njihove pojavnosti v populaciji.

#### Drstenje

Drstenje v kontrolnih ponovljenih vzorcih je treba pred oceno plodnosti spremljati dnevno. Pri kontrolnih parih se lahko znaki drstenja ocenijo kvalitativno vizualno. Pri 12 do 14 tpo bi se morala drstiti večina kontrolnih parov. Majhno število drstečih se parov ob tem času kaže na morebitne težave z zdravjem, zrelostjo ali dobrim počutjem rib.

#### Plodnost

Zdrave in dobro hranjene medake pri 12 do 14 tpo se običajno drstijo vsak dan in proizvedejo od 15 do 50 iker na dan. 16 od priporočenih 24 kontrolnih parov za razmnoževanje (> 65 %) mora proizvesti več kot 20 iker na par na dan, lahko pa jih celo 40. Manjše število lahko kaže na nezrele, slabo hranjene ali nezdrave drsteče se pare.

#### Fertilnost

Delež fertilnih iker pri kontrolnih drstečih se parih je običajno v območju 90 %, pri čemer vrednosti, ki znašajo od 95 do 99 %, niso neobičajne. Manj kot 80-odstotne stopnje fertilnosti pri kontrolnih ikrah so sumljive in lahko kažejo na nezdrave osebkke ali pogoje gojenja, ki niso idealni.

## **Dodatek 5**

### **PRIMER NAČRTA HRANJENJA**

V preglednici 1 je prikazan primer načrta hranjenja za zagotovitev ustrezne rasti in razvoja, da se podpre zanesljivo razmnoževanje. Odstopanja od tega načrta hranjenja so sprejemljiva, vendar jih je priporočljivo preskusiti, da se preveri upoštevanje sprejemljive rasti in razmnoževanja. Da bi se upošteval predlagani načrt hranjenja, je treba pred začetkom preskusa določiti suho težo solinskih rakcev na količino kaše iz solinskih rakcev. To se lahko stori s tehtanjem opredeljene količine kaše iz solinskih rakcev, ki se je 24 ur sušila pri 60 °C na predhodno stehtanih posodah. Da bi se upoštevala masa soli v kaši, je treba posušiti tudi enako količino enake raztopine soli, uporabljene v kaši, jo stehtati in odšteti od teže posušene kaše iz solinskih rakcev. Alternativno se lahko solinski rakci pred sušenjem prefiltrirajo in sperejo z destilirano vodo, s čimer se odpravi potreba po merjenju mase 'soli v kaši'. Ta podatek se uporabi za pretvorbo podatka v preglednici iz suhe teže solinskih rakcev v količino kaše iz solinskih rakcev, ki jo je treba dati ribam. Poleg tega je priporočljivo tedensko tehtati alikvote kaše iz solinskih rakcev in s tem preveriti, da se ribam daje pravilna suha teža solinskih rakcev.

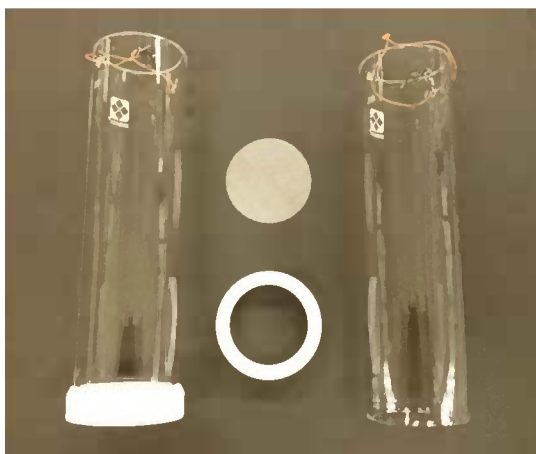


**Preglednica 1:** Primer načrta hranjenja

| <b>Čas (po izvalitvi)</b> | <b>Solinski rakci (mg suhe teže/ribo/dan)</b> |
|---------------------------|-----------------------------------------------|
| 1. dan                    | 0,5                                           |
| 2. dan                    | 0,5                                           |
| 3. dan                    | 0,6                                           |
| 4. dan                    | 0,7                                           |
| 5. dan                    | 0,8                                           |
| 6. dan                    | 1,0                                           |
| 7. dan                    | 1,3                                           |
| 8. dan                    | 1,7                                           |
| 9. dan                    | 2,2                                           |
| 10. dan                   | 2,8                                           |
| 11. dan                   | 3,5                                           |
| 12. dan                   | 4,2                                           |
| 13. dan                   | 4,5                                           |
| 14. dan                   | 4,8                                           |
| 15. dan                   | 5,2                                           |
| 16.–21. dan               | 5,6                                           |
| 4. teden                  | 7,7                                           |
| 5. teden                  | 9,0                                           |
| 6. teden                  | 11,0                                          |
| 7. teden                  | 13,5                                          |
| 8. teden–usmrtitev        | 22,5                                          |

DODATEK 6**PRIMERA INKUBACIJSKE KOMORE ZA IKRE**Primer A

Ta inkubator je sestavljen iz prečno prerezane steklene centrifugirke, ki je povezana z ovojem iz nerjavnega jekla, na mesto pa je pritrjena z vijačno kapico. Iz kapice moli majhna steklena cevka ali cevka iz nerjavnega jekla, ki je nameščena blizu ukrivljenega dna in nežno meša zrak, da so ikre suspendirane in da se zmanjša prenos saprofitskih glivičnih okužb med njimi, obenem pa omogoča tudi izmenjavo kemikalije med inkubatorjem in zadrževalnim akvarijem.

Primer B

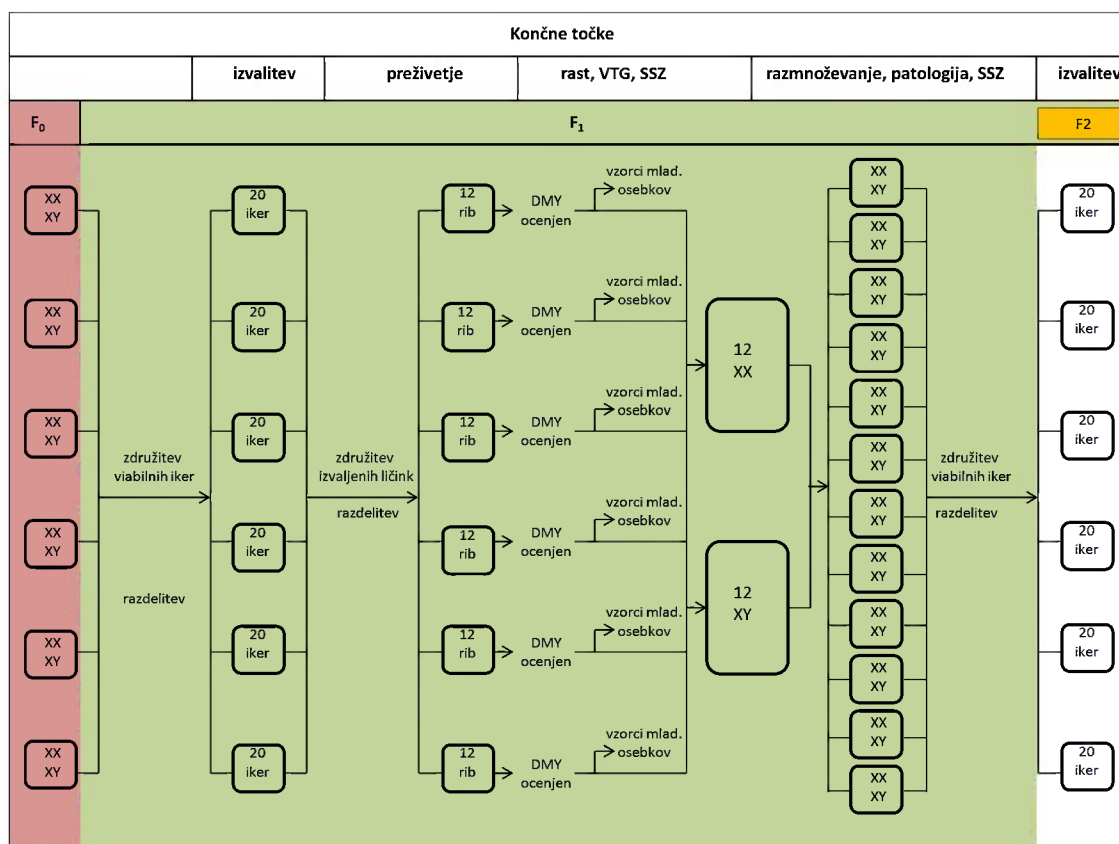


Ta inkubator je sestavljen iz steklenega valjastega telesa (premer 5 cm, višina 10 cm) in nerjavne žičnate mrežice (0,25  $\phi$  in 32 mesh), ki je pritrjena na dno telesa s PTFE-obročkom. Inkubatorji so spuščeni z dvižne prečke v akvarije in se vertikalno stresajo (amplituda približno 5 cm) v ustreznem ciklu (približno vsake 4 sekunde) za ikre medake.

## DODATEK 7

# **SHEMATSKI DIAGRAM ZA ZDRUŽEVANJE IN VKLJUČEVANJE OSEBKOV V PONOVLJENE VZORCE SKOZI CELOTNO PRESKUSNO METODO MEOGRT**

**Slika 1:** Združevanje in vključevanje osebkov v ponovljene vzorce v preskusu MEOGRT. Slika prikazuje eno tretiranje ali  $\frac{1}{2}$  kontrole. Zaradi združevanja identiteta ponovljenega vzorca ni stalna skozi celoten preskus. Upoštevajte, da se izraz 'ikre' nanaša na viabilne, oplojene ikre (enakovredne zarodkom).



## **Tretiranja in ponovitve**

V tej preskusni metodi se priporoča pet tretiranj s preskusno kemikalijo z uporabo materiala ustrezne tehnične kakovosti in negativna kontrola. Število ponovljenih vzorcev na tretiranje ne ostane konstantno med celotnim preskusom MEOGRT, število ponovljenih vzorcev v kontrolnem tretiranju pa je dvakratnik vsakega posameznega tretiranja s preskusno kemikalijo. V generaciji F<sub>0</sub> je pri vsakem tretiranju s preskusno kemikalijo šest ponovljenih vzorcev, medtem ko je pri negativni kontroli 12 ponovljenih vzorcev. Topila so močno odsvetovana, če pa se uporabijo, je treba v poročilo o preskusu MEOGRT vključiti utemeljitev tako za uporabo topila kot tudi za izbiro topila. Če se uporabi topilo, sta poleg tega potrebni dve vrsti kontrol: (a) kontrola s topilom in (b) negativna kontrola. Vsaka od teh dveh kontrolnih skupin mora vsebovati celoten niz ponovljenih vzorcev na vseh točkah

časovnega okvira preskusa MEOGRT. Ta struktura ponovljenih vzorcev ostane enaka ves čas razvoja preskusnega organizma v generaciji F1 (in F2 do izvalitve). Vendar pa se v fazi odraslih rib, ko se vzpostavijo pari za razmnoževanje generacije F1, število ponovljenih vzorcev s pari za razmnoževanje na tretiranje v optimalnem primeru podvoji; obstaja torej do 12 ponovitvenih parov v vsakem tretiranju s preskusno kemikalijo in 24 ponovitvenih parov v kontrolni skupini (in po potrebi še 24 ponovitvenih parov v kontroli s topilom). Določitev izvalitve iz zarodkov, ki so jih odložili pari F1, se opravi na podlagi enake ponovitvene strukture, kot je bila uporabljena za zarodke, ki so jih odložili pari F0, kar pomeni šest ponovljenih vzorcev na tretiranje s preskusno kemikalijo in 12 ponovljenih vzorcev v kontrolnih skupinah.

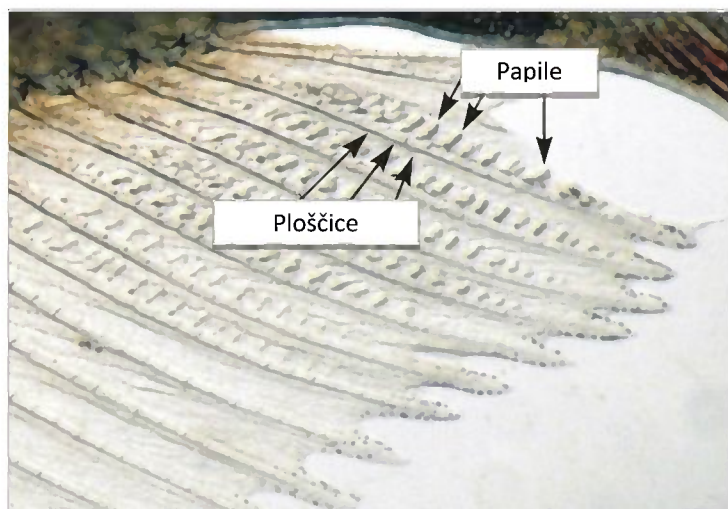
DODATEK 8**ŠTETJE PAPIL NA PREDREPNI PLAVUTI****Glavni materiali in reagenti**

- Stereomikroskop (z neobvezno kamero)
- Fiksativ (npr. Davidsonov (Bouinov ni priporočen)), če se papile ne štejejo po sliki

**Postopki**

Po obdukciji je treba predrepno plavut slikati, da se omogoči ustrezno štetje papil na predrepni plavuti. Čeprav je slikanje priporočena metoda, se lahko predrepna plavut približno 1 minuto fiksira z Davidsonovim ali drugim ustreznim fiksativom. Pomembno je, da je predrepna plavut med fiksiranjem ravna, da se omogoči lažje štetje papil. Trup s predrepno plavutjo se lahko do analize shrani v Davidsonovem ali drugem ustreznem fiksativu. Preštete število ploščic (glej **slika 1**) s papilami, ki štrlijo iz posteriornega roba ploščice.

**Slika 1:** Papile na predrepni plavuti



DODATEK 9**PODROBEN ČASOVNI OKVIR PRESKUSA MEOGRT****1. do 3. teden preskusa (F0)**

Drsteče se ribe generacije F0, ki izpolnjujejo merila za izbiro (glej odstavke od 16 do 20), so izpostavljene tri tedne, da bi bile lahko razvijajoče se gamete in tkivo spolnih žlez izpostavljeni preskusni kemikaliji. Vsak ponovitveni akvarij vključuje en sam par rib za razmnoževanje (par za razmnoževanje XX-samica in XY-samec). Odložene ikre se odvzemajo, štejejo in ocenjujejo glede fertilnosti 21 zaporednih dni, začnši s 1. dnevom preskusa.

**4. teden preskusa (F0 in F1)**

Zaželeno je, da se oplojene in viabilne ikre (zarodki) odvzamejo na isti dan; če zarodkov ni dovolj, pa se lahko odvzamejo v dveh dneh. Če se odvzamejo v dveh dneh, se vsi zarodki v okviru tretiranja, ki so bili odvzeti prvi dan, združijo z zarodki, odvzetimi drugi dan. Nato se vsi združeni zarodki za vsako tretiranje naključno razdelijo v vse ponovitvene inkubatorje, in sicer po 20 zarodkov na inkubator. Vsak dan se preverja in evidentira smrtnost oplojenih iker (zarodkov). Odmrle ikre se odstranijo iz inkubatorjev (odmrle ikre je mogoče zlasti v zgodnjih stopnjah prepoznati po opazni izgubi prosojnosti in spremembi barve, ki jo povzroči koagulacija in/ali obarjanje beljakovin, ki povzročajo bel moten videz; OECD 210).

Opomba: Če je drugi dan odvzema potreben za eno samo tretiranje, morajo temu postopku slediti vsa tretiranja (vključno s kontrolami). Če po drugem dnevu odvzema ni dovolj zarodkov v okviru tretiranja, da bi se v inkubatorje vložilo po 20 zarodkov, zmanjšajte število zarodkov, vloženih v okviru tega določenega tretiranja, na 15 zarodkov na inkubator. Če ni dovolj zarodkov za vložitev 15 zarodkov na inkubator, zmanjšajte število ponovitvenih inkubatorjev, tako da bo dovolj zarodkov za 15 zarodkov na inkubator. Poleg tega se lahko v F0 doda več parov za razmnoževanje na tretiranje in kontrole, da se proizvede več iker za doseg priporočenih 20 zarodkov na ponovljeni vzorec.

Na 24. dan preskusa se pari za razmnoževanje generacije F0 humano usmrtijo, pri čemer se evidentirata teža in dolžina. Po potrebi se lahko pari za razmnoževanje generacije F0 ohranijo še en ali dva dni, da se znova začne generacija F1.

**5. in 6. teden preskusa (F1)**

En do dva dneva pred predvidenim začetkom izvalitve ustavite ali zmanjšajte mešanje iker v inkubatorju, da pospešite izvalitev. Ker se zarodki valijo vsak dan, se izvaljene ličinke združijo po tretiranjih in sistematično razdelijo v vsak ponovitveni akvarij za ličinke v okviru določenega tretiranja, ki ne vsebuje več kot 12 izvaljenih ličink. To se stori tako, da se izvaljene ličinke naključno izberejo in nato nediskriminatorno zaporedoma vključijo v ponovljene vzorce ter tako po vrsti prek ponovljenih vzorcev določenega tretiranja, dokler

ni v vseh ponovljenih vzorcih v okviru tretiranja 12 izvaljenih ličink. Če ni dovolj izvaljenih ličink, da bi zapolnili vse ponovljene vzorce, je treba zagotoviti, da ima čim več ponovljenih vzorcev 12 izvaljenih ličink, da se začne faza F1.

Ikre, ki se niso izvalile do dvakratnika srednjega kontrolnega dne izvalitve, se štejejo za neviabilne in se zavržejo. Število izvaljenih ličink se evidentira in izračuna se uspešnost izvalitve (valilnost) v vsakem ponovljenem vzorcu.

### **7. do 11. teden preskusa (F1)**

Vsak dan se preverja in evidentira preživetje larvalnih rib v vseh ponovljenih vzorcih. Na 43. dan preskusa se evidentirata število preživelih rib v vsakem ponovljenem vzorcu in tudi začetno število izvaljenih ličink, vstavljenih v ponovljeni vzorec (nominalno 12). To omogoča izračun stopnje preživetja od izvalitve do faze mladostnega osebka.

### **Tedni preskusa (F1)**

Na 78.–85. dan preskusa se z repne plavuti vsake ribe odvzame majhen vzorec tkiva za določitev genotipskega spola osebka (tj. odščip plavuti) pri vseh ribah. Ta podatek se uporabi za vzpostavitev parov za razmnoževanje.

V treh dneh po določitvi genotipskega spola vsake ribe se naključno vzpostavi 12 parov za razmnoževanje na tretiranje in 24 parov na kontrolo. Iz vsakega ponovljenega vzorca se naključno izbereta po dve ribi XX in XY, ki se nato združijo po spolu, ter nato naključno izberejo za vzpostavitev para za razmnoževanje (tj. par XX-XY). Vzpostavi se najmanj 12 ponovljenih vzorcev na tretiranje s kemikalijo in najmanj 24 ponovljenih vzorcev za kontrolo z enim parom za razmnoževanje na ponovljeni vzorec. Če v ponovljenem vzorcu ni bodisi dveh rib XX bodisi dveh rib XY, ki so na voljo za združevanje, je treba ribe z ustreznim genotipskim spolom pridobiti iz drugih ponovljenih vzorcev v okviru tretiranja.

Preostale ribe (največ 8 rib na ponovljeni vzorec) se humano usmrtijo in vzorčijo za različne končne točke pri mladostnih osebkih. Podatki o *dmy* (XX ali XY) za vse vzorce mladostnih osebkov se ohranijo za zagotovitev, da je mogoče vse podatke o končnih točkah povezati z genetskim spolom vsake posamezne ribe.

### **13. in 14. teden preskusa (F1)**

Izpostavljenost se nadaljuje, ko se pari mladostnih osebkov za razmnoževanje razvijajo v odrasle ribe. Na 98. dan preskusa (tj. dan pred začetkom odvzema iker) se ikre odstranijo iz akvarijev in s samic.

### **15. do 17. teden preskusa (F1)**

Odložene ikre se odvijajo dnevno 21 zaporednih dni v vsakem ponovljenem vzorcu, ocenita se plodnost in fertilnost.

### **18. teden preskusa (ponovitev 4. tedna preskusa) (F1 in F2)**



Na 120. dan preskusa se zjutraj odvzamejo ikre v vsakem ponovitvenem akvariju. Odvzete ikre se ocenijo, oplojene ikre (z odstranjenimi filamenti) vsakega od parov za razmnoževanje pa se združijo po tretiranjih in sistematično razdelijo v inkubacijske komore za ikre z 20 oplojenimi ikrami na inkubator. Inkubatorji se lahko postavijo v ločene 'inkubacijske akvarije', vzpostavljene za vsako tretiranje, ali v ponovitveni akvarij, ki bo po izvalitvi vseboval izvaljene ličinke. Zaželeno je, da se zarodki odvzamejo na isti dan; če pa jih ni dovolj, se lahko odvzamejo v dveh dneh. Če se odvzamejo v dveh dneh, se vsi zarodki v okviru tretiranj, ki so bili odvzeti prvi dan, združijo z zarodki, odvzetimi drugi dan. Nato se vsi združeni zarodki za vsako tretiranje naključno razdelijo v vse ponovitvene inkubatorje, in sicer po 20 zarodkov na inkubator. Opomba: če je drugi dan odvzema potreben za eno samo tretiranje, morajo temu postopku slediti vsa tretiranja (vključno s kontrolami). Če po drugem dnevu odvzema ni dovolj zarodkov v okviru tretiranja, da bi se v inkubatorje vložilo po 20 zarodkov, zmanjšajte število zarodkov, vloženih v okviru tega določenega tretiranja, na 15 zarodkov na inkubator. Če ni dovolj zarodkov za vložitev 15 zarodkov na inkubator, zmanjšajte število ponovitvenih inkubatorjev, tako da bo dovolj zarodkov za 15 zarodkov na inkubator.

Na 121. dan preskusa (ali 122. dan preskusa, da se zagotovi dober začetek generacije) se pari za razmnoževanje generacije F1 humano usmrtijo in analizirajo za končne točke pri odraslih ribah. Po potrebi se lahko pari za razmnoževanje generacije F1 ohranijo še en ali dva dni, da se znova začne generacija F2.

### **19. in 20. teden preskusa (F2)**

En do dva dneva pred predvidenim začetkom izvalitve ustavite ali zmanjšajte mešanje iker v inkubatorju, da pospešite izvalitev. Če se preskus konča z dokončno izvalitvijo generacije F2, se izvaljene ličinke vsak dan evidentirajo in zavržejo. (Zarodki, ki se niso izvalili po podaljšanem času inkubacije, opredeljenem kot dvakratnik srednjega kontrolnega dne izvalitve, se štejejo za neviabilne.)

## Dodatek 10

### STATISTIČNA ANALIZA

Vrste bioloških podatkov, pridobljenih s preskusom MEOGRT, niso edinstvene zanj, tako da so bile razen za podatke o patologiji razvite številne ustrezne statistične metodologije za pravilno analizo podobnih podatkov, odvisne od značilnosti podatkov, vključno z normalnostjo, homogenostjo variance, s tem, ali načrt študije omogoča preskušanje predpostavk ali regresijsko analizo, parametrske in neparametrske preskusi itd. Na splošno predlagane statistične analize sledijo priporočilom OECD za podatke o ekotoksičnosti (OECD 2006), diagram poteka odločanja za analizo podatkov preskusa MEOGRT pa je prikazan v preglednici 2.

Predvideva se, da bodo podatkovni nizi najpogosteje prikazali monotone odzive. Poleg tega je treba razmisliti o vprašanju uporabe enostranskega statističnega testa v primerjavi z dvostranskim statističnim testom. Razen če obstajajo biološki razlogi, zaradi katerih enostranski test ne bi bil primeren, se predlaga uporaba enostranskih testov. Čeprav so v naslednjem oddelku priporočeni nekateri statistični testi, bodo, če bodo za uporabo za specifične podatke, pridobljene s preskusom MEOGRT, razvite ustrežnejše in/ali močnejše statistične metode, ti statistični testi uporabljeni za okrepitev teh prednosti.

Podatke preskusa MEOGRT je treba analizirati ločeno za vsak genotipski spol. Obstajata dve strategiji za analizo podatkov o ribah z zamenjanim spolom (bodisi XX-samci bodisi XY-samice). (1) Izločite vse podatke o ribah z zamenjanim spolom v celotnem preskusu, razen prevalence zamenjave spola v vsakem ponovljenem vzorcu. (2) Pustite podatke o vseh ribah z zamenjanim spolom v podatkovnem nizu in analizo opravite na podlagi genotipa.

### Histopatološki podatki

Histopatološki podatki se navedejo kot ocene resnosti, ki se določijo z novorazvitim statističnim postopkom, tj. Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS), (Green *et al.*, 2014). Pri Rao-Scottovi prilagoditvi se upoštevajo informacije o ponovitvah v preskusu; postopek *by Slices* vključuje biološko pričakovanje, da se ocene resnosti običajno zvišajo z zvišanjem koncentracij tretiranja. Za vsako diagnozo rezultat RSCABS opredeljuje, v katerih tretiranjih je prevalenca patologije višja kot v kontrolah, in s tem določa povezano stopnjo resnosti.

### Podatki o plodnosti

Analize za podatke o plodnosti vključujejo regresijski test po Jonckheere-Terpstraju ali Williamsov test za določitev učinkov tretiranja, če so podatki skladni z monotonim odzivom na koncentracijo. Pri regresijskem testu se vse primerjave opravijo na ravni značilnosti 0,05, prilagoditev za število opravljenih primerjav pa se ne izvede. Za podatke se pričakuje, da so skladni z monotonim odzivom na koncentracijo, vendar pa je to mogoče preveriti bodisi z vizualnim pregledom podatkov bodisi z oblikovanjem linearnih in kvadratnih kontrastov srednjih vrednosti tretiranj po pretvorbi porazdelitve podatkov. Razen če je kvadratni

kontrast statistično značilen, linearni kontrast pa ne, se izvede trendni test. Sicer se za določitev učinkov tretiranja uporabi Dunnettov test, če so podatki normalno porazdeljeni s homogenostjo varianc. Če te zahteve niso izpolnjene, se uporabi Dunnov test z Bonferonni-Holmovo prilagoditvijo. Vsi navedeni testi se izvedejo neodvisno od kakršnega koli celovitega F-testa ali Kruskal-Wallisovega testa. Več podrobnosti o tem je v OECD 2006.

Uporabijo se lahko alternativne metode, kot je posplošeni linearni model s Poissonovimi napakami za štetje iker (brez pretvorbe), če so statistično utemeljene (Cameron in Trividi, 2013). Če se uporabi alternativni pristop, se priporoča statistično svetovanje.

### Dnevno štetje iker v eni generaciji

Model analize variance ANOVA je podan z enačbo  $Y = \text{čas} * \text{čas} + \text{tretiranje} + * \text{tretiranje} + \text{čas} * \text{tretiranje} + * \text{čas} * \text{tretiranje}$  z naključnimi učinki ponovljenega vzorca (generacija\*tretiranje), in čas\*ponovljeni vzorec (tretiranje), ki dopušča neenake komponente variance obeh vrst po generacijah. Tukaj se čas nanaša na pogostost štetja iker (npr. na dan ali teden). To je analiza ponovljenih meritev s korelacijami med opaznanji pri enakih ponovljenih vzorcih, ki predstavljajo naravo ponovljenih meritev podatkov.

Glavni učinki tretiranja se preskusijo z Dunnettovim (ali Dunnettovim in Hsujevim) testom, pri katerem se opravi prilagoditev za število primerjav. Potrebni sta prilagoditvi za glavni učinek generacije ali časa, saj pri teh dveh dejavnikih ni 'kontrolne' ravni in je vsak par ravni primerjava, ki bi lahko bila zanimiva. Če je za ta dva glavna učinka F-test za glavni učinek statistično značilen na ravni 0,05, potem se lahko parne primerjave po ravneh navedenega faktorja preskusijo na ravni 0,05 brez nadaljnje prilagoditve.

Model vključuje interakcije dveh in treh faktorjev, tako da glavni učinek za, na primer, čas, morda ne bo statistično značilen, čeprav ima čas pomemben učinek na rezultate. Če je torej interakcija dveh ali treh faktorjev, med katerimi je čas, statistično značilna na ravni 0,05, potem se lahko sprejmejo primerjave ravni časa na ravni značilnosti 0,05 brez nadaljnje prilagoditve.

Naslednji so F-testi za statistično značilnost tretiranja v okviru časa, tako imenovana območja v preglednici ANOVA. Če je na primer območje za tretiranje v okviru F1 in časa 12 statistično značilno na ravni 0,05, potem se lahko sprejmejo parne primerjave za tretiranje v okviru F1 in časa 12 na ravni 0,05 brez nadaljnje prilagoditve. Enake izjave veljajo za teste za čas v okviru F1 in tretiranja ter za generacijo v okviru časa in tretiranja.

Nazadnje, za primerjave, ki ne spadajo pod nobeno od navedenih kategorij, je treba primerjave prilagoditi z uporabo Bonferroni-Holmove prilagoditve za p-vrednosti. Dodatne informacije o analizah takih modelov je mogoče najti v Hocking (1985) ter Hochberg in Tamhane (1987).

Alternativno se evidentirajo neobdelani podatki, ki se v poročilu o študiji predstavijo kot plodnost (število iker) na ponovljeni vzorec za vsak dan. Izračunati je treba srednjo vrednost

neobdelanih podatkov ponovljenega vzorca in nato uporabiti transformacijo s kvadratnim korenem. Izračunati je treba enofaktorsko analizo variance ANOVA za transformirane srednje vrednosti ponovljenega vzorca, ki ji sledijo Dunnettovi kontrasti. Morda bo koristno tudi, da se vizualno pregledajo podatki o plodnosti za vsako tretiranje in/ali ponovljeni vzorec z razsevnim grafikonom, ki prikazuje podatke skozi čas. To bo omogočilo neformalno oceno morebitnih učinkov skozi čas.

### Vsi drugi biološki podatki

Statistične analize temeljijo na osnovni predpostavki, da bodo z izbiro pravilnega odmerka podatki monotoni. Za podatke se torej predpostavlja, da so monotoni, pri čemer se monotonost formalno oceni z uporabo linearnih in kvadratnih kontrastov. Če so podatki monotoni, se priporoča trendni test za mediane ponovljenih vzorcev po Jonckheere-Terpstraju (kot je priporočen v OECD 2006). Če je kvadratni kontrast statistično značilen, linearni kontrast pa ne, se šteje, da podatki niso monotoni.

Če podatki niso monotoni, zlasti zaradi zmanjšane odziva enega ali dveh najbolj obremenjenih tretiranj, je treba razmisliti o cenzuriranju podatkovnega niza, tako da se analiza opravi brez navedenih tretiranj. To odločitev bo treba sprejeti na podlagi strokovne presoje in vseh razpoložljivih podatkov, zlasti podatkov, ki kažejo očitno toksičnost na navedenih ravneh tretiranja.

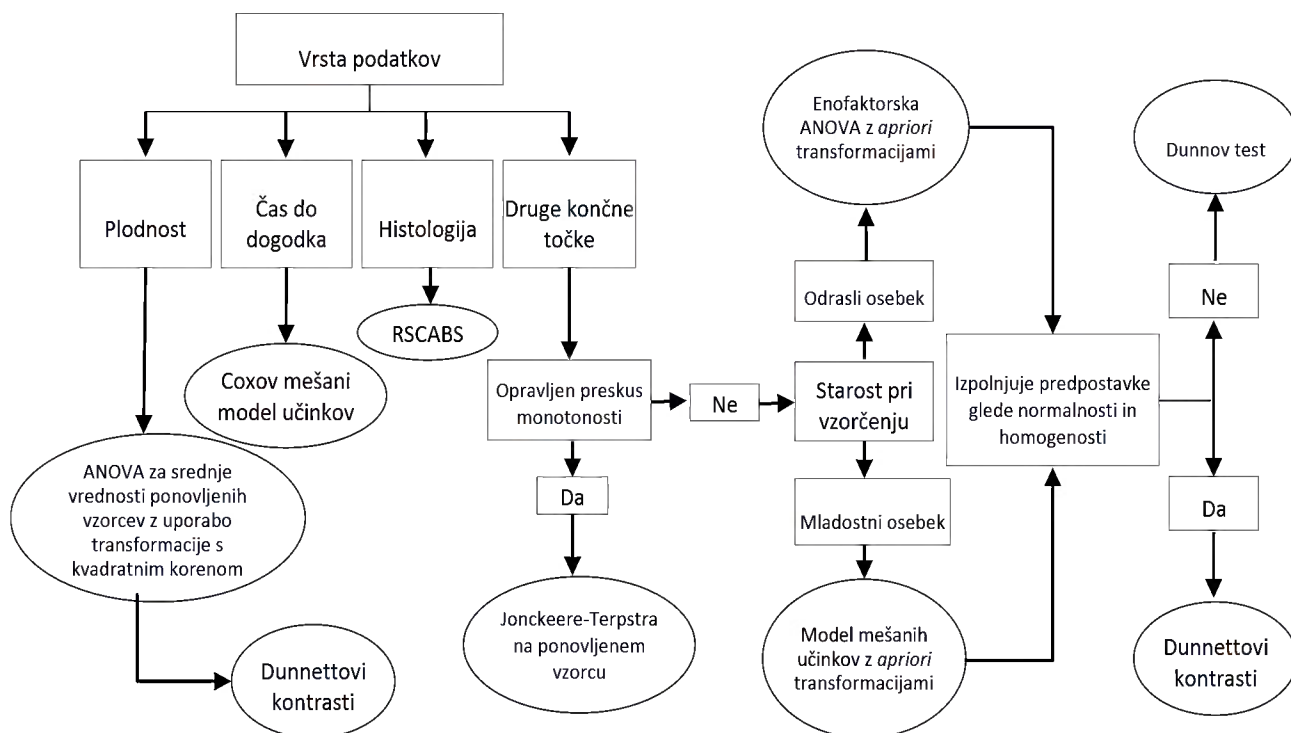
Za težo in dolžino se transformacije ne priporočajo, čeprav bodo občasno morda potrebne. Vendar pa se za podatke o vitelogeninu priporoča logaritemska transformacija; za podatke o SSZ (papile na predrepni plavuti) se priporoča kvadratnokorenska transformacija; arkus-sinus-kvadratnokorenska transformacija se priporoča za podatke o deležu izvalitve, stopnji preživetja, razmerju med spoloma in deležu fertilnih iker. Čas do izvalitve in čas do prvega drstenja je treba obravnavati kot podatke o času do dogodka, pri čemer se posamezni zarodki, ki se ne izvalijo v opredeljenem obdobju, ali ponovljeni vzorci, ki se nikoli ne drstijo, obravnavajo kot desno cenzurirani podatki. Čas do izvalitve je treba izračunati od srednjega dne izvalitve vsakega ponovljenega vzorca. Te končne točke je treba analizirati z uporabo mešanega Coxovega modela sorazmernih tveganj.

Biološki podatki iz vzorcev odraslih rib imajo eno meritev na ponovljeni vzorec, tj. obstaja ena XX- in ena XY-riba na ponovitveni akvarij. Zato je priporočljivo, da se za srednje vrednosti ponovljenega vzorca izvede enofaktorska ANOVA. Če sta predpostavki analize ANOVA (normalnost in homogenost variance, kot sta ocenjeni pri ostankih iz analize ANOVA s Shapiro-Wilkovim testom oziroma Levenovim testom) izpolnjeni, je treba uporabiti Dunnettove kontraste za določitev tretiranj, ki so se razlikovala od kontrole. Če pa predpostavki analize ANOVA nista izpolnjeni, je treba opraviti Dunnov test za določitev, katera tretiranja so se razlikovala od kontrole. Podoben postopek se priporoča za podatke, ki so v obliki odstotkov (plodnost, izvalitev in preživetje).

Biološki podatki iz vzorcev mladostnih osebkov imajo od 1 do 8 meritev na ponovljeni vzorec, tj. lahko obstaja spremenljivo število osebkov, ki prispevajo k srednji vrednosti ponovljenih vzorcev za vsak genotipski spol. Zato se priporoča uporaba mešanega modela

ANOVA in nato Dunnettovih kontrastov, če sta bili predpostavki glede normalnosti in homogenosti variance izpolnjeni (pri ostankih iz mešane analize ANOVA). Če nista bili izpolnjeni, je potreben Dunnov test za določitev, katera tretiranja so se razlikovala od kontrole.

**Slika 2:** Diagram poteka za priporočene statistične postopke za analizo podatkov preskusa MEOGRT



## Viri

- (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, Pariz.
- (2) Cameron, A. C., in Trivedi, P. K. (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.
- (3) Hocking, R. R. (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.
- (4) Hochberg, Y., in Tamhane, A. C. (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

## C.53 PRESKUS RASTI IN RAZVOJA LIČINK DVOŽIVK (LAGDA)

### UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje 241 (2015). Preskus, s katerim se lahko ugotovijo in opredelijo škodljive posledice izpostavljenosti strupenim kemikalijam pri dvoživkah, je treba razviti in validirati zaradi pomislekov, da bi lahko okoljske ravni kemikalij povzročile škodljive učinke za ljudi in prostoživeče živali. V smernici OECD za preskušanje, ki se nanaša na preskus rasti in razvoja ličink dvoživk (LAGDA), je opisan preskus toksičnosti pri dvoživkah, v katerem se obravnavata rast in razvoj od oploditve do zgodnjega juvenilnega obdobja. Pri tem preskusu (ki običajno traja 16 tednov) se ocenijo zgodnji razvoj, preobrazba, preživetje, rast in delna spolna zrelost. Omogoča tudi meritev vrste drugih končnih točk za diagnostično oceno kemikalij, ki so domnevni endokrini motilci (endocrine disrupting chemicals, EDC), ali drugih vrst snovi, ki so strupene za razvoj in razmnoževanje. Metoda, opisana v tej preskusni metodi, je izpeljana iz validacijskega dela v zvezi z navadno krempljarko (*Xenopus laevis*), ki ga je opravila agencija ZDA za varstvo okolja (U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA)), pri čemer je bilo podporno delo opravljeno na Japonskem (1). Čeprav se lahko druge vrste dvoživk prilagodijo podobnemu preskusnemu protokolu za rast in razvoj, pri čemer je pomembna komponenta možnost določitve genetskega spola, se posebne metode in opazovane končne točke, ki so podrobno opisane pri tej preskusni metodi, uporabljajo samo za *Xenopus laevis*.
2. Preskus LAGDA se pri dvoživkah uporablja kot preskus višje stopnje za pridobitev izčrpnih podatkov o škodljivih učinkih glede na razmerje med koncentracijo in odzivom, ki so primerni za uporabo pri ugotavljanju in opredeljevanju nevarnosti ter oceni ekološkega tveganja. Preskus spada na raven 4 temeljnega okvira OECD za preskušanje in ocenjevanje endokrinih motilcev (OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters), na kateri preskusi *in vivo* zagotavljajo tudi podatke o škodljivih učinkih na končne točke, pomembne za endokrini sistem (2). Splošni načrt poskusa zajema izpostavljenost zarodkov *X. laevis* v 8–10. fazi po Nieuwkoopu in Faberju (NF) (3) najmanj štirim različnim koncentracijam preskusne kemikalije (običajno razdeljenim na najmanj pollogaritemske intervale) in kontrole do 10 tednov po srednjem času do 62. faze NF v kontroli, z enim vmesnim podvzorcem v 62. fazi NF ( $\leq 45$  po oploditvi; običajno približno 45 dni (dpo)). Pri vsaki preskusni koncentraciji so štirje ponovljeni vzorci, za kontrolo pa je osem ponovljenih vzorcev. Med končnimi točkami, ki se ocenjujejo med izpostavljenostjo (ob vmesnem podvzorcu in končnem vzorcu ob koncu preskusa), so tiste, ki kažejo na splošno toksičnost: smrtnost, nenormalno obnašanje in dejavnika rasti (dolžina in teža), ter končne točke, ki naj bi označevale posebno endokrino

toksično delovanje, usmerjeno na fiziološke procese, ki jih nadzorujejo estrogeni, androgeni ali ščitnica. Glavni poudarek te metode je na morebitnih učinkih, pomembnih za populacijo (tj. škodljivih učinkih za preživetje, razvoj, rast in reproduktivni razvoj), za izračun koncentracije brez opaznega učinka (NOEC) ali učinkovite koncentracije, ki povzroči x-odstotno spremembo (ECx) v izmerjeni končni točki. Opozoriti je sicer treba, da so pristopi z ECx redko primerni za tovrstne velike študije, pri katerih bo morda povečanje števila preskusnih koncentracij, da se omogoči določitev želene ECx, neizvedljivo. Opozoriti je treba tudi, da metoda ne zajema same reproduktivne faze. Pojmi, uporabljeni v tej preskusni metodi, so opredeljeni v Dodatku 1.

### ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

3. Zaradi omejenega števila preskušanih kemikalij in laboratorijev, vključenih v validacijo tega razmeroma kompleksnega preskusa, in ker do zdaj obnovljivost med laboratoriji ni bila dokumentirana s podatki iz poskusov, se predvideva, da bo smernica OECD za preskušanje 241 pregledana in po potrebi spremenjena glede na pridobljene izkušnje, ko bo na voljo zadostno število študij za ugotovitev učinka tega novega koncepta študije. LAGDA je pomemben preskus za obravnavanje morebitnih dejavnikov, ki prispevajo k zmanjševanju populacije dvoživk, pri katerem se ocenjujejo učinki izpostavljenosti kemikalijam med občutljivo fazo ličinke, v kateri lahko učinki na preživetje in razvoj, vključno z normalnim razvojem reproduktivnih organov, škodljivo vplivajo na populacije.
4. Preskus je zasnovan za odkrivanje učinkov na višjem nivoju, ki izhajajo iz endokrinih in neendokrinih mehanizmov, ter vključuje diagnostične končne točke, ki so delno specifične za ključne endokrine načine delovanja. Opozoriti je treba, da pred razvojem preskusa LAGDA ni obstajal noben validiran preskus, ki bi služil tej funkciji za dvoživke.
5. Pred začetkom preskusa je pomembno imeti informacije o fizikalno-kemijskih lastnostih preskusne kemikalije, zlasti da se omogoči priprava stabilnih raztopin kemikalije. Prav tako je treba imeti ustrezno občutljivo analitsko metodo za preverjanje koncentracij preskusne kemikalije. Za preskus, ki traja približno 16 tednov, je potrebnih skupaj 480 živali, tj. zarodkov *X. laevis* (ali 640 zarodkov, če se uporabi kontrola s topilom), da se zagotovi zadostna moč preskusa za oceno končnih točk, pomembnih za populacijo, kot so rast, razvoj in spolna zrelost.
6. Pred uporabo preskusne metode za regulativno preskušanje zmesi je treba preučiti, ali bo dala sprejemljive rezultate za predvideni regulativni namen. Poleg tega se s tem preskusom plodnost ne ocenjuje neposredno, zato morda ne bo uporaben na poznejši stopnji po ravni 4 temeljnega okvira OECD za preskušanje in ocenjevanje endokrinih motilcev.

## ZNANSTVENA PODLAGA ZA PRESKUSNO METODO

7. Veliko sedanjega znanja o biologiji dvoživk je bilo pridobljenega z uporabo laboratorijske modelne vrste *X. laevis*. Ta vrsta se lahko rutinsko goji v laboratoriju, ovulacija se lahko sproži z uporabo humanega horionskega gonadotropina (hCG), staleži živali pa so na voljo pri komercialnih rejcih.
8. Kot pri vseh vretenčarjih razmnoževanje pri dvoživkah poteka pod nadzorom osi hipotalamus–hipofiza–spolne žleze (HPG) (4). Posredniki v tem endokrinem sistemu so estrogeni in androgeni, ki narekujejo razvoj in fiziologijo spolno dimorfnih tkiv. V življenjskem ciklu dvoživk obstajajo tri ločene faze, ko je ta os še posebno aktivna: (1) diferenciacija spolnih žlez med razvojem ličinke, (2) razvoj sekundarnih spolnih značilnosti in zorenje spolnih žlez v juvenilni fazi ter (3) funkcionalno razmnoževanje odraslih osebkov. V vsaki od teh treh razvojnih faz se lahko pojavijo endokrine motnje, ki jih povzročajo nekatere kemikalije, kot so estrogeni in androgeni, ki nazadnje privedejo do izgube reproduktivne sposobnosti organizmov.
9. Spolne žleze se začnejo razvijati v 43. fazi NF, ko se prvič razvije bipotencialni genitalni greben. Diferenciacija spolnih žlez se začne v 52. fazi NF, ko primordialne zarodne celice bodisi migrirajo v mozgovno tkivo (samci) bodisi ostanejo v kortikalni regiji (samice) razvijajočih se spolnih žlez (3). O dovzetnosti tega procesa spolne diferenciacije spolnih žlez za kemijske spremembe pri *Xenopus* se je prvič poročalo v 50. letih prejšnjega stoletja (5) (6). Izpostavljenost paglavcev estradiolu v tem obdobju diferenciacije spolnih žlez privede do zamenjave spola pri samcih, ki so v odrasli dobi popolnoma funkcionalne samice (7) (8). Mogoča je tudi zamenjava funkcionalnega spola samic v samce, o kateri se je poročalo po vsaditvi tkiva testisov v paglavce (9). Čeprav izpostavljenost inhibitorju aromataze povzroči zamenjavo funkcionalnega spola tudi pri *X. tropicalis* (10), pa ni bilo dokazano, da se to zgodi pri *X. laevis*. V preteklosti so se učinki strupenih snovi na diferenciacijo spolnih žlez ocenjevali s histološkim pregledom spolnih žlez ob preobrazbi, tako da se je zamenjava spola lahko določila le z analizo razmerij med spoloma. Do nedavnega ni bilo sredstev za neposredno določitev genetskega spola *Xenopus*. Vendar pa je zaradi nedavne določitve s spolom povezanih označevalcev pri *X. laevis* mogoče določiti genetski spol, kar omogoča neposredno opredelitev živali z zamenjanim spolom (11).
10. Pri samcih se razvoj juvenilnih osebkov nadaljuje z zvišanjem ravni testosterona v krvi, kar sovпада z razvojem sekundarnih spolnih značilnosti in testisov. Pri samicah jajčniki proizvajajo estradiol, kar povzroči pojav vitelogenina (VTG) v plazmi, vitelogeninskih oocitov v jajčniku in razvoj jajcevodov (12). Jajcevodi so sekundarna spolna značilnost pri samicah in delujejo pri zorenju oocitov med razmnoževanjem. Ko oociti potujejo po jajcevodu in se zberejo v jajčni vrečki, pripravljeni za oploditev, je njihova zunanost obdana s sluzastim ovojem. Zdi se, da razvoj jajcevodov regulirajo estrogeni, saj je



povezan z ravnmi estradiola v krvi pri *X. laevis* (13) in *X. tropicalis* (12). Obstajajo poročila o razvoju jajcevodov pri samcih po izpostavljenosti polikloriranim bifenilom (14) in 4-terc-oktilfenolu (15).

## NAČELO PRESKUSA

11. Načrt preskusa zajema izpostavljenost zarodkov *X. laevis* v 8.–10. fazi NF prek vodne poti štirim različnim koncentracijam preskusne kemikalije in kontrole do 10 tednov po srednjem času do 62. faze NF v kontroli, z enim vmesnim podvzorcem v 62. fazi NF. Čeprav je mogoče visoko hidrofobne kemikalije odmerjati tudi prek hrane, je bilo do danes pridobljenih malo izkušenj z uporabo te poti izpostavljenosti v tem preskusu. Pri vsaki preskusni koncentraciji so štirje ponovljeni vzorci, pri vsaki uporabljeni kontroli pa je osem ponovljenih vzorcev. Med končnimi točkami, ki se ocenjujejo med izpostavljenostjo, so tiste, ki kažejo na splošno toksičnost (tj. smrtnost, nenormalno obnašanje in dejavnika rasti (dolžina in teža)), ter končne točke, ki naj bi označevale posebno endokrino toksično delovanje, usmerjeno na fiziološke procese, ki jih nadzorujejo estrogeni, androgeni ali ščitnica (tj. histopatologija ščitnice, histopatologija spolnih žlez in spolnih vodov, nenormalni razvoj, vitelogenin v plazmi (neobvezno) in razmerja med genotipskim/fenotipskim spolom).

## MERILA ZA VELJAVNOST PRESKUSA

12. Uporabljajo se naslednja merila za veljavnost preskusa:
  - koncentracija raztopljenega kisika mora biti med celotnim preskusom  $\geq 40$  % nasičenosti z zrakom;
  - temperatura vode mora biti v območju  $21 \pm 1$  °C, razlike med ponovljenimi vzorci in med tretiranci pa ne smejo presegati 1,0 °C;
  - pH preskusne raztopine je treba vzdrževati med 6,5 in 8,5, razlike med ponovljenimi vzorci in med tretiranci pa ne smejo presegati 0,5;
  - na voljo morajo biti dokazi, da so se koncentracije preskusne kemikalije v raztopini zadovoljivo vzdrževale v okviru  $\pm 20$  % srednjih izmerjenih vrednosti;
  - smrtnost v obdobju izpostavljenosti mora biti  $\leq 20$ -odstotna v vsakem ponovljenem vzorcu v kontrolah;
  - $\geq 70$ -odstotna viabilnost v mrestu, izbranem za začetek študije;
  - srednji čas do 62. faze NF v kontrolah mora biti  $\leq 45$  dni;

- srednja teža preskusnih organizmov pri 62. fazi NF in ob koncu preskusa v kontrolah in kontrolah s topilom (če se uporabijo) mora biti  $1,0 \pm 0,2$  g oziroma  $11,5 \pm 3$  g.
13. Čeprav to ni merilo za veljavnost, je priporočljivo, da so za analizo na voljo vsaj tri ravni tretiranja s tremi neogroženimi ponovljenimi vzorci. Čezmerna smrtnost, ki ogroža tretiranje, je opredeljena kot  $> 4$  smrtni primeri ( $> 20\%$ ) v dveh ali več ponovljenih vzorcih, ki jih ni mogoče pojasniti s tehnično napako. Za analizo morajo biti na voljo vsaj tri ravni tretiranja brez očitne toksičnosti. Znaki očitne toksičnosti lahko med drugim vključujejo lebdenje na gladini, ležanje na dnu akvarija, obrnjen ali nepravilen način plavanja, odsotnost površinske aktivnosti in neodzivanje na dražljaje, morfološke nenormalnosti (npr. deformacije krakov), hemoragične lezije in edeme v trebušni votlini.
14. Če je ugotovljeno odstopanje od meril za veljavnost preskusa, je treba posledice obravnavati glede na zanesljivost rezultatov preskusa ter ta odstopanja in razmisleke vključiti v poročilo o preskusu.

## OPIS METOD

### Oprema

15. Običajna laboratorijska oprema in zlasti naslednje:

- (a) naprave za nadzor temperature (npr. grelniki ali hladilniki (prilagodljivi do  $21\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ ));
- (b) termometer;
- (c) binokularni stereomikroskop in pripomočki za seciranje;
- (d) digitalni fotoaparati z ločljivostjo vsaj 4 milijone slikovnih točk in funkcijo mikro (po potrebi);
- (e) analitska tehtnica, s katero je mogoče meriti na  $0,001\text{ mg}$  ali  $1\text{ }\mu\text{g}$  natančno;
- (f) merilnik raztopljenega kisika in merilnik vrednosti pH;
- (g) merilnik jakosti svetlobe, s katerim je mogoče meriti v luksih.

### Voda

#### *Vir in kakovost*

16. Uporabi se lahko vsaka lokalno razpoložljiva voda za redčenje (npr. izvirna voda ali vodovodna voda, prečiščena z ogljem), ki omogoča normalno rast in razvoj *X. laevis*, na voljo pa morajo biti dokazi o normalni rasti v tej vodi. Ker se lahko kakovost lokalne vode med posameznimi območji bistveno razlikuje, je treba izvesti analizo kakovosti vode, zlasti če niso na voljo podatki iz preteklih preskusov o uporabi vode za gojenje ličink dvoživk. Meritve težkih kovin (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), glavnih anionov in kationov

(npr.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ), pesticidov, skupnega organskega ogljika in suspendiranih trdnih snovi je treba izvesti pred začetkom preskusa in/ali na primer vsakih šest mesecev, kadar se ve, da je kakovost vode za redčenje relativno konstantna. Nekatere kemijske značilnosti sprejemljive vode za redčenje so navedene v Dodatku 2.

#### *Koncentracija jodida v preskusni vodi*

17. Da lahko ščitnična žleza sintetizira ščitnične hormone za podporo normalni preobrazbi, mora imeti ličinka na voljo dovolj jodida v vodi in hrani. Trenutno ni empiričnih smernic za najmanjše koncentracije jodida v hrani ali vodi za zagotovitev pravilnega razvoja. Vendar lahko razpoložljivost jodida vpliva na odzivnost ščitničnega sistema na snovi, ki vplivajo na ščitnico, in spremeni bazalno aktivnost ščitnične žleze, kar je treba upoštevati pri razlagi rezultatov histopatologije ščitnice. Na podlagi predhodnega dela je bilo dokazano, da je preskus uspešen, kadar so koncentracije jodida ( $\text{I}^-$ ) v vodi za redčenje med 0,5 in 10  $\mu\text{g/l}$ . Najprimernejša najmanjša koncentracija jodida v vodi za redčenje med celotnim preskusom je 0,5  $\mu\text{g/l}$  (dodan kot natrijeva ali kalijeva sol). Če je preskusna voda modelna razredčevalna voda iz deionizirane vode, je treba dodati najmanjšo koncentracija joda, tj. 0,5  $\mu\text{g/l}$ . Izmerjene koncentracije jodida v preskusni vodi (tj. vodi za redčenje) in dodajanje jodovih ali drugih soli v preskusno vodo (če se uporabi) je treba navesti v poročilu. Vsebnost joda se lahko izmeri ne le v preskusni vodi, ampak tudi v hrani.

#### **Sistem izpostavljenosti**

18. Preskus je bil razvit z uporabo pretočnega sistema za redčenje. Sestavni deli sistema, ki pridejo v stik z vodo, morajo biti iz stekla, nerjavnega jekla in/ali drugih kemijsko inertnih materialov. Posode za izpostavljanje morajo biti akvariji iz stekla ali nerjavnega jekla, uporabna prostornina akvarija pa mora biti med 4,0 in 10,0 l (najmanjša globina vode med 10 in 15 cm). Sistem mora podpirati vse koncentracije izpostavljenosti in kontrolo ter po potrebi kontrolo s topilom, s štirimi ponovljenimi vzorci na tretiranje in osmimi v kontrolah. Pretok v posameznem akvariju mora biti konstanten zaradi vzdrževanja bioloških pogojev in izpostavljenosti kemikaliji. Priporočljivo je, da so pretoki ustrezni (npr. najmanj 5 izmenjav v akvarijih na dan), da se prepreči zmanjšanje koncentracije kemikalije zaradi metabolizma preskusnih organizmov in vodnih mikroorganizmov, prisotnih v akvarijih, ali abiotskih poti razkroja (hidroliza, fitoliza) ali disipacije (izhlapevanje, sorpcija). Tretirane akvarije je treba naključno dodeliti na položaj v sistemu izpostavljenosti, da se zmanjšajo potencialni učinki zaradi položaja, vključno z majhnimi razlikami v temperaturi, jakosti svetlobe itd. Več informacij o vzpostavitvi pretočnega sistema izpostavljenosti je na voljo v Standardnih smernicah ASTM za izvajanje preskusov akutne toksičnosti na preskusnih materialih z ribami, velikimi vretenčarji in dvoživkami (16).

### **Dodajanje kemikalije: priprava preskusnih raztopin**

19. Za vnos preskusnih raztopin v sistem izpostavljenosti je treba osnovno raztopino preskusne kemikalije v sistem izpostavljenosti odmerjati z ustrezno črpalko ali drugo napravo. Pretok osnovne raztopine je treba pred začetkom izpostavljenosti umeriti v skladu z analitsko potrditvijo preskusnih raztopin in ga med preskusom redno volumetrično preverjati. Preskusno raztopino v vsaki komori je treba obnavljati z najmanj 5 izmenjavami količine/dan.
  
20. Metoda, ki se uporablja za uvajanje preskusne kemikalije v sistem, se lahko razlikuje glede na njene fizikalno-kemijske lastnosti. Zato je treba pred preskusom pridobiti osnovne informacije o kemikaliji, ki so ustrezne za določitev njene preverljivosti. Med uporabne informacije o specifičnih lastnostih preskusne kemikalije spadajo strukturna formula, molekulska masa, čistost, obstojnost v vodi in na svetlobi,  $pK_a$  in  $K_{ow}$ , topnost v vodi (po možnosti v preskusnem mediju), parni tlak in rezultati preskusa za lahko biološko razgradljivost (preskusna metoda C.4 (17) ali C.29 (18)). Topnost in parni tlak se lahko uporabita za izračun Henryjeve konstante, ki pokaže, ali so verjetne izgube zaradi izhlapevanja preskusne kemikalije. O izvedbi tega preskusa brez zgoraj navedenih informacij je treba skrbno razmisliti, saj bo načrt študije odvisen od fizikalno-kemijskih lastnosti preskusne kemikalije, brez teh podatkov pa bo morda rezultate preskusa težko razložiti ali pa bodo brez pomena. Na voljo mora biti zanesljiva analitska metoda za kvantifikacijo preskusne kemikalije v preskusnih raztopinah z znano in izpričano točnostjo ter mejo zaznavnosti. Vodotopne preskusne kemikalije se lahko raztopijo v alikvotih vode za redčenje pri koncentraciji, ki omogoča dodajanje pri ciljni preskusni koncentraciji v pretočnem sistemu. Za kemikalije, ki so pri sobni temperaturi tekoče ali trdne in zmerno topne v vodi, bodo morda potrebne saturacijske kolone (npr. iz steklene volne) tekočina : tekočina ali tekočina : trdna snov (19). Čeprav je mogoče zelo hidrofbne preskusne kemikalije odmerjati tudi prek hrane, je bilo pridobljenih malo izkušenj z uporabo te poti izpostavljenosti v tem preskusu.
  
21. Preskusne raztopine izbranih koncentracij se pripravijo z redčenjem osnovne raztopine. Osnovno raztopino je treba po možnosti pripraviti preprosto z mešanjem ali stresanjem preskusne kemikalije v vodi za redčenje z mehanskimi sredstvi (npr. z mešanjem in/ali ultrazvokom). Za pridobitev primerno koncentrirane osnovne raztopine se lahko uporabijo saturacijske kolone/sistemi ali metode pasivnega odmerjanja (20). Zaželena je uporaba preskusnega sistema brez pomožnega topila; vendar imajo različne preskusne kemikalije različne fizikalno-kemijske lastnosti, zaradi katerih bodo verjetno potrebni različni pristopi za pripravo vode za izpostavljenost kemikalijam. Čim bolj si je treba prizadevati za neuporabo topil ali nosilcev, ker: (1) lahko nekatera topila povzročijo toksičnost in/ali neželene ali nepričakovane odzive, (2) lahko preskušanje kemikalij nad njihovo vodotopnostjo (kar se lahko pogosto zgodi pri uporabi topil) privede do netočnih določitev

učinkovitih koncentracij, (3) lahko uporaba topil v dolgotrajnejših preskusih privede do znatne stopnje razvoja biofilma, povezanega z mikrobno dejavnostjo, kar lahko vpliva na okoljske pogoje in zmožnost vzdrževanja koncentracij izpostavljenosti, ter (4) ob neobstoju preteklih podatkov, ki kažejo, da topilo ne vpliva na rezultat študije, uporaba topil zahteva kontrolno tretiranje s topilom, kar ima precejšnje posledice za dobrobit živali, saj so za izvedbo preskusa potrebne dodatne živali. Za kemikalije, ki jih je težko preskusiti, se lahko kot zadnja rešitev uporabi topilo, pri čemer je treba za določitev najboljše metode upoštevati Smernico OECD za preskušanje toksičnosti zahtevnih snovi in zmesi v vodnem okolju (21). Topilo se izbere na podlagi kemijskih lastnosti preskusne kemikalije in razpoložljivosti preteklih kontrolnih podatkov o topilu. Ob neobstoju preteklih podatkov je treba primernost topila določiti pred izvedbo dokončne študije. Če se uporabi topila ni mogoče izogniti in se pojavi mikrobna dejavnost (razvoj biofilma), se priporoča evidentiranje/sporočanje razvoja biofilma po akvarijih (vsaj tedensko) med celotnim preskusom. V idealnih razmerah bi morala biti koncentracija topila konstantna v kontroli s topilom in vseh preskusnih tretiranjih. Če koncentracija topila ni konstantna, je treba v kontroli s topilom uporabiti najvišjo koncentracijo topila v preskusnem tretiranju. Kadar se uporabi topilo kot nosilec, najvišje koncentracije topila ne smejo presegati 100 µl/l ali 100 mg/l (21), priporočljivo pa je tudi, da koncentracija topila ostane čim nižja (npr. ≤ 20 µl/l), da bi se izognili možnim učinkom topila na izmerjene končne točke (22).

## Preskusne živali

### Preskusna vrsta

22. Preskusna vrsta je *X. laevis*, ker: (1) se rutinsko goji v laboratorijih po vsem svetu, (2) se lahko enostavno pridobi prek komercialnih dobaviteljev in (3) je mogoče pri njej določiti genetski spol.

### Oskrba odraslih osebkov in razmnoževanje

23. Ustrezna oskrba in razmnoževanje *X. laevis* sta opisana s standardnimi smernicami (23). Nastanitev in skrb za *X. laevis* je opisal tudi Read (24). Za začetek razmnoževanja se v tri do pet parov odraslih samic in samcev intraperitonealno injicira humani horionski gonadotropin (hCG). V samice in samce se injicira npr. približno 800–1 000 IU oziroma 500–800 IU hCG, raztopljenega v 0,6–0,9-odstotni solni raztopini (npr. Ringerjeva raztopina za žabe, fiziološka raztopina za uporabo pri dvoživkah; [www.hermes.mbl.edu/biologicalbulletin/compendium/comp-RGR.html](http://www.hermes.mbl.edu/biologicalbulletin/compendium/comp-RGR.html)). Injekcijski volumen mora biti približno 10 µl/g telesne teže (~ 1 000 µl). Pari, pri katerih se je začelo razmnoževanje, so nato v velikih akvarijih v okolju, ki jih ne ovira, in v statičnih pogojih, da se spodbuja amplexus. Dno vsakega akvarija za razmnoževanje mora imeti navidežno dno iz mreže iz nerjavnega jekla (npr. 1,25 cm velike odprtine), ki omogoča prehajanje jajčec na dno akvarija. Žabe, v katere je bil hCG injiciran pozno popoldne, običajno

odložijo večino jajčec do sredine naslednjega dopoldneva. Ko je odloženih in oplojenih dovolj jajčec, je treba odrasle osebkke odstraniti iz akvarijev za razmnoževanje. Jajčeca se nato zberejo, sluzast ovoj pa se odstrani s tretiranjem z L-cisteinom (23). Pripraviti je treba 2-odstotno L-cisteinsko raztopino, vrednost pH pa prilagoditi na 8,1 z 1 M NaOH. Ta raztopina s temperaturo 21 °C se doda v 500-mililitrsko erlenmajerico, ki vsebuje jajčeca iz enega samega mresta, nato pa se eno do dve minuti nežno meša in temeljito od 6- do 8-krat spere z vodo za gojenje s temperaturo 21 °C. Jajčeca se nato prenesejo v kristalizirko in ugotovi se > 70-odstotna viabilnost z minimalnimi nenormalnostmi pri zarodkih, pri katerih se delijo celice.

## NAČRT PRESKUSA

### Preskusne koncentracije

24. Priporoča se uporaba najmanj štirih preskusnih koncentracij in ustreznih kontrol (vključno s kontrolami s topilom, če je to potrebno). Na splošno se priporoča razmik med koncentracijami (faktor razmika), ki ne presega 3,2.
25. Za namene tega preskusa je treba pri določitvi najvišje preskusne koncentracije, kolikor je mogoče, uporabiti rezultate iz obstoječih študij dvoživk, da se tako preprečijo očitno strupene koncentracije. K določitvi te koncentracije lahko prispevajo informacije iz, na primer, kvantitativnih razmerij med strukturo in aktivnostjo, navzkrižna branja in podatki iz obstoječih študij dvoživk, kot so preskus preobrazbe dvoživk, preskusna metoda C.38 (25) in preskus teratogeneze embriov žab – *Xenopus* (23) in/ali preskusi na ribah, kot so preskusne metode C.48, C.41 in C.49 (26) (27) (28). Pred izvedbo preskusa LAGDA se lahko izvede poskus za določanje območja. Priporočljivo je, da se izpostavljenost za določanje območja začne v 24 urah od oploditve in nadaljuje od 7 do 14 dni (ali po potrebi več), preskusne koncentracije pa se določijo tako, da intervali med njimi niso večji od faktorja 10. Rezultate poskusa za določanje območja je treba uporabiti za določitev najvišje preskusne koncentracije v preskusu LAGDA. Upoštevajte, da se lahko, če je treba uporabiti topilo, v okviru študije za določanje območja določi tudi primernost topila (tj. ali lahko vpliva na rezultat študije).

### Ponovljeni vzorci v okviru tretiranih skupin in kontrol

26. Uporabiti je treba najmanj štiri ponovitvene akvarije na preskusno koncentracijo in najmanj osem ponovljenih vzorcev za kontrole (in kontrolo s topilom, če je potrebna) (tj. da se zagotovi ustrezna statistična moč, mora biti ponovljenih vzorcev v kontroli in morebitni kontroli s topilom dvakrat toliko kot ponovljenih vzorcev vsake tretirane skupine). Vsak ponovljeni vzorec lahko vsebuje največ 20 živali. Najmanjše število obdelanih žival bi bilo 15 (5 za podvzorec pri 62. fazi NF in 10 mladih osebkov). Vendar

se v vsak ponovljeni vzorec dodajo dodatne živali, da se upošteva možnost pogina, pri čemer se vzdržuje kritično število 15.

## POSTOPEK

### Pregled preskusa

27. Preskus se začne z novoodloženimi zarodki (8.–10. faza NF) in nadaljuje do razvoja mladih osebkov. Živali se pregledujejo dnevno zaradi pogina in kakršnih koli znakov nenormalnega obnašanja. V 62. fazi NF se vzame podvzorec ličink (do 5 živali na ponovljeni vzorec) in preučijo se različne končne točke (preglednica 1). Ko vse živali dosežejo 66. fazo NF, tj. končano preobrazbo (ali 70 dni po začetku preskusa, odvisno od tega, kaj je prej), se izvede naključna izločitev (vendar brez podvzorčenja), da se zmanjša število živali (10 na akvarij) (glej odstavek 43), preostale živali pa ostanejo izpostavljene do 10 tednov po srednjem času do 62. faze NF v kontroli. Ob koncu preskusa (vzorčenje mladih osebkov) se izvedejo dodatne meritve (preglednica 1).

### Pogoji izpostavljenosti

28. Celotni povzetek parametrov preskusa je v Dodatku 3. V obdobju izpostavljenosti je treba vsak dan meriti raztopljeni kisik, temperaturo in vrednost pH preskusnih raztopin. Prevodnost, alkalnost in trdota se merijo enkrat mesečno. Kar zadeva temperaturo vode preskusnih raztopin, razlike med ponovljenimi vzorci in med tretiranjem (v enem dnevu) ne smejo presegati 1,0 °C. Tudi pri pH preskusnih raztopin razlike med ponovljenimi vzorci in med tretiranjem ne smejo presegati 0,5.
29. Izpostavljeni akvariji se lahko vsak dan očistijo z izsesavanjem, da se odstranijo nezaužita hrana in odpadki, pri čemer je treba paziti, da ne pride do navzkrižne kontaminacije akvarijev. Čim bolj je treba zmanjšati stres in travmo za živali, zlasti med seljenjem, čiščenjem akvarija in ravnanjem z njimi. Preprečiti je treba stresne razmere/dejavnosti, kot so glasen in/ali nenehen hrup, trkanje po akvariju, tresljaji v akvariju.

### Trajanje izpostavljenosti preskusni kemikaliji

30. Izpostavljenost se začne z novoodloženimi zarodki (8.–10. faza NF) in nadaljuje do 10 tednov po srednjem času do 62. faze NF ( $\leq 45$  dni od začetka preskusa) v kontrolni skupini. Na splošno preskus LAGDA traja 16 tednov (največ 17 tednov).

### Začetek preskusa

31. Za starše, ki se uporabijo za začetek preskusa, je treba predhodno dokazati, da proizvajajo potomce, ki jim je mogoče določiti genetski spol (Dodatek 5). Po mrestenju odraslih osebkov se zarodki odvzamejo, tretirajo s cisteinom, da se odstrani sluzasti ovoj, in presejejo za viabilnost (23). Tretiranje s cisteinom omogoča ravnanje z zarodki med

presejalnim pregledom, ne da bi se ti prijemali na površine. Presejalni pregled se opravi pod stereomikroskopom z ustrezno veliko kapalko, da se odstranijo neviabilni zarodki. Zaželeno je, da se za preskus uporabi en sam mrest z več kot 70-odstotno viabilnostjo. Zarodki v 8.–10. fazi NF se naključno razdelijo v tretirane akvarije za izpostavljenost, ki vsebujejo ustrezno količino vode za redčenje, dokler ni v vsakem akvariju po 20 zarodkov. Med tem prenosom je treba z zarodki ravnati zelo previdno, da se čim bolj zmanjša stres zaradi prenosa in preprečijo poškodbe. V 96 urah po oploditvi se morajo paglavci premakniti navzgor po vodnem stolpcu in se začeti prijemati na stranice akvarija.

### Način hranjenja

32. Hrana in stopnja hranjenja se v različnih življenjskih fazah *X. laevis* razlikujeta in sta zelo pomemben vidik protokola LAGDA. Čezmerno hranjenje v fazi ličink običajno privede do povečane pojavnosti in resnosti skolioze (Dodatek 8), zato se mu je treba izogibati. Po drugi strani nezadostno hranjenje v fazi ličink privede do zelo različnih hitrosti razvoja med kontrolami, kar lahko ogrozi statistično moč ali vpliva na rezultate preskusa. V Dodatku 4 sta navedena priporočena prehrana in način hranjenja ličink in mladih osebkov *X. laevis* v pretočnih razmerah, vendar pa so dopustne druge možnosti, če preskusni organizmi zadovoljivo rastejo in se razvijajo. Opozoriti je treba, da če se merijo končne točke, specifične za endokrini sistem, mora biti hrana brez endokrinih aktivnih snovi, kot je sojina moka.

#### Hranjenje ličink

33. Priporočena prehrana ličink je sestavljena iz začetne hrane za postrvi, ploščic alg *spirulina* in čipsa za zlate ribice (npr. kosmiči TetraFin®, Tetra, Nemčija), zmešanih skupaj v vodi za gojenje (ali redčenje). Ta mešanica se daje trikrat dnevno ob delovnikih in enkrat dnevno ob koncu tedna. Pglavci se od 8. dne po oploditvi hranijo tudi s 24-ur starimi živimi navplji solinskih rakcev vrste *Artemia*, in sicer dvakrat dnevno ob delovnikih in enkrat dnevno ob koncu tedna. Hranjenje ličink, ki mora biti skladno v vseh preskusnih posodah, mora omogočati ustrezno rast in razvoj preskusnih živali, da se zagotovita obnovljivost in prenosljivost rezultatov preskusa: (1) srednji čas do 62. faze NF v kontrolah mora biti  $\leq 45$  dni in (2) pri 62. fazi NF v kontrolah je priporočena srednja teža v območju  $1,0 \pm 0,2$  g.

#### Hranjenje mladih osebkov

34. Ko je preobrazba končana, je prehrana sestavljena iz visokokakovostne toneče hrane za žabe, npr. Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, Florida, ZDA) (Dodatek 4). Za žabice (zgodnje mlade osebkke) se peleti na hitro zmeljejo v kavnem mlinčku ali mešalniku ali zdrobijo v možnarju, da se zmanjšajo. Ko so mladi osebki dovolj veliki, da lahko zaužijejo cele pelete, mletje ali drobljenje ni več potrebno. Živali je treba hraniti enkrat dnevno. Tudi hranjenje mladih osebkov mora omogočati ustrezno rast in razvoj



organizmov: pri kontrolnih mladih osebkih je ob koncu preskusa priporočena srednja teža v območju  $11,5 \pm 3$  g.

### **Analitična kemija**

35. Pred začetkom preskusa je treba oceniti stabilnost preskusne kemikalije (npr. topnost, razgradljivost in hlapnost) in določiti vse potrebne analitske metode, na primer na podlagi obstoječih informacij ali znanja. Pri odmerjanju prek vode za redčenje je priporočeno, da se preskusne raztopine iz vsakega ponovitvenega akvarija analizirajo pred začetkom preskusa, da se preveri učinkovitost sistema. V obdobju izpostavljenosti se koncentracije preskusne kemikalije določajo v ustreznih časovnih razmikih, po možnosti vsak teden za vsaj en ponovljeni vzorec v vsaki tretirani skupini, pri čemer se vsak teden rotira med ponovljenimi vzorci iste tretirane skupine. Priporočljivo je, da rezultati temeljijo na izmerjenih koncentracijah. Če pa se je koncentracija preskusne kemikalije v raztopini zadovoljivo vzdrževala znotraj  $\pm 20$  % nominalne koncentracije ves čas preskusa, lahko rezultati temeljijo na nominalnih ali izmerjenih vrednostih. Prav tako je treba tudi koeficient variacije (CV) izmerjenih preskusnih koncentracij v celotnem obdobju preskusa v okviru tretiranja pri vsaki koncentraciji vzdrževati pri največ 20 %. Če izmerjene koncentracije ne ostanejo v območju 80–120 % nominalne koncentracije (kadar se na primer preskušajo zelo biorazgradljive ali adsorptivne kemikalije), je treba koncentracije z učinkom pri pretočnih preskusih določiti in izraziti glede na aritmetično sredino koncentracij.
36. Pretoke vode za redčenje in osnovne raztopine je treba med celotnim trajanjem izpostavljenosti preverjati v ustreznih časovnih razmikih (npr. trikrat tedensko). V primeru kemikalij, ki jih pri nekaterih ali vseh nominalnih koncentracijah ni mogoče zaznati (npr. zaradi hitrega razkroja ali adsorpcije v preskusnih posodah ali opaznega kopičenja kemikalije v telesih izpostavljenih živali), je priporočljivo v vsaki komori prilagoditi stopnjo izmenjave preskusne raztopine, da bi preskusne koncentracije ostale čim bolj konstantne.

### **Opažanja in meritve končnih točk**

37. Med končnimi točkami, ki se ocenjujejo med izpostavljenostjo, so tiste, ki kažejo na toksičnost, vključno s smrtnostjo, nenormalnim obnašanjem, kot so klinični znaki bolezni in/ali splošne toksičnosti, in dejavnika rasti (dolžina in teža)), ter patološke končne točke, ki lahko ustrezajo tako splošni toksičnosti kot tudi endokrinemu delovanju, usmerjenemu na poti, ki jih nadzorujejo estrogeni, androgeni ali ščitnica. Poleg tega se lahko ob koncu preskusa neobvezno izmeri koncentracija VTG v plazmi. Meritev VTG lahko koristi pri razumevanju rezultatov študije v okviru endokrinih mehanizmov za domnevne EDC. Končne točke in časovni okvir meritev so povzeti v preglednici 1.

**Preglednica 1:** Pregled končnih točk preskusa LAGDA

| Končne točke*                                                 | Dnevno | Vmesno vzorčenje<br>(vzorčenje ličink) | Ob koncu preskusa<br>(vzorčenje mladih osebkov) |
|---------------------------------------------------------------|--------|----------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Smrtnost in anomalije                                         | X      |                                        |                                                 |
| Čas do 62. faze NF                                            |        | X                                      |                                                 |
| Histo(pato)logija (ščitnične žleze)                           |        | X                                      |                                                 |
| Morfometrija (rast po teži in dolžini)                        |        | X                                      | X                                               |
| Jetrno-somatski indeks (LSI)                                  |        |                                        | X                                               |
| Razmerje med genetskim/fenotipskim spolom                     |        |                                        | X                                               |
| Histopatologija (spolne žleze, spolni vodi, ledvice in jetra) |        |                                        | X                                               |
| Vitelogenin (VTG) (neobvezno)                                 |        |                                        | X                                               |

\* Vse končne točke se statistično analizirajo.

### Smrtnost in dnevna opazanja

38. Vsak dan je treba pregledati, ali so v preskusnih akvarijih mrtve živali, in evidentirati pogine za posamezne akvarije. Mrtve živali je treba takoj, ko so opažene, odstraniti iz preskusnega akvarija. Razvojno fazo mrtvih živali je treba uvrstiti pred 58. fazo NF (pred pojavom sprednjih krakov), med 58. in 62. fazo NF, med 63. in 66. fazo NF (med 62. fazo NF in popolno resorpcijo repa) ali po 66. fazi NF (po fazi ličinke). Stopnje smrtnosti, ki presegajo 20 %, lahko kažejo neustrezne preskusne pogoje ali očitno toksične učinke preskusne kemikalije. Živali so za pogine, ki jih ne povzroča kemikalija, običajno najbolj občutljive v prvih nekaj dneh razvoja po mrestenju in med metamorfoznim klimaksom. Taka smrtnost je lahko razvidna iz kontrolnih podatkov.
39. Poleg tega je treba evidentirati vsako opaženo nenormalno obnašanje, zelo vidne deformnosti (npr. skoliozo) ali lezije. Opažene primere skolioze je treba prešteti (pojavnost) in oceniti glede na resnost (npr. neopazna – NO, minimalna – 1, zmerna – 2, huda – 3; Dodatek 8). Prizadevati si je treba za zagotovitev, da je prevalenca zmerne in hude skolioze ves čas študije omejena (npr. pod 10 % v kontrolah), čeprav večja prevalenca nenormalnosti v kontrolah ni nujno razlog za ustavitev preskusa. Za normalno obnašanje ličink je značilno, da plavajo v vodnem stolpcu z repom nad glavo, redno ritmično udarjajo z repno plavutjo, redno prihajajo na površino, premikajo škržni poklopec in se odzivajo na dražljaje. Nenormalno obnašanje bi na primer vključevalo lebdenje na gladini, ležanje na dnu akvarija, obrnjen ali nepravilen način plavanja, odsotnost površinske aktivnosti in neodzivanje na dražljaje. Pri živalih po preobrazbi je treba poleg

zgoraj navedenega nenormalnega obnašanja evidentirati tudi velike razlike pri porabi hrane med tretiranci. Velike deformnosti in lezije lahko med drugim vključujejo morfološke nenormalnosti (npr. deformacije krakov), hemoragične lezije, edeme v trebušni votlini in bakterijske ali glivične okužbe. Pojav lezij na glavi mladih osebkov, takoj za nosnicami, je lahko znak nezadostne stopnje vlage. Te ugotovitve so kvalitativne, pri čemer jih je treba obravnavati podobno kot klinične znake bolezni/stresa in jih primerjati s kontrolnimi živalmi. Če je stopnja pojavnosti v izpostavljenih akvarijih večja kot v kontrolnih akvarijih, jo je treba obravnavati kot dokaz očitne toksičnosti.

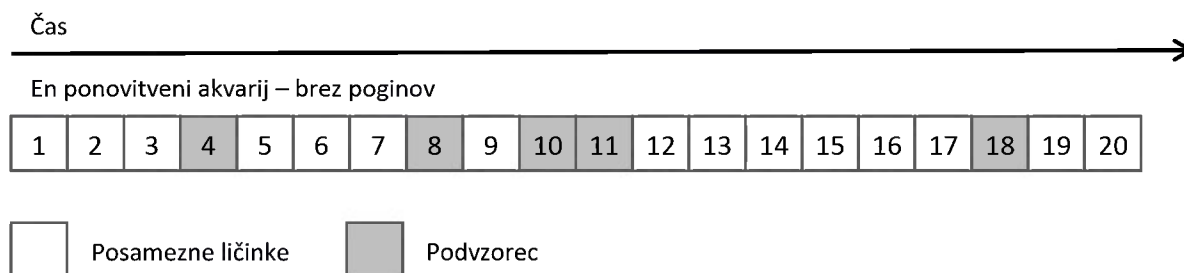
## Podvzorčenje ličink

### *Pregled podvzorčenja ličink*

40. Paglavce, ki so dosegli 62. fazo NF, je treba odstraniti iz akvarijev in jih bodisi vzorčiti ali preseliti v naslednji del izpostavljenosti v novem akvariju bodisi fizično ločiti od preostalih paglavcev v istem akvariju s predelnim elementom. Paglavci se preverjajo vsak dan, pri čemer se evidentira dan študije, ko posamezni paglavci doseže 62. fazo NF. Odločilna značilnost, ki se uporabi pri tej oceni, je oblika glave. Ko se velikost glave zmanjša, tako da je vizualno približno enako široka kot trup paglavca, sprednji krak pa je v višini sredine srca, se za posamezni osebek šteje, da je dosegel 62. fazo NF.
41. Cilj je, da se vzorči skupaj pet paglavcev v 62. fazi NF na ponovitveni akvarij. Vzorčenje mora biti popolnoma naključno, vendar se je treba o njem odločiti predhodno. Hipotetični primer ponovitvenega akvarija je prikazan na **sliki 1**. Če je v posameznem akvariju 20 preživelih paglavcev, ko prvi doseže 62. fazo NF, je treba izbrati pet naključnih števil med 1 in 20. Paglavci #1 je prvi osebek, ki je dosegel 62. fazo NF, paglavci #20 pa osebek v akvariju, ki jo je dosegel zadnji. Podobno je treba izbrati pet naključnih števil med 1 in 18, če je v akvariju 18 preživelih ličink. To je treba opraviti za vsak ponovitveni akvarij, ko prvi osebek v preskusu doseže 62. fazo NF. V primeru poginov med vzorčenjem med 62. fazo NF je treba preostale vzorce naključno prerazporediti glede na to, koliko ličink je ostalo < 62. faze NF in koliko vzorcev je še potrebnih za skupaj pet vzorcev iz zadevnega ponovitvenega akvarija. Na dan, ko paglavci doseže 62. fazo NF, se upošteva pripravljeni načrt vzorčenja, da se določi, ali je treba ta osebek vzorčiti ali fizično ločiti od preostalih paglavcev za nadaljnjo izpostavljenost. V predstavljenem primeru (slika 1) je prvi osebek, ki doseže 62. fazo NF (tj. okence #1), fizično ločen od drugih ličink in še naprej izpostavljen, poleg tega se evidentira dan študije, ko je ta osebek dosegel 62. fazo NF. Nadalje se osebk #2 in #3 obravnavata enako kot osebek #1, osebek #4 pa se nato vzorči za rast in histologijo ščitnice (glede na ta primer). Ta postopek se nadaljuje, dokler se 20. osebek bodisi pridruži preostalim osebkom po 62. fazi NF bodisi vzorči. Z uporabljenim naključnim postopkom je treba vsakemu organizmu, ki se preskuša, zagotoviti enako verjetnost izbire. To je mogoče doseči z uporabo katere koli metode

naključnega vzorca, vendar je treba pri tem na neki točki v obdobju podvzorčenja pri 62. fazi NF tudi ujeti vsakega paglavca.

**Slika 1:** Hipotetični primer načrta vzorčenja pri 62. fazi NF za en ponovitveni akvarij



42. Pri podvzorčenju ličink so pridobljene končne točke: (1) čas do 62. faze NF (tj. število dni med oploditvijo in 62. fazo NF), (2) zunanje nenormalnosti, (3) morfometrija (npr. teža in dolžina) in (4) histologija ščitnice.

#### *Humana usmrnitev paglavcev*

43. Podvzorec paglavcev pri 62. fazi NF (5 osebkov na ponovljeni vzorec) je treba evtanazirati, tako da se za 30 minut potopijo v ustrezne količine (npr. 500 ml) raztopine za anestezijo (npr. 0,3-odstotna raztopina MS-222, trikain metan sulfonat, št. CAS 886-86-2). Raztopino MS-222 je treba pufrati z natrijevim bikarbonatom do vrednosti pH približno 7,0, ker je nepufirana raztopina MS-222 kisla in draži kožo žab, kar povzroči slabo absorpcijo in nepotreben dodaten stres za organizme.
44. Paglavci se z majhnim sakom odstrani iz poskusne komore in prenese (vnese) v raztopino za evtanazijo. Žival je pravilno evtanazirana in pripravljena za obdukcijo, ko se ne odziva na zunanje dražljaje, kot je ščipanje v zadnji krak s kleščami.

#### *Morfometrija (teža in dolžina)*

45. Mokro težo (na mg natančno) in dolžino od ust do zadnjične odprtine (SVL) (na 0,1 mm natančno) vsakega paglavca je treba izmeriti takoj, ko z anestezijo postane neodziven (slika 2a). Za meritev SVL s fotografije se lahko uporabi programska oprema za analizo slike. Paglavce je treba pred tehtanjem osušiti s pivnikom, da se odstrani odvečna adherentna voda. Po meritvah velikosti (teža in SVL) je treba evidentirati ali zapisati vse velike morfološke nenormalnosti in/ali klinične znake toksičnosti, kot so skolioza (glej Dodatek 8), petehije ali hemoragija, priporoča pa se tudi digitalna dokumentacija. Petehije so majhne rdeče ali vijolične krvavitve v kožnih kapilarah.

#### *Odvzem in fiksacija tkiva*

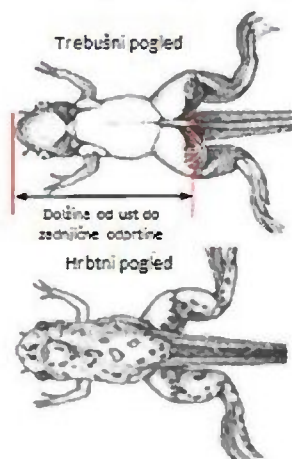
46. Pri podvzorcu ličink se opravi histološka analiza ščitnične žleze. Spodnji del trupa za sprednjimi kraki se odstrani in zavrže. Obrezani trup se fiksira v Davidsonovem fiksativu. Fiksativa mora biti v posodi vsaj desetkrat več od približne prostornine tkiv. Za ustrezno fiksiranje zadevnih tkiv je treba doseči ustrezno mešanje ali kroženje fiksativa. Vsa tkiva ostanejo v Davidsonovem fiksativu najmanj 48 ur, vendar ne več kot 96 ur, nakar se sperejo v deionizirani vodi in shranijo v 10-odstotnem nevtralnem pufranem formalinu (1) (29).

### *Histologija ščitnice*

47. Pri vsakem podvzorcu ličink (fiksirana tkiva) se opravi histološka preiskava ščitnične žleze, tj. diagnoza in ocena resnosti (29) (30).

**Slika 2:** Orientacijske točke za merjenje dolžine od ust do zadnjične odprtine pri preskusu LAGDA pri 62. fazi NF (a) in mladih žabah (b). Odločilne značilnosti pri 62. fazi NF (a): glava je enako široka kot trup, vohalni živec je krajši od premera vohalnega bulbosa (hrbtni pogled), sprednja kraka pa sta v višini srca (trebušni pogled). Slike povzete po Nieuwkoopu in Faberju (1994).

a. Podvzorčenje ličink (62. faza NF)



b. Vzorčenje mladičev



### **Konec izpostavljenosti ličink**

48. Glede na začetno število paglavcev se pričakuje, da bo verjetno majhen delež osebkov, ki se ne bodo razvili normalno in dokončali preobrazbe (66. faza NF) v razumnem času. Izpostavljenost ličink ne sme trajati več kot 70 dni. Vse preostale paglavce ob koncu tega obdobja je treba evtanazirati (glej odstavek 43), izmeriti njihovo mokro težo in SVL, določiti fazo po Nieuwkoopu in Faberju, 1994, ter zabeležiti vse razvojne nenormalnosti.

### **Izločitev po 66. fazi NF**

49. Od 66. faze NF (popolna resorpcija repa) mora do konca izpostavljenosti ostati deset osebkov na akvarij. Ko vse živali dosežejo 66. fazo NF ali po 70 dneh (odvisno od tega,

kaj je prej), je zato potrebna izločitev. Živali po 66. fazi NF, ki ne bodo ostale izpostavljene, je treba izbrati naključno.

50. Živali, ki niso izbrane za nadaljnjo izpostavljenost, se evtanazirajo (glej odstavek 43). Pri vsaki živali se izmerijo razvojna faza, mokra teža in SLV (slika 2b) ter opravi makroskopska obdukcija. Fenotipski spol (na podlagi morfolologije spolnih žlez) se zabeleži kot samica, samec ali nedoločen.

### **Vzorčenje mladih osebkov**

#### *Pregled vzorčenja mladih osebkov*

51. Preostale živali ostanejo izpostavljene do 10 tednov po srednjem času do 62. faze NF v kontroli z vodo za redčenje (in/ali kontroli s topilom, če je ustrezno). Po koncu obdobja izpostavljenosti se preostale živali evtanazirajo (največ 10 žab na ponovljeni vzorec), pri čemer se izmerijo ali ocenijo in evidentirajo različne končne točke: (1) morfometrija (teža in dolžina), (2) razmerja med fenotipskim/genotipskim spolom, (3) teža jeter (jetрно-somatski indeks), (4) histopatologija (spolne žleze, spolni vodi, jetra in ledvice) in neobvezno (5) VTG v plazmi.

#### *Humana usmrnitev žab*

52. Vzorci mladih osebkov, tj. žab po preobrazbi, se evtanazirajo z intraperitonealnim injiciranjem anestetika, npr. 10-odstotnega MS-222 v ustrezni raztopini fosfatnega pufru. Žabe se lahko vzorčijo, ko postanejo neodzivne (približno dve minuti po injiciranju, če se uporabi 10-odstotni MS-222 v odmerku 0,01 ml na g žabe). Čeprav bi se lahko mlade žabe potopile v višjo koncentracijo anestetika (MS-222), so izkušnje pokazale, da anesteziranje po tej metodi traja dlje in da zaradi tega vzorčenje morda ne bo mogoče. Z injiciranjem se zagotovi učinkovita in hitra evtanazija pred vzorčenjem. Vzorčenje se lahko začne šele, ko je potrjena neodzivnost žab, da se zagotovi, da so živali mrtve. Če so pri žabah vidni znaki precejšnjega trpljenja (zelo hudo trpljenje, pogin je mogoče zanesljivo napovedati) in se obravnavajo kot umirajoče, je treba živali anestezirati in evtanazirati ter jih za analizo podatkov obravnavati kot smrtno primere. Kadar se žaba evtanazira zaradi obolevnosti, je to treba zabeležiti in sporočiti. Odvisno od tega, kdaj med študijo je žaba evtanazirana, se lahko žaba zadrži za histopatološko analizo (fiksiranje žabe za morebitno histopatologijo).

#### *Morfometrija (teža in dolžina)*

53. Meritve mokre teže in SLV (slika 2b) so enake meritvam, predstavljenim pri podvzorčenju ličink.

#### *VTG v plazmi (neobvezno)*

54. VTG je splošno sprejet biooznačevalec, ki izhaja iz izpostavljenosti estrogenim kemikalijam. Za preskus LAGDA se lahko pri vzorcih mladih osebkov neobvezno izmeri

VTG v plazmi (to je lahko še posebej ustrezno, kadar se zdi, da je preskusna kemikalija estrogen).

55. Pri evtanaziranem mladem osebkku se odrežeta zadnja kraka in odvzame kri s heparinizirano kapilaro (čeprav so lahko primerne druge metode odvzema krvi, na primer punkcija srca). Kri se iztisne v mikrocentrifugirko (npr. s prostornino 1,5 ml), in ta se centrifugira za pridobitev plazme. Vzorce plazme je treba do določitve VTG hraniti pri  $-70^{\circ}\text{C}$  ali nižji temperaturi. Koncentracija VTG v plazmi se lahko izmeri z metodo encimskega imunskega testa (ELISA) (Dodatek 6) ali drugo metodo, kot je masna spektrometrija (31). Zaradi večje občutljivosti so zaželena protitelesa, specifična za vrsto.

#### *Določitev genetskega spola*

56. Genetski spol vsake mlade žabe se oceni na podlagi označevalcev, ki so jih razvili Yoshimoto *et al.* (11). Za določitev genetskega spola se med seciranjem odvzame del zadnjega kraka (ali cel krak) (ali katerega koli drugega tkiva) in shrani v mikrocentrifugirki (vzorci tkiva žab se lahko vzamejo iz katerega koli tkiva). Do izolacije deoksiribonukleinske kisline (DNK) se lahko tkivo shrani pri  $-20^{\circ}\text{C}$  ali nižji temperaturi. Izolacija DNK iz tkiv se lahko opravi s pripomočki, ki so na voljo na trgu, prisotnost ali odsotnost označevalca pa se analizira z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) (Dodatek 5). Na splošno je ujemanje med histološkim spolom in genotipom pri kontrolnih živalih ob vzorčenju mladih osebkov v kontrolnih skupinah več kot 95-odstotno.

#### *Odvzem in fiksacija tkiva za histopatologijo*

57. Pri končnem vzorčenju se za histološko analizo odvzamejo spolne žleze, spolni vodi, ledvice in jetra. Trebušna votlina se odpre, jetra se izrežejo in stehtajo. Nato se iz spodnjega dela trebušne votline previdno odstranijo prebavni organi (npr. želodec, čreva), da se razkrijejo spolne žleze, ledvice in spolni vodi. Zabeležiti je treba vse velike morfološke nenormalnosti v spolnih žlezah. Nazadnje je treba odstraniti zadnja kraka, če nista bila predhodno odstranjena že za odvzem krvi. Odvzeta jetra in trup s spolnimi žlezami *in situ* je treba nemudoma vnesti v Davidsonov fiksativ. Fiksativa mora biti v posodi vsaj desetkrat več od približne prostornine tkiv. Vsa tkiva ostanejo v Davidsonovem fiksativu najmanj 48 ur, vendar ne več kot 96 ur, nakar se sperejo v deionizirani vodi in shranijo v 10-odstotnem nevtralnem pufranem formalinu (1) (29).

#### *Histopatologija*

58. Pri vsakem vzorcu mladega osebkka se opravi histološka ocena patoloških sprememb v tkivu spolnih žlez, spolnih vodov, jeter in ledvic, tj. diagnoza in ocena resnosti (32). Iz te ocene se izpelje tudi fenotip spolnih žlez (npr. jajčnik, testis, dvospolna), pri čemer se lahko te ugotovitve skupaj z meritvami posameznega genetskega spola uporabijo za izračun razmerij med fenotipskim/genotipskim spolom.

## SPOROČANJE PODATKOV

### Statistična analiza

59. S preskusom LAGDA se pridobijo tri oblike podatkov, ki jih je treba statistično analizirati: (1) kvantitativni kontinuirani podatki (teža, SVL, LSI, VTG), (2) podatki o času do dogodka za razvojne stopnje (tj. dnevih do 62. faze NF od začetka preskusa) in (3) ordinalni podatki v obliki ocen resnosti ali razvojnih faz iz histopatoloških ocen.
60. Priporočljivo je, da načrt preskusa in izbira statističnega testa zagotavljata ustrezno moč opazanja biološko pomembnih sprememb pri končnih točkah, kjer se poroča o NOEC ali ECx. Priporočljivo je, da se pri statističnih analizah podatkov (na splošno na podlagi srednje vrednosti pri ponovljenem vzorcu) upoštevajo postopki, opisani v dokumentu Sedanji pristopi k statistični analizi podatkov o ekotoksičnosti: smernice za uporabo (33). Dodatek 7 te preskusne metode vsebuje priporočeno drevo odločanja za statistično analizo ter smernice za obdelavo podatkov in izbiro najustreznejšega statističnega testa ali modela za uporabo pri preskusu LAGDA.
61. Ker je genotipski spol določen za vse žabe, je treba podatke iz vzorčenja mladih osebkov (npr. rast, LSI) analizirati ločeno za vsak genotipski spol.

### Pomisleki o analizi podatkov

#### *Uporaba ogroženih ponovljenih vzorcev in tretiranja*

62. Ponovljeni vzorci in tretiranja lahko postanejo ogroženi zaradi čezmerne smrtnosti zaradi očitne toksičnosti, bolezni ali tehnične napake. Če je tretiranje ogroženo zaradi bolezni ali tehnične napake, morajo biti za analizo na voljo tri neogrožena tretiranja s tremi neogroženimi ponovljenimi vzorci. Če se očitna toksičnost pojavi v zelo obremenjenih tretiranjih, je zaželeno, da so za analizo na voljo vsaj tri ravni tretiranj s tremi neogroženimi ponovljenimi vzorci (v skladu s pristopom najvišje tolerančne koncentracije za smernice OECD za preskušanje (34)). Znaki očitne toksičnosti lahko poleg smrtnosti vključujejo učinke na obnašanje (npr. lebdenje na gladini, ležanje na dnu akvarija, obrnjen ali nepravilen način plavanja, odsotnost površinske aktivnosti), morfološke lezije (npr. hemoragične lezije, edeme v trebušni votlini) ali inhibicijo normalnih odzivov na hranjenje pri kvalitativni primerjavi s kontrolnimi živalmi.

#### *Kontrola s topilom*

63. Ob koncu preskusa je treba izvesti oceno potencialnih učinkov topila (če se uporabi). Ocena se izvede s statistično primerjavo kontrolne skupine s topilom in kontrolne skupine z vodo za redčenje. Najpomembnejši končni točki, ki ju je treba obravnavati v tej analizi, sta dejavnika rasti (teža in dolžina), saj lahko nanju vplivajo splošne toksičnosti. Če se pri teh končnih točkah ugotovijo statistično značilne razlike med kontrolno skupino z vodo za



redčenje in kontrolno skupino s topilom, je treba za ugotovitev, ali je veljavnost preskusa ogrožena, uporabiti najboljšo strokovno presojo. Če se dve kontrolni skupini razlikujeta, je treba tretirane skupine, izpostavljene kemikaliji, primerjati s kontrolo s topilom, razen če je znano, da je zaželena primerjava s kontrolo z vodo za redčenje. Če med dvema kontrolnima skupinama ni statistično značilne razlike, je priporočljivo, da se tretirane skupine, izpostavljene preskusni kemikaliji, primerjajo z združenima kontrolnima skupinama (kontrolna skupina s topilom in kontrolna skupina z vodo za redčenje), razen če je znano, da je zaželena primerjava le s kontrolno skupino z vodo za redčenje ali kontrolno skupino s topilom.

### **Poročilo o preskusu**

64. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

#### *Preskusna kemikalija:*

- fizikalne lastnosti in, če je ustrezno, fizikalno-kemijske lastnosti;
- snov iz ene sestavine:
  - fizični videz, topnost v vodi in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti;
  - kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo itd. (vključno z vsebnostjo organskega ogljika, če je to ustrezno);
- snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:
  - čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

#### *Preskusna vrsta:*

- znanstveno ime, sev, če je na voljo, vir in metoda zbiranja oplojenih jajčec ter nadaljnje ravnanje;
- pojavnost skolioze v preteklih kontrolah za uporabljeno založno kulturo.

#### *Preskusni pogoji:*

- obdobje osvetljenosti;
- načrt preskusa (npr. velikost, material in vodna prostornina komor, število preskusnih komor in ponovljenih vzorcev, število preskusnih organizmov na ponovljeni vzorec);
- metoda priprave osnovnih raztopin in pogostost obnavljanja (navesti je treba sredstvo za raztapljanje in njegovo koncentracijo, če je uporabljeno);

- metoda odmerjanja preskusne kemikalije (npr. črpalke, sistemi za redčenje);
- analitski izkoristek metode in nominalne preskusne koncentracije, meja določljivosti, srednje izmerjene vrednosti in njihovi standardni odkloni v preskusnih posodah ter metoda, po kateri so bile pridobljene, in dokazi, da se meritve nanašajo na koncentracije preskusne kemikalije v dejanski raztopini;
- značilnosti vode za redčenje: pH, trdota, temperatura, koncentracija raztopljenega kisika, ravni preostalega klora (če so bile merjene), skupni jodid, skupni organski ogljik (če je bil merjen), suspendirane trdne snovi (če so bile merjene), slanost preskusnega medija (če je bila merjena) in druge izvedene meritve;
- nominalne preskusne koncentracije, srednje izmerjene vrednosti in njihovi standardni odkloni;
- kakovost vode v preskusnih posodah: pH, temperatura (dnevna) in koncentracija raztopljenega kisika;
- podrobne informacije o hranjenju (npr. vrsta hrane, vir, dana količina in pogostost).

#### *Rezultati:*

- dokazi, da so kontrole izpolnjevale merila za veljavnost;
  - podatki za kontrolne skupine (in kontrolo s topilom, kadar se uporabi) in tretirane skupine: opaženi smrtnost in nenormalnost, čas do 62. faze NF, histološka ocena ščitnice (samo pri vzorcu ličink), rast (teža in dolžina), LSI (samo pri vzorcu mladih osebkov), razmerje med genetskim/fenotipskim spolom (samo pri vzorcu mladih osebkov), rezultati histopatološke ocene za spolne žleze, spolne vode, ledvice in jetra (samo pri vzorcu mladih osebkov) in VTG v plazmi (samo pri vzorcu mladih osebkov, če se opravi);
  - pristop k statistični analizi in obdelava podatkov (uporabljeni statistični test ali model);
  - koncentracija brez opaznega učinka (NOEC) za vsak ocenjeni odziv;
  - najnižja koncentracija z opaženim učinkom (LOEC) ) za vsak ocenjeni odziv ( $\alpha = 0,05$ ).  $EC_x$  za vsak ocenjeni odziv, če je ustrezno, intervali zaupanja (npr. 95-odstotni) in graf prilagojenega modela, uporabljenega za izračun, naklon krivulje odziva na koncentracijo, formula regresijskega modela, ocenjeni parametri modela in njihove standardne napake;
  - vsako odstopanje od preskusne metode in odkloni od meril za sprejemljivost ter razmisleki o morebitnih posledicah za rezultat preskusa.
65. Za rezultate meritev končnih točk je treba predstaviti srednje vrednosti in njihove standardne odklone (na podlagi ponovljenih vzorcev in koncentracij, če je mogoče).

66. Izračunati je treba srednji čas do 62. faze NF v kontrolah in ga predstaviti kot srednjo vrednost median ponovljenih vzorcev in njihovega standardnega odklona. Prav tako je treba za tretiranja izračunati mediano tretiranja in jo predstaviti kot srednjo vrednost median ponovljenih vzorcev in njihovega standardnega odklona.

## VIRI

- (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 (št. 150), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (3) Nieuwkoop, P. D., in Faber, J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, ZDA.
- (4) Kloas, W., in 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., in 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., in Kubo, T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335–340.
- (9) Mikamo, K., in Witschi, E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.
- (10) Olmstead, A. W., Kosian, P. A., Korte, J. J., Holcombe, G. W., Woodis, K., in Degitz, S. J. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143–150.
- (11) Yoshimoto, S., Okada, E., Umemoto, H., Tamura, K., Uno, Y., Nishida-Umehara, C., Matsuda, Y., Takamatsu, N., Shiba, T., in Ito, M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469–2474.

- (12) Olmstead, A. W., Korte, J. J., Woodis, K. K., Bennett, B. A., Ostazeski, S., in Degitz, S. J. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117–123.
- (13) Tobias, M. L., Tomasson, J., in Kelley, D. B. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: 441–448.
- (14) Qin, Z. F., Qin, X. F., Yang, L., Li, H. T., Zhao, X. R., in Xu, X. B. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321–327.
- (15) Porter, K. L., Olmstead, A. W., Kumsher, D. M., Dennis, W. E., Sprando, R. L., Holcombe, G. W., Korte, J. J., Lindberg-Livingston, A., in Degitz, S. J. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159–169.
- (16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Filadelfija, Pensilvanija, ZDA.
- (17) Poglavje C.4 te priloge: Določanje ‚dobre‘ biorazgradljivosti.
- (18) Poglavje C.29 te priloge: Dobra biorazgradljivost – CO<sub>2</sub> v zaprtih posodah (preskus nadprostora).
- (19) Kahl, M. D., Russom, C. L., DeFoe, D. L., in Hammermeister, D. E. (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539–551.
- (20) Adolfsson-Erici, M., Åkerman, G., Jahnke, A., Mayer, P., in McLachlan, M. S. (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593–9.
- (21) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (št. 23), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (22) Hutchinson, T. H., Shillabeer, N., Winter, M. J., in Pickford, D. B. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

- (23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Filadelfija, Pensilvanija, ZDA.
- (24) Read, B. T. (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, Združeno kraljestvo, 84 str.
- (25) Poglavje C.38 te priloge: Preskus preobrazbe dvoživk.
- (26) Poglavje C.48 te priloge: Kratkotrajni preskus razmnoževanja rib.
- (27) Poglavje C.41 te priloge: Preskus spolnega razvoja rib.
- (28) Poglavje C.49 te priloge: Preskus akutne toksičnosti ribjega zarodka.
- (29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 82), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (30) Grim, K. C., Wolfe, M., Braunbeck, T., Iguchi, T., Ohta, Y., Tooi, O., Touart, L., Wolf, D. C., in Tietge, J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415–424.
- (31) Luna, L. G., in 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 (št. 228), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (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 (št. 54), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (34) Hutchinson, T. H., Bögi, C., Winter, M. J., Owens, J. W., 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197–202.

## Dodatek 1

### OPREDELITVE POJMOV

**Končna točka preskusa na višjem nivoju biološke organizacije:** povzroča učinke na ravni populacije.

**Kemikalija:** snov ali zmes.

**ELISA:** encimski imunski test.

**ECx:** (učinkovita koncentracija za x-odstotni učinek) je koncentracija, ki v primerjavi s kontrolo povzroči x-odstotni učinek na preskusni organizem v danem obdobju izpostavljenosti. EC50 je na primer koncentracija, pri kateri je ocenjeno, da bo imela v določenem obdobju izpostavljenosti učinek na končno točko preskusa pri 50 % izpostavljene populacije.

**dpo:** dnevi po oploditvi.

**Pretočni preskus:** preskus, pri katerem se preskusne raztopine med izpostavljenostjo neprekinjeno pretakajo skozi preskusni sistem.

**Os HPG:** os hipotalamus–hipofiza–spolne žleze.

**IUPAC:** Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo.

**Najnižja koncentracija z opaženim učinkom (LOEC):** je najnižja preskušena koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri se opazi, da ima kemikalija statistično značilen učinek (pri  $p < 0,05$ ) v primerjavi s kontrolo. Vendar bi morale imeti vse preskusne koncentracije nad vrednostjo LOEC škodljiv učinek, ki je enak ali večji od škodljivega učinka, opaženega pri vrednosti LOEC. Če teh dveh pogojev ni mogoče izpolniti, je treba podrobno pojasniti način izbire vrednosti LOEC (in posledično NOEC). Smernice so zajete v Dodatku 7.

**Srednja smrtna koncentracija (LC50):** je koncentracija preskusne kemikalije, za katero se oceni, da je med preskusom smrtonosna za 50 % preskusnih organizmov.

**Koncentracija brez opaznega učinka (NOEC):** je preskusna koncentracija takoj pod vrednostjo LOEC, ki v primerjavi s kontrolo nima statistično značilnega učinka ( $p < 0,05$ ) v danem obdobju izpostavljenosti.

**SMILES:** sistem za poenostavljen zapis strukture molekul.

**Preskusna kemikalija:** vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

**UVCB:** snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali

biološki materiali.

**VTG:** vitelogenin je fosfolipoglikoprotein in predstopnja beljakovin jajčnega rumenjaka, ki se običajno pojavi pri spolno aktivnih samicah vseh oviparnih vrst.



**Dodatek 2****NEKATERE KEMIJSKE LASTNOSTI SPREJEMLJIVE VODE ZA REDČENJE**

| <b>Snov</b>                                             | <b>Mejna koncentracija</b> |
|---------------------------------------------------------|----------------------------|
| delci                                                   | 5 mg/l                     |
| skupni organski ogljik                                  | 2 mg/l                     |
| neionizirani amoniak                                    | 1 µg/l                     |
| preostali klor                                          | 10 µg/l                    |
| skupni organofosforni pesticidi                         | 50 ng/l                    |
| skupni organoklorni pesticidi in poliklorirani bifenili | 50 ng/l                    |
| skupni organski klor                                    | 25 ng/l                    |
| aluminij                                                | 1 µg/l                     |
| arzen                                                   | 1 µg/l                     |
| krom                                                    | 1 µg/l                     |
| kobalt                                                  | 1 µg/l                     |
| baker                                                   | 1 µg/l                     |
| železo                                                  | 1 µg/l                     |
| svinec                                                  | 1 µg/l                     |
| nikelj                                                  | 1 µg/l                     |
| cink                                                    | 1 µg/l                     |
| kadmij                                                  | 100 ng/l                   |
| živo srebro                                             | 100 ng/l                   |
| srebro                                                  | 100 ng/l                   |

**Dodatek 3****PRESKUSNI POGOJI ZA PRESKUS LAGDA**

- |                                                               |                                                                                                                                                                                             |
|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Preskusna vrsta                                            | <i>Xenopus laevis</i> .                                                                                                                                                                     |
| 2. Vrsta preskusa                                             | Kontinuirani pretočni sistem.                                                                                                                                                               |
| 3. Temperatura vode                                           | Nominalna temperatura je 21 °C. Srednja temperatura med trajanjem preskusa je $21 \pm 1$ °C (razlike med ponovljenimi vzorci in med tretiranjem ne smejo presegati 1,0 °C).                 |
| 4. Kakovost osvetlitve                                        | Fluorescenčne sijalke (široki spekter), 600–2 000 luksov (lumnov/m <sup>2</sup> ) na površini vode.                                                                                         |
| 5. Obdobje osvetljenosti                                      | 12 ur svetlobe, 12 ur teme.                                                                                                                                                                 |
| 6. Količina preskusne raztopine in preskusna posoda (akvarij) | 4–10 l (najmanjša globina vode 10–15 cm).<br>Akvarij iz stekla ali nerjavnega jekla.                                                                                                        |
| 7. Izmenjave količine preskusnih raztopin                     | Konstantne zaradi vzdrževanja bioloških pogojev in izpostavljenosti kemikaliji (npr. 5 izmenjav količine na akvarij na dan).                                                                |
| 8. Starost preskusnih organizmov na začetku                   | 8.–10. faza po Nieuwkoopu in Faberju (NF).                                                                                                                                                  |
| 9. Število organizmov na ponovljeni vzorec                    | 20 živali (zarodkov)/akvarij (ponovljeni vzorec) ob začetku izpostavljenosti in 10 živali (mladih osebkov)/akvarij (ponovljeni vzorec) po 66. fazi NF do konca izpostavljenosti.            |
| 10. Število tretiranj                                         | Najmanj 4 tretiranja s preskusno kemikalijo in ustrezne kontrole.                                                                                                                           |
| 11. Število ponovljenih vzorcev na tretiranje                 | 4 ponovljeni vzorci na tretiranje za preskusno kemikalijo in 8 ponovljenih vzorcev za kontrole.                                                                                             |
| 12. Število organizmov na preskusno koncentracijo             | Najmanj 80 živali na tretiranje za preskusno kemikalijo in najmanj 160 ponovljenih vzorcev za kontrole.                                                                                     |
| 13. Voda za redčenje                                          | Vsaka voda, ki omogoča normalno rast in razvoj <i>X. laevis</i> (npr. izvirska voda ali vodovodna voda, prečiščena z ogljem).                                                               |
| 14. Prezračevanje                                             | Se ne zahteva, vendar bo prezračevanje akvarijev morda potrebno, če ravni raztopljenega kisika padejo pod priporočene meje in če povečanje pretoka preskusne raztopine doseže zgornjo mejo. |
| 15. Raztopljeni kisik preskusne raztopine                     | Raztopljeni kisik: $\geq 40$ % vrednosti nasičenosti z zrakom ali $\geq 3,5$ mg/l.                                                                                                          |

- |                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 16. pH preskusne raztopine                  | 6,5–8,5 (razlike med ponovljenimi vzorci in med tretiranjem ne smejo presegati 0,5).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 17. Trdota in alkalnost preskusne raztopine | 10–250 mg CaCO <sub>3</sub> /l.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 18. Način hranjenja                         | (Glej Dodatek 4.)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 19. Obdobje izpostavljenosti                | Od 8.–10. faze NF do desetih tednov po srednjem času do 62. faze NF v kontrolni skupini z vodo in/ali topilom (največ 17 tednov).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 20. Biološke končne točke                   | Smrtnost (in nenormalen videz), čas do 62. faze NF (pri vzorcu ličink), histološka ocena ščitnice (pri vzorcu ličink), rast (teža in dolžina), jetrno-somatski indeks (pri vzorcu mladih osebkov), razmerje med genetskim/fenotipskim spolom (pri vzorcu mladih osebkov), rezultati histopatološke ocene za spolne žleze, spolne vode, ledvice in jetra (pri vzorcu mladih osebkov) ter VTG v plazmi (pri vzorcu mladih osebkov, neobvezno).                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 21. Merila za veljavnost preskusa           | Raztopljeni kisik $\geq 40$ % vrednosti nasičenosti z zrakom; srednja temperatura vode mora biti $21 \pm 1$ °C, razlike med ponovljenimi vzorci in med tretiranjem pa morajo biti $< 1,0$ °C; pH preskusne raztopine mora biti med 6,5 in 8,5; smrtnost v kontroli mora biti $\leq 20$ % pri vsakem ponovljenem vzorcu, srednji čas do 62. faze NF v kontroli mora biti $\leq 45$ dni; srednja teža preskusnih organizmov pri 62. fazi NF in ob koncu preskusa v kontrolah in kontrolah s topilom (če se uporabijo) mora biti $1,0 \pm 0,2$ oziroma $11,5 \pm 3$ g; na voljo morajo biti dokazi, da so se koncentracije preskusne kemikalije v raztopini zadovoljivo vzdrževale v okviru $\pm 20$ % srednjih izmerjenih vrednosti. |

**Dodatek 4****NAČIN HRANJENJA**

Opozoriti je treba, da so kljub temu priporočenemu načinu hranjenja dovoljene druge možnosti, če preskusni organizmi ustrezno hitro rastejo in se razvijajo.

**Hranjenje ličink***Pripravek za prehrano ličink*

A. 1 : 1 (v/v) začetna hrana za postrvi: alge/TetraFin® (ali enakovredna hrana)

1. Začetna hrana za postrvi: pri visoki hitrosti mešalnika 20 sekund mešajte 50 g začetne hrane za postrvi (drobna zrnca ali prah) in 300 ml primerne filtrirane vode.
2. Mešanica alge/TetraFin® (ali enakovredna hrana): pri visoki hitrosti mešalnika 40 sekund mešajte 12 g ploščic alg spirulina in 500 ml filtrirane vode, zmešajte 12 g hrane Tetrafin® (ali enakovredne hrane) s 500 ml filtrirane vode in nato obe mešanici združite, da dobite 1 l z 12 g/l alg spirulina in 12 g/l hrane Tetrafin® (ali enakovredne hrane).
3. Zmešajte enake količine zmešane začetne hrane za postrvi in mešanice alge/TetraFin® (ali enakovredne hrane).

B. Solinski rakci:

15 ml jajčec solinskih rakcev se vali v 1 l slane vode (pripravljene tako, da se v 1 l deionizirane vode doda 20 ml NaCl). Po 24-urnem prezračevanju pri sobni temperaturi in konstantni svetlobi se solinski rakci zberejo. Na kratko se pusti, da se solinski rakci usedejo, tako da se za 30 minut ustavi prezračevanje. Ciste, ki splavajo na vrh posode, se odlijejo in zavržejo, rakci pa se pretočijo skozi ustrezne filtre in razredčijo do 30 ml s filtrirano vodo.

*Protokol hranjenja*

V preglednici 1 sta navedeni vrsta in količina hrane, uporabljeni med izpostavljenostjo ličink. Živali je treba od ponedeljka do petka hraniti trikrat dnevno, ob koncih tedna pa enkrat dnevno.

**Preglednica 1:** Način hranjenja ličink *X. laevis* v pretočnih razmerah

| Čas*<br>(po oploditvi)                 | Začetna hrana za postrvi: alge/TetraFin®<br>(ali enakovredna hrana) |                                | Solinski rakci                 |                                |
|----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|                                        | delavnik<br>(trikrat na dan)                                        | konec tedna<br>(enkrat na dan) | delavnik<br>(dvakrat na dan)   | konec tedna<br>(enkrat na dan) |
| <b>4.–14. dan</b><br>(v tednih 0 in 1) | 0,33 ml                                                             | 1,2 ml                         | 0,5 ml<br>(od 8. do 15. dneva) | 0,5 ml<br>(od 8. do 15. dneva) |
| <b>2. teden</b>                        | 0,67 ml                                                             | 2,4 ml                         | 1 ml<br>(od 16. dneva)         | 1 ml<br>(od 16. dneva)         |

|                     |        |        |      |      |
|---------------------|--------|--------|------|------|
| <b>3. teden</b>     | 1,3 ml | 4,0 ml | 1 ml | 1 ml |
| <b>4. teden</b>     | 1,5 ml | 4,0 ml | 1 ml | 1 ml |
| <b>5. teden</b>     | 1,6 ml | 4,4 ml | 1 ml | 1 ml |
| <b>6. teden</b>     | 1,6 ml | 4,6 ml | 1 ml | 1 ml |
| <b>7. teden</b>     | 1,7 ml | 4,6 ml | 1 ml | 1 ml |
| <b>8.–10. teden</b> | 1,7 ml | 4,6 ml | 1 ml | 1 ml |

\* Dan 0 je opredeljen kot dan, ko se injicira hCG.

### Prehod s prehrane za ličinke na prehrano za mlade osebkke

Ko ličinke končajo preobrazbo, preidejo na prehransko formulo za mlade osebkke, kot je pojasnjena spodaj. Pri tem prehodu je treba ob povečanju količine prehrane za mlade osebkke količino prehrane za ličinke zmanjšati. To je mogoče doseči s sorazmernim zmanjševanjem hrane za ličinke ob sorazmernem povečevanju hrane za mlade osebkke, ko vsaka skupina petih paglavcev preseže 62. fazo NF in se približa dokončanju preobrazbe v 66. fazi NF.

### Hranjenje mladih osebkov

#### *Prehrana mladih osebkov*

Ko je preobrazba končana (66. faza), se način hranjenja spremeni v samo visokokakovostno tonečo hrano za žabe v velikosti 3/32 palcev (Xenopus Express™, Florida, ZDA) ali enakovredno hrano.

#### *Pripravek iz zdrobljenih pelet za prehod s prehrane za ličinke na prehrano za mlade osebkke*

Peleti toneče hrane za žabe se na hitro zmeljejo v kavnem mlinčku ali mešalniku ali zdrobijo v možnarju, da se njihova velikost zmanjša za približno tretjino. Ob predolgi obdelavi nastane prah, ki pa se odsvetuje.

#### *Protokol hranjenja*

V **preglednici 2** sta navedeni vrsta in količina hrane, uporabljeni v življenjskih fazah mladih osebkov in odraslih živali. Živali je treba hraniti enkrat dnevno. Opozoriti je treba, da živali med postopkom preobrazbe še naprej prejemajo delež solinskih rakcev, dokler ni preobrazba končana pri > 95 % živali.

Na dan konca preskusa se živali ne smejo hraniti, tako da hrana ne vpliva na meritve teže.

**Preglednica 2:** Način hranjenja mladih osebkov *X. laevis* v pretočnih razmerah. Opozoriti je treba, da živali, ki se niso preobrazile, vključno s tistimi, pri katerih je preobrazba zakasnila zaradi tretiranja s kemikalijo, ne morejo jesti nezdrobljenih peletov.

| <b>Čas<br/>(tedni po srednjem datumu preobrazbe)</b> | <b>Količina zdrobljenih peletov<br/>(v mg na žabico)</b> | <b>Količina celih peletov<br/>(v mg na žabico)</b> |
|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| <b>Ko živali končajo preobrazbo</b>                  | 25                                                       | 0                                                  |
| <b>0.–1. teden</b>                                   | 25                                                       | 28                                                 |
| <b>2.–3. teden</b>                                   | 0                                                        | 110                                                |
| <b>4.–5. teden</b>                                   | 0                                                        | 165                                                |
| <b>6.–9. teden</b>                                   | 0                                                        | 220                                                |

\* Prvi dan tedna 0 je srednji datum preobrazbe pri kontrolnih živalih.

## Dodatek 5

### DOLOČITEV GENETSKEGA SPOLA

Metoda določitve genetskega spola za *Xenopus laevis* temelji na Yoshimoto *et al.*, 2008. Podrobne postopke za genotipizacijo je po potrebi mogoče najti v tej publikaciji. Uporabijo se lahko tudi druge metode (npr. visokozmogljivostna qPCR), če se štejejo za primerne.

#### Začetna oligonukleotida *X. laevis*

##### *Označevalec DM-W*

Smerni začetni oligonukleotid: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Protismerni začetni oligonukleotid: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

##### *Pozitivna kontrola*

Smerni začetni oligonukleotid: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Protismerni začetni oligonukleotid: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

### Prečiščevanje DNK

DNK izolirajte iz mišičnega ali kožnega tkiva, npr. s kompletom Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (cat # 69506) ali podobnim proizvodom v skladu z navodili iz kompleta. DNK se lahko spere iz centrifugiranih kolon z manj pufra, da se dobijo bolj koncentrirani vzorci, če se štejejo za potrebne za PCR. Upoštevajte, da je DNK precej stabilna, zato se je treba izogibati navzkrižni kontaminaciji, zaradi katere bi bili lahko samci napačno opredeljeni kot samice ali obratno.

### PCR

V **preglednici 1** je predstavljen protokol za vzorec z uporabo JumpStart™ Taq iz Sigme.

**Preglednica 1:** Protokol za vzorec z uporabo JumpStart™ Taq iz Sigme

| Osnovna zmes (Master Mix) | 1 x (μl) | [Končna] |
|---------------------------|----------|----------|
| NFW                       | 11       | –        |
| 10 x pufer                | 2,0      | –        |

|                                                          |     |              |
|----------------------------------------------------------|-----|--------------|
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)                                | 2,0 | 2,5 mM       |
| dNTP (10 mM vsak)                                        | 0,4 | 200 µM       |
| Označevalec za začetni oligonukleotid (8 µM)             | 0,8 | 0,3 µM       |
| Označevalec za protismerni začetni oligonukleotid (8 µM) | 0,8 | 0,3 µM       |
| Kontrola za začetni oligonukleotid (8 µM)                | 0,8 | 0,3 µM       |
| Kontrola za protismerni začetni oligonukleotid (8 µM)    | 0,8 | 0,3 µM       |
| JumpStart™ Taq                                           | 0,4 | 0,05 enot/µl |
| Matrična DNK                                             | 1,0 | ~ 200 pg/µl  |

Opomba: Ko pripravljate osnovno zmes, pripravite dodatno količino, da upoštevate morebitne izgube, do katerih lahko pride pri pipetiranju (primer: 25 x je treba uporabiti za samo 24 reakcij).

*Reakcija:*

Osnovna zmes 19,0 µl

Matrica 1,0 µl

Skupaj 20,0 µl

*Profil termopomnoževalnika:*

1. korak 94 °C 1 min
2. korak 94 °C 30 sek
3. korak 60 °C 30 sek
4. korak 72 °C 1 min
5. korak Pojdite na 2. korak. 35 ciklov
6. korak 72 °C 1 min
7. korak 4 °C zadrževanje

Produkti PCR se lahko nemudoma nanesejo na gel ali pa shranijo pri 4 °C.

**Agarozna gelska elektroforeza (3 %) (protokol za vzorec)**

*50 X TAE*



Tris 24,2 g  
Ledocetna kislina 5,71 ml  
Na<sub>2</sub> (EDTA)·2H<sub>2</sub>O 3,72 g  
Dodajte vodo do 100 ml.

*1 X TAE*

H<sub>2</sub>O 392 ml  
50 X TAE 8 ml

*3 : 1 agaroz*

3 deli agaroze NuSieve™ GTG™  
1 del agaroze Fisher z nizko elektroendoosmozo (EEO)

*Metoda*

1. Pripravite 3-odstotni gel, tako da v 43 ml 1 X TAE dodate 1,2 g agarozne mešanice. Premešajte, da se velike grude razpustijo.
2. Agarozno mešanico prevrte v mikrovalovni pečici, dokler se popolnoma ne razpusti (pazite, da ne bo skipela). Pustite, da se malo ohladi.
3. Dodajte 1,0 µL etidijevega bromida (10 mg/ml). Pretresite stekleničko. Upoštevajte, da je etidijev bromid mutagen, tako da je treba za ta korak, kolikor je tehnično mogoče, uporabiti druge kemikalije, da se zmanjša tveganje za zdravje delavcev<sup>1</sup>.
4. Gel vlijte v kalup z glavničkom. Pustite, da se popolnoma ohladi.
5. Gel dodajte v napravo. Prekrijte ga z 1 X TAE.
6. Vsakim 10 µl produkta PCR dodajte 1 µl nanašalnega barvila (6x loading dye).
7. Vzorce s pipeto prenesite v jamice.
8. Elektroforeza ~ 20 minut poteka pri konstantni napetosti 160 voltov.

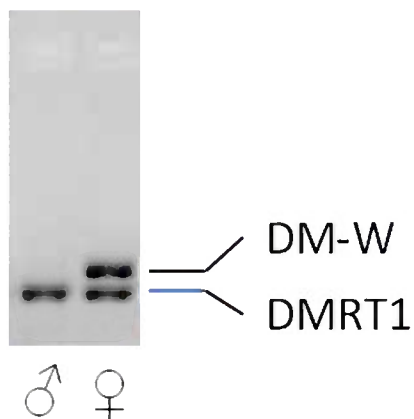
Slika agaroznega gela, na kateri so vidni vzorci prog, značilni za moški in ženski osebek, je

---

<sup>1</sup> V skladu s členom 4(1) Direktive 2004/37/ES Evropskega parlamenta in Sveta z dne 29. aprila 2004 o varovanju delavcev pred nevarnostmi zaradi izpostavljenosti rakotvornim ali mutagenim snovem pri delu (šesta posebna direktiva v skladu s členom 16(1) Direktive Sveta 89/391/EGS) (UL L 158, 30.4.2004, str. 50).

prikazana na **sliki 1**.

**Slika 1:** Slika agaroznega gela, na kateri je viden vzorec proge, značilen za moški (♂) osebek (ena proga ~ 203 bp: DMRT1) in ženski (♀) osebek (dve progi pri ~ 259 bp:DM-W in 203 bp:DMRT1).



## VIRI

Yoshimoto, S., Okada, E., Umemoto, H., Tamura, K., Uno, Y., Nishida-Umehara, C., Matsuda, Y., Takamatsu, N., Shiba, T., in Ito, M. (2008). A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 2469–2474.

## Dodatek 6

### MERJENJE VITELOGENINA

Vitelogenin (VTG) se meri z metodo encimskega imunskega testa (ELISA), ki je bila prvotno razvita za VTG pri črnohlavem pisancu (Parks *et al.*, 1999). Protitelesa za *X. laevis* trenutno niso komercialno dostopna. Vendar je glede na obilico informacij za ta protein in razpoložljivost stroškovno učinkovitih komercialnih storitev za izdelavo protiteles razumno, da lahko laboratoriji zlahka razvijejo ELISA za to merilo (Olmstead *et al.*, 2009). Tudi Olmstead *et al.* (2009) zagotavljajo opis testa, kot je prilagojen za VTG pri *X. tropicalis*, kot je prikazano v nadaljevanju. Pri metodi se uporablja protitelo, izdelano za VTG *X. tropicalis*, vendar je znano, da deluje tudi pri VTG *X. laevis*. Opozoriti je treba, da je mogoče uporabiti tudi nekonkurenčne teste ELISA in da imajo lahko ti nižje meje zaznavnosti kot spodaj opisana metoda.

#### Pribor in reagenti

- Serum predabsorbiranega 1. protitelesa

En del seruma 1. protitelesa proti VTG *X. tropicalis* zmešajte z dvema deloma plazme kontrolnih samcev in pustite pri sobni temperaturi ~ 75 minut, dajte na led za 30 minut, centrifugirajte > 20 K x G 1 uro pri 4 °C, odstranite supernatant, alikvot, shranite pri -20 °C.

- 2. protitelo

HRP konjugat kozjih protikunčjih protiteles IgG (npr. Bio-Rad 172-1019)

- Standard VTG

prečiščeni VTG *X. laevis* pri 3,3 mg/ml.

- TMB (3,3',5,5' tetrametil-benzidin) (npr. KPL 50-76-00; ali Sigma T0440)
- Normalni kozji serum (NGS) (npr. Chemicon® S26-100 ml)
- Polistirenske 96-jamične mikrotitrne plošče za encimskim imunski test (npr. ICN: 76-381-04, Costar:53590, Fisher:07-200-35)
- Hibridizacijska pečica pri 37 °C (ali inkubator s hitrim uravnavanjem pogojev) za plošče, vodna kopel za epruvete
- Druga običajna laboratorijska oprema, kemikalije in pribor

#### Recepti

*Premazni pufer (50 mM karbonatni pufer, pH 9,6):*

NaHCO<sub>3</sub>        1,26 g

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>        0,68 g

voda 428 ml

*10 x PBS (0,1 M fosfata, 1,5 M NaCl):*

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0,83 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 20,1 g

NaCl 71 g

voda 810 ml

*Pufer za spiranje (PBST):*

10 x PBS 100 ml

voda 900 ml

Vrednost pH prilagodite na 7,3 z 1 M HCl, nato dodajte 0,5 ml Tween-20.

*Analizni pufer:*

normalni kozji serum (NGS) 3,75 ml

pufer za spiranje 146,25 ml

### **Odvzem vzorcev**

Kri se odvzame s heparinizirano mikrohematokritsko cevko in postavi na led. Po triminutnem centrifugiranju se cevka zareže in prelomi, plazma pa se iztisne v 0,6-mililitrske mikrocentrifugirke, ki vsebujejo 0,13 enote liofiliziranega aprotinina. (Te mikrocentrifugirke se pripravijo vnaprej, tako da se doda ustrezna količina aprotinina, nato se zamrznejo in liofilizirajo v vakuumskem koncentradorju pri nizki temperaturi, dokler niso suhe.) Plazmo do analize hranite pri –80 °C.

### **Postopek za eno ploščo**

*Prekrivanje plošče*

Zmešajte 20 µl prečiščenega VTG z 22 ml karbonatnega pufra (končni 3 µg/ml). V vsako jamico na 96-jamični plošči dodajte 200 µl. Ploščo prekrijte z lepilnim tesnilnim filmom in pustite dve uri inkubirati pri 37 °C (ali čez noč pri 4 °C).

*Blokiranje plošče*

Blokirna raztopina se pripravi tako, da se 2 ml normalnega kozjega seruma (NGS) doda v 38 ml karbonatnega pufra. Odstranite prekrivno raztopino in osušite. V vsako jamico

dodajte 350 µl blokirne raztopine. Prekrijte z lepilnim tesnilnim filmom in dve uri inkubirajte pri 37 °C (ali čez noč pri 4 °C).

#### *Priprava standardov*

5,8 µl standarda prečiščenega VTG se zmeša z 1,5 ml analiznega pufra v 12 x 75-milimetrski epruveti iz borosilikatnega stekla za enkratno uporabo. S tem se pridobi 12 760 ng/ml. Nato se opravi zaporedno redčenje, tako da se doda 750 µl predhodne razredčine v 750 µl analiznega pufra, da se dobijo končne koncentracije 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 in 50 ng/ml.

#### *Priprava vzorcev*

Začnite z razredčino 1 : 300 (npr. zmešajte 1 µl plazme z 299 µl analiznega pufra) ali 1 : 30 plazme v analiznem pufru. Če se pričakuje velika količina VTG, bodo morda potrebne dodatne ali večje razredčine. B/B<sub>0</sub> poskušajte ohraniti v območju standardov. Za vzorce brez znatnega VTG, npr. kontrolne samce in samice (ki so vsi nezreli), uporabite razredčino 1 : 30. Manj razredčeni vzorci lahko pokažejo neželene učinke matrice.

Poleg tega je priporočljivo, da se na vsaki plošči izvede pozitivna kontrola. Vzorec za kontrolo je pridobljen iz plazme, ki vsebuje visoke ravni VTG. Plazma se najprej razredči v NGS, razdeli v alikvote in shrani pri –80 °C. Za vsako ploščo se alikvot odtaja, nadalje razredči v analiznem pufru in uporabi podobno kot preskusni vzorec.

#### *Inkubacija s 1. protitelesom*

Prvo protitelo se pripravi tako, da se serum predabsorbiranega 1. protitelesa razredči v razmerju 1 : 2 000 v analiznem pufru (npr. 8 µl v 16 ml analiznega pufra). V stekleni epruveti zmešajte 300 µl raztopine 1. protitelesa s 300 µl vzorca/standarda. Epruveta B<sub>0</sub> se pripravi podobno s 300 µl analiznega pufra in 300 µl protitelesa. Pripraviti je treba tudi epruveto NSB samo z uporabo 600 µl analiznega pufra, tj. brez protiteles. Epruvete prekrijte s parafilnom in nežno obračajte, da se premešajo. Eno uro inkubirajte v vodni kopeli pri 37 °C.

#### *Spiranje plošče*

Tik pred končano inkubacijo 1. protitelesa ploščo sperite. To se stori tako, da se vsebina strese iz plošče, plošča pa osuši z vpojnim papirjem. Jamice najprej napolnite s 350 µl raztopine za spiranje, nato pa to izlijte in jamice osušite. Pri tem je koristna večkanalna pipeta ali spiralnik za plošče. Ta korak spiranja se ponovi še dvakrat za skupaj tri spiranja.

#### *Nanos na ploščo*

Ko je plošča sprana, vzemite epruvete iz vodne kopeli in jih nežno zavrtite. V dvojne jamice na plošči dodajte 200 µl iz vsake epruvete z vzorcem, standardom, B<sub>0</sub> in NSB. Ploščo prekrijte z lepilnim tesnilnim filmom in pustite eno uro inkubirati pri 37 °C.

*Inkubacija z 2. protitelesom*

Po koncu inkubacije iz prejšnjega koraka je treba ploščo znova trikrat sprati, kot je navedeno zgoraj. Razredčina 2. protitelesa se pripravi tako, da se 2,5 µl 2. protitelesa zmeša s 50 ml analiznega pufra. V vsako jamico dodajte 200 µl razredčine 2. protitelesa in eno uro inkubirajte pri 37 °C.

*Dodajanje substrata*

Ko je inkubacija z 2. protitelesom končana, ploščo trikrat sperite, kot je opisano zgoraj. Nato v vsako jamico dodajte 100 µl substrata TMB. Pustite, da reakcija poteka 10 minut, po možnosti ne na svetlobi. Ustavite reakcijo, tako da dodate 100 µl 1 M fosforjeve kisline. S tem se bo barva spremenila z modre na živo rumeno. Z uporabo čitalca plošče izmerite absorbanco pri 450 nm.

*Izračun B/B<sub>0</sub>*

Odštejte povprečno vrednost NSB od vseh meritev. B/B<sub>0</sub> za vsak vzorec in standard se izračuna z delitvijo vrednosti absorbanco (B) s povprečno absorbanco vzorca B<sub>0</sub>.

*Pridobitev standardne krivulje in določitev neznanih količin*

Izdelajte standardno krivuljo s pomočjo računalniške programske opreme za izdelavo grafov (npr. Slidewrite<sup>TM</sup> ali Sigma Plot<sup>®</sup>), ki bo ekstrapolirala količino iz B/B<sub>0</sub> vzorca na podlagi B/B<sub>0</sub> standardov. Vrednosti, izrisane na logaritemski skali, običajno oblikujejo sigmoidno krivuljo. Lahko pa se pokažejo kot linearne, če se uporabi ozko območje standardov. Popravite količine vzorcev glede na faktor redčenja in navedite kot mg VTG/ml plazme.

*Določitev minimalnih meja zaznavnosti (MDL)*

Pogosto, zlasti pri normalnih samcih, ne bo jasno, kako poročati o rezultatih pri nizkih vrednostih. V takih primerih je treba uporabiti 95-odstotne 'meje zaupanja', da se določi, ali je treba vrednost navesti kot nič ali kot neko drugo številko. Če je rezultat vzorca v intervalu zaupanja ničelnega standarda (B<sub>0</sub>), je treba rezultat navesti kot nič. Minimalna meja zaznavnosti bo najnižji standard, ki se dosledno razlikuje od ničelnega standarda; tj. intervala zaupanja se ne prekrivata. Za vsak rezultat vzorca, ki je v okviru meje zaupanja minimalne ravni zaznavnosti ali nad njo, se navede izračunana vrednost. Če vzorec spada med ničelni standard in intervale minimalne ravni zaznavnosti, je treba za vrednost tega vzorca navesti polovico minimalne ravni zaznavnosti.

**VIRI**

Olmstead, A. W., Korte, J. J., Woodis, K. K., Bennett, B. A., Ostazeski, S., in Degitz, S. J. (2009). Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. General

and Comparative Endocrinology 160: 117–123.

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

## Dodatek 7

### STATISTIČNA ANALIZA

S preskusom LAGDA se pridobijo tri oblike podatkov, ki jih je treba statistično analizirati: (1) kvantitativni kontinuirani podatki, (2) podatki o času do dogodka za razvojne stopnje (tj. čas do 62. faze NF) in (3) ordinalni podatki v obliki ocen resnosti ali razvojnih faz iz histopatoloških ocen. Priporočeno drevo odločanja za statistično analizo za preskus LAGDA je prikazano na sliki 1. Prav tako so v nadaljevanju navedene nekatere opombe, ki bodo morda potrebne za izvedbo statistične analize meritev iz preskusa LAGDA. Pri drevesu odločanja za analizo je treba rezultate meritev za smrtnost, rast (teža in dolžina) in jetrno-somatski indeks (LSI) analizirati v skladu z vejo ‚Druge končne točke‘.

#### Kontinuirani podatki

Pri podatkih za kontinuirane končne točke je treba najprej preveriti monotonost s transformacijo podatkov z rangi, prilagoditvijo modelu ANOVA ter primerjavo linearnih in kvadratnih kontrastov. Če so podatki monotoni, je treba izvesti regresijski trendni test po Jonckheere-Terpstraju na medianah ponovljenih vzorcev, pri čemer nadaljnja analiza ni potrebna. Druga možnost za podatke, ki so normalno porazdeljeni s homogenimi variancami, je regresijski Williamsov test. Če podatki niso monotoni (kvadratni kontrast je statistično značilen, linearni kontrast pa ne), jih je treba analizirati z uporabo mešanega modela ANOVA. Pri podatkih je nato treba oceniti normalnost (priporoča se uporaba Shapiro-Wilkovega ali Anderson-Darlingovega testa) in homogenost varianc (priporoča se uporaba Levenejevega testa). Oba testa se izvedeta na ostankih iz mešanega modela ANOVA. Namesto teh formalnih testov za normalnost in homogenost varianc se lahko uporabi strokovna presoja, čeprav se priporoča uporaba formalnih testov. Če so podatki normalno porazdeljeni s homogenostjo varianc, so izpolnjene predpostavke mešanega modela ANOVA in se znaten učinek tretiranja določi na podlagi Dunnettovega testa. Če je ugotovljena nenormalnost ali heterogenost varianc, potem predpostavke Dunnettovega testa niso izpolnjene in je treba poiskati normalizacijsko pretvorbo, ki stabilizira variance. Če take pretvorbe ni mogoče najti, se znaten učinek tretiranja določi z Dunnovim testom. Kjer je mogoče, je treba opraviti enostranski test, ne dvostranskega testa, vendar je za določitev, kateri je primeren za določeno končno točko, potrebna strokovna presoja.

#### *Smrtnost*

Podatke o smrtnosti je treba analizirati za obdobje, ki zajema celoten preskus, in jih izraziti kot delež osebkov, ki so poginili v posameznem akvariju. Paglavci, ki preobrazbe ne končajo v določenem časovnem okviru, paglavci, ki so v kohorti podvzorcev ličink, mlade žabe, ki so izločene, in vse živali, ki poginejo zaradi napake pri poskusu, je treba obravnavati kot cenzurirane podatke in se ne smejo vključiti v imenovalac izračuna odstotka. Pred kakršno koli statistično analizo je treba deleže smrtnosti pretvoriti z arkus-sinus-kvadratnokorensko transformacijo. Druga možnost je, da se uporabi regresijski Cochran-Armitageev test, po možnosti z Rao-Scottovo prilagoditvijo v primeru



nadrazpršenosti.

#### *Teža in dolžina (podatki o rasti)*

Samci in samice med preobrazbo niso spolno dimorfni, zato je treba podatke o rasti na podlagi podvzorcev ličink analizirati neodvisno od spola. Vendar pa je treba podatke o rasti mladih osebkov analizirati ločeno na podlagi genetskega spola. Za te končne točke bo morda potrebna logaritemska transformacija, saj logaritemsko normalna porazdelitev podatkov o velikosti ni neobičajna.

#### *Jetrno-somatski indeks (LSI)*

Teže jeter je treba normalizirati kot deleže tež celotnega telesa (tj. LSI) in analizirati ločeno na podlagi genetskega spola.

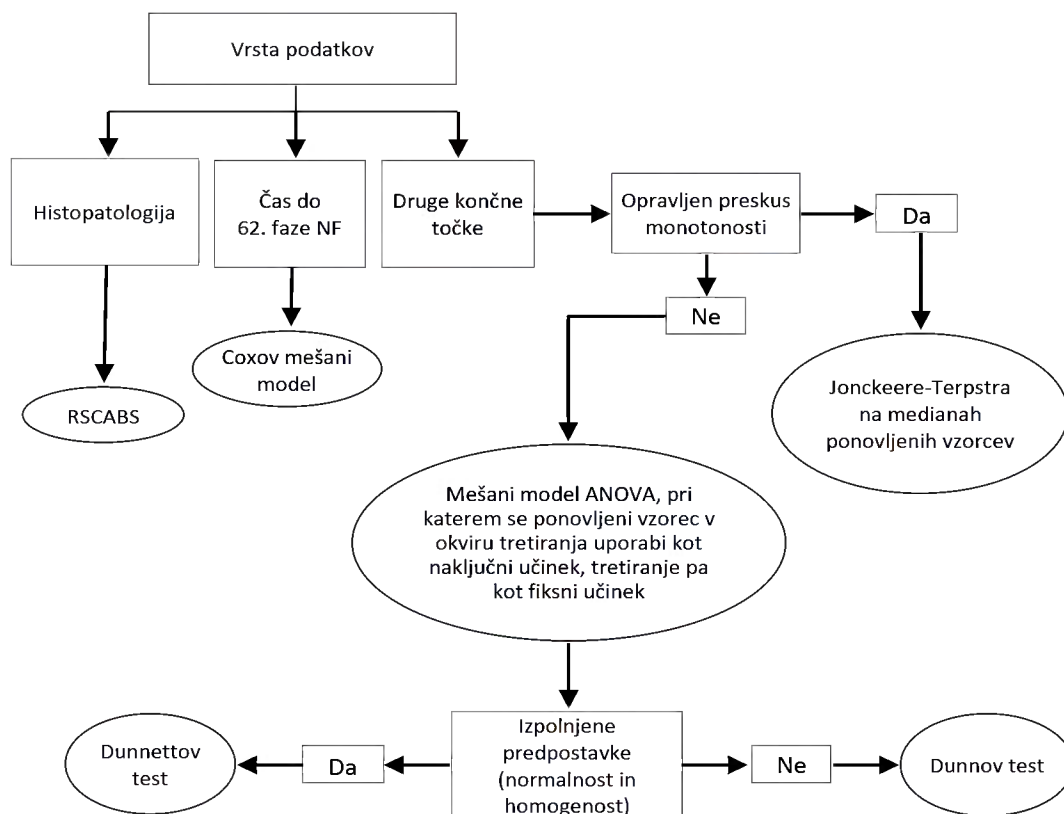
#### **Čas do 62. faze NF**

Podatke o času do preobrazbe je treba obravnavati kot podatke o času do dogodka, pri čemer se vsi pogini ali osebki, ki niso dosegli 62. faze NF v 70 dneh, obravnavajo kot desno cenzurirani podatki (tj. prava vrednost je večja od 70 dni, vendar se študija konča, preden so živali dosegle 62. fazo NF v 70 dneh). Za določitev datuma končanja preskusa je treba uporabiti srednji čas do končanja preobrazbe v 62. fazi NF v kontrolah z vodo za redčenje. Srednji čas do končanja preobrazbe je mogoče določiti s Kaplan-Meierjevimi cenilkami. To končno točko je treba analizirati z uporabo mešanega Coxovega modela sorazmernih tveganj, pri katerem se upošteva ponovitvena struktura študije.

#### **Histopatološki podatki (ocene resnosti in razvojne faze)**

Histopatološki podatki so v obliki ocen resnosti ali razvojnih faz. Test, imenovan RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices), uporablja regresijski Cochran-Armitageev trendni test z Rao-Scottovo prilagoditvijo na vsaki stopnji resnosti v histopatološkem odzivu (Green *et al.*, 2014). Z Rao-Scottovo prilagoditvijo je v test vključen načrt poskusa s ponovitvenimi posodami. Postopek 'by Slices' vključuje biološko pričakovanje, da se resnost učinka običajno poveča s povečanjem odmerkov ali koncentracij, pri čemer se ohranijo individualne ocene osebkov in razkrije resnost kakršnega koli ugotovljenega učinka. S postopkom RSCABS se ne samo določi, katera tretiranja se statistično razlikujejo od kontrol (tj. imajo težjo patologijo kot kontrole), ampak se določi tudi, pri kateri oceni resnosti nastopi razlika, s čimer se zagotovi zelo potreben kontekst za analizo. V primeru določitve razvojne faze spolnih žlez in spolnih vodov je treba za podatke uporabiti dodatno manipulacijo, ker je predpostavka RSCABS, da se resnost učinka povečuje z odmerkom. Opaženi učinek je lahko zakasnel ali prehiter razvoj. Podatke o določitvi razvojne faze je torej treba analizirati takoj, ko so zbrani, da se odkrije pospešitev razvoja, in nato ročno transformirati pred drugo analizo, da se zazna zakasnitev v razvoju.

Slika 1: Drevo odločanja za statistično analizo podatkov preskusa LAGDA



## VIRI

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

## Dodatek 8

### PREUDARKI ZA ODKRIVANJE IN ZMANJŠEVANJE POJAVA SKOLIOZE

Zaradi idiopatske skolioze, ki so običajno kaže kot ‚ukrivljen rep‘ pri paglavcih *Xenopus laevis*, se lahko morfološka in vedenjska opažanja pri preskusnih populacijah zapletejo. Zato si je treba prizadevati, da bi se pojavnost skolioze tako v staležu kot tudi v preskusnih pogojih čim bolj zmanjšala ali odpravila. Pri končnem preskusu je priporočljivo, da je prevalenca zmerne in hude skolioze manj kot 10-odstotna, zaradi izboljšanja zaupanja, da se lahko s preskusom odkrijejo s tretiranjem povezani učinki na razvoj sicer zdravih ličink dvoživk.

Pri dnevnih opažanjih med končnim preskusom je treba evidentirati pojavnost (štetje posameznih osebkov) in resnost skolioze, kadar je prisotna. Naravo nenormalnosti je treba opisati glede na mesto (npr. pred zadnjično odprtino ali za njo) in smer ukrivljenosti (npr. vstran ali od hrbtnega dela proti trebušnemu delu). Resnost se lahko oceni kot:

(NO) neopazna: ukrivljenost ni prisotna;

(1) minimalna: rahla ukrivljenost vstran za zadnjično odprtino; opazna samo pri mirovanju;

(2) zmerne: ukrivljenost vstran za zadnjično odprtino; vedno vidna, vendar ne ovira gibanja;

(3) huda: ukrivljenost vstran pred zadnjično odprtino; ALI vsaka ukrivljenost, ki ovira gibanje; ALI ukrivljenost od hrbtnega proti trebušnemu delu.

Znanstveno-svetovalni odbor US EPA FIFRA (FIFRA SAP 2013) je pregledal zbirne podatke za skoliozo pri petnajstih preskusih preobrazbe dvoživk pri *X. laevis* (51. faza NF do 60+) in zagotovil splošna priporočila za zmanjšanje prevalence te nenormalnosti pri preskusnih populacijah. Za preskus LAGDA so ta priporočila ustrezna, čeprav je z njim zajeto daljše razvojno obdobje.

### **Pretekla uspešnost mrestenja**

Na splošno je treba kot pare za razmnoževanje uporabiti visokokakovostne zdrave odrasle osebkove; z izločitvijo parov za razmnoževanje, katerih potomci imajo skoliozo, se lahko zmanjša njeno pojavljanje skozi čas. Zlasti je treba čim bolj zmanjšati uporabo živali za razmnoževanje, ujetih v naravnem okolju. Obdobje izpostavljenosti v preskusu LAGDA se začne z zarodki v 8–10. fazi NF, zato na začetku preskusa ni mogoče določiti, ali se bo pri zadevnih osebkih pokazala skolioza. Poleg sledenja pojavnosti skolioze pri živalih, ki so vključene v preskus, je torej treba dokumentirati preteklo uspešnost izvalitve (vključno s prevalenco skolioze pri vseh ličinkah, ki so se lahko razvile). Morda bo koristno nadalje

spremljati delež vsake izvalitve, ki ni bil uporabljen v zadevni študiji, in poročati o teh opažanjih (FIFRA SAP 2013).

## Kakovost vode

Pri laboratorijskem staležu in med preskusom je treba zagotoviti ustrezno kakovost vode. Poleg meril kakovosti vode, ki se redno ocenjujejo za preskuse toksičnosti za vodno okolje, je lahko koristno spremljati in odpraviti kakršna koli pomanjkanja hranilnih snovi (npr. pomanjkanje vitamina C, kalcija, fosforja) ali presežne ravni selen in bakra, za katere se poroča, da povzročajo različne stopnje skolioze pri laboratorijsko gojenih *Rana* sp. in *Xenopus* sp. (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; kot je navedeno v FIFRA SAP 2013). Kakovost vode in zdravje preskusnih osebkov se bosta na splošno izboljšala z uporabo ustrezne prehrane (glej Dodatek 4) in rednim čiščenjem akvarija.

## Prehrana

Posebna priporočila za prehrano, za katero je bilo v preskusu LAGDA ugotovljeno, da je uspešna, so podrobno navedena v Dodatku 4. Priporočljivo je, da se viri hrane pregledajo glede bioloških toksinov, herbicidov in drugih pesticidov, za katere je znano, da povzročajo skoliozo pri *X. laevis* ali drugih vodnih živalih (Schlenk in Jenkins 2013). Izpostavljenost nekaterim inhibitorjem holinesteraze je bila na primer povezana s skoliozo pri ribah (Schultz *et al.* 1985) in žabah (Bacchetta *et al.* 2008).

## VIRI

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

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

Leibovitz, H. E., Culley, D. D., in Geaghan, J. P. (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., Amborski, R. L., in Culley, D. D. (1980). Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. *Journal of the World Aquaculture Society* 11: 445–453.

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

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