Az Európai Unió

Hivatalos Lapja

L 247

Magyar nyelvű kiadás

Jogszabályok

62. évfolyam

2019. szeptember 26.

Tartalom

II *Nem jogalkotási aktusok*

RENDELETEK

★ **A Bizottság (EU) 2019/1390 rendelete (2019. július 31.) a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH) szóló 1907/2006/EK európai parlamenti és a tanácsi rendelet értelmében alkalmazandó vizsgálati módszerek megállapításáról szóló 440/2008/EK rendelet mellékletének a műszaki fejlődéshez való hozzáigazítás céljából történő módosításáról** [1] 1

[1] EGT-vonatkozású szöveg.

HU

Azok a jogi aktusok, amelyek címe normál szedéssel jelenik meg, a mezőgazdasági ügyek napi intézésére vonatkoznak, és rendszerint csak korlátozott ideig maradnak hatályban.

Valamennyi más jogszabály címét vastagon szedik, és előtte csillag szerepel.

II

(Nem jogalkotási aktusok)

RENDELETEK

A BIZOTTSÁG (EU) 2019/1390 RENDELETE

(2019. július 31.)

a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH) szóló 1907/2006/EK európai parlamenti és a tanácsi rendelet értelmében alkalmazandó vizsgálati módszerek megállapításáról szóló 440/2008/EK rendelet mellékletének a műszaki fejlődéshez való hozzáigazítás céljából történő módosításáról

(EGT-vonatkozású szöveg)

AZ EURÓPAI BIZOTTSÁG,

tekintettel az Európai Unió működéséről szóló szerződésre,

tekintettel a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH), az Európai Vegyianyag-ügynökség létrehozásáról, az 1999/45/EK irányelv módosításáról, valamint a 793/93/EGK tanácsi rendelet, az 1488/94/EK bizottsági rendelet, a 76/769/EGK tanácsi irányelv, a 91/155/EGK, a 93/67/EGK, a 93/105/EK és a 2000/21/EK bizottsági irányelv hatályon kívül helyezéséről szóló, 2006. december 18-i 1907/2006/EK európai parlamenti és tanácsi rendeletre [1] és különösen annak 13. cikke (2) bekezdésére,

mivel:

(1) A 440/2008/EK bizottsági rendelet [2] megállapítja az 1907/2006/EK rendelettel összefüggésben alkalmazandó, a vegyi anyagok fizikai-kémiai tulajdonságainak, toxicitásának és ökotoxicitásának meghatározására szolgáló vizsgálati módszereket.

(2) A Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet (OECD) harmonizált és nemzetközileg elfogadott vizsgálati iránymutatásokat dolgoz ki a vegyi anyagok szabályozási célú vizsgálatára vonatkozóan. Az ezen a területen végbemenő tudományos fejlődésre figyelemmel az OECD időről időre új és átdolgozott vizsgálati iránymutatásokat ad ki.

(3) A műszaki fejlődés figyelembevétele és a kísérleti célokra használt állatok számának az 1907/2006/EK rendelet 13. cikkének (2) bekezdésében előírt, lehetőség szerinti csökkentése érdekében a Bizottság két új vizsgálati módszert határoz meg az ökotoxicitás értékelésére, kilenc új vizsgálati módszert fektet le a toxicitás emberi egészségre gyakorolt hatásának meghatározására, és hét vizsgálati módszert aktualizál az OECD e területre vonatkozóan elfogadott vizsgálati iránymutatásai alapján. E vizsgálati módszerek közül tizenegy a bőr- és szemirritáció/-korrózió, a bőrszenzibilizáció, a genotoxicitás és az endokrin hatások *in vitro* vizsgálatához kapcsolódik. A Bizottság konzultált az érdekelt felekkel a javasolt módosításról.

[1] HL L 396., 2006.12.30., 1. o.

[2] A Bizottság 440/2008/EK rendelete (2008. május 30.) a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH) szóló 1907/2006/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet értelmében alkalmazandó vizsgálati módszerek megállapításáról (HL L 142., 2008.5.31., 1. o.).

(4) A 440/2008/EK rendeletet ezért ennek megfelelően módosítani kell.

(5) Az e rendeletben előírt intézkedések összhangban vannak az 1907/2006/EK rendelet 133. cikke alapján létrehozott bizottság véleményével,

ELFOGADTA EZT A RENDELETET:

1. cikk

A 440/2008/EK rendelet melléklete e rendelet mellékletének megfelelően módosul.

2. cikk

Ez a rendelet az *Európai Unió Hivatalos Lapjában* való kihirdetését követő huszadik napon lép hatályba.

Ez a rendelet teljes egészében kötelező és közvetlenül alkalmazandó valamennyi tagállamban.

Kelt Brüsszelben, 2019. július 31-én.

a Bizottság részéről
az elnök
Jean-Claude JUNCKER

MELLÉKLET

A 440/2008/EK rendelet melléklete a következőképpen módosul:

1. A B. részben a B.4. fejezet helyébe a következő szöveg lép:

„B.4. **AKUT BŐRIRRITÁCIÓ/BŐRKORRÓZIÓ**

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 404. vizsgálati iránymutatásában (2015) leírt módszerrel. A vegyi anyagok vizsgálatára vonatkozó OECD-iránymutatás rendszeres időközönként felülvizsgálat tárgyát képezi annak biztosítása érdekében, hogy tükrözze a rendelkezésre álló legjobb tudományos ismereteket. Az OECD 404. vizsgálati iránymutatásának felülvizsgálata során kiemelt figyelmet szenteltek az állatjóléti szempontokkal kapcsolatos lehetséges jobbító beavatkozásoknak és a vizsgálati vegyi anyaggal kapcsolatban rendelkezésre álló összes információ kiértékelésének, hogy ezáltal elkerülhető legyen a laboratóriumi állatokon történő szükségtelen kísérletezés. Az OECD (eredetileg 1981-ben elfogadott, majd 1992-ben, 2002-ben és 2015-ben átdolgozott) 404. vizsgálati iránymutatásának frissített kiadása hivatkozik a bőrirritáció/bőrkorrózió vonatkozásában végzett vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről (IATA) szóló iránymutatásra (1), amely a bőrirritációs és bőrkorróziós vizsgálatok moduláris megközelítésére tesz javaslatot. Az integrált vizsgálati és értékelési megközelítés több, információforrásokat és adatelemző eszközöket csoportosító modult ismertet, továbbá i. iránymutatást nyújt arra nézve, hogy miként integrálhatók és használhatók az ismert vizsgálati és nem vizsgálati eredetű adatok a vegyi anyagok potenciális bőrirritációs és bőrkorróziós hatásainak felmérésére, és ii. javaslatot tesz a további vizsgálatok szükségességekor alkalmazható megközelítésre (1). Emellett az iránymutatás javasolja, hogy – amennyiben szükséges – az előzetes *in vivo* vizsgálat során az állatra ne egyszerre, hanem időben egymás után helyezzék fel a három teszttapaszt.

2. A bőrirritáció és a bőrkorrózió fogalommeghatározása a vizsgálati módszer függelékében szerepel.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK

3. A tudományos észszerűség és az állatok kímélete érdekében nem szabad *in vivo* vizsgálatokat végezni mindaddig, amíg a vizsgálati vegyi anyag potenciális bőrkorróziós/bőrirritációs hatására vonatkozó összes rendelkezésre álló adatra el nem végezték a bizonyítékok súlyán alapuló (WoE) elemzést a bőrirritáció/bőrkorrózió vonatkozásában végzett vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről (IATA) szóló iránymutatás szerint, vagyis az iránymutatás három részének és az azokhoz tartozó moduloknak megfelelően (1). Röviden: az 1. rész az ismert adatokkal foglalkozik hét modulon keresztül, amelyek lefedik a humán adatokat, az *in vivo* adatokat, az *in vitro* adatokat, a fizikai-kémiai tulajdonságokkal kapcsolatos adatokat (pl. a pH-értéket, különösen az erős savasságot vagy lúgosságot) és a nem vizsgálatalapú módszereket. A 2. rész az adatok WoE-elemzésének elvégzését írja le. Amennyiben a WoE-elemzés nem meggyőző, tovább kell haladni a 3. rész szerint, amelynek során további vizsgálatokat kell végezni, először *in vitro* módszerekkel, majd legvégső esetben *in vivo* vizsgálatokkal. Az elemzés célja tehát az, hogy csökkentse az *in vivo* bőrkorróziós/bőrirritációs vizsgálatokat azon vizsgálati vegyi anyagok esetében, amelyekre az említett két végpont tekintetében más vizsgálatokból már elegendő bizonyíték áll rendelkezésre.

AZ IN VIVO VIZSGÁLAT ELVE

4. A vizsgálati vegyi anyagot egyetlen dózisban kell alkalmazni a kísérleti állat bőrén; a vizsgált állat nem kezelt bőrfelületei szolgálnak kontrollként. Az irritáció/korrózió mértékét meghatározott időközönként kell ellenőrizni és értékelni, továbbá a hatások teljes kiértékelése érdekében részletesebben is ismertetni. A vizsgálat időtartamának elég hosszúnak kell lennie ahhoz, hogy meg lehessen határozni a megfigyelt hatások visszafordíthatóságát vagy visszafordíthatatlanságát.

5. A vizsgálat bármely fázisában tartósan súlyos stressz és/vagy fájdalom jeleit mutató állatokat kíméletesen le kell ölni, és a vizsgálati vegyi anyagot ennek megfelelően kell értékelni. Az elhullás közelében lévő és súlyosan szenvedő állatok kíméletes leölésére vonatkozó döntés kritériumai külön iránymutatás (2) tárgyát képezik.

AZ IN VIVO VIZSGÁLAT ELŐKÉSZÍTÉSE

Az állatfaj kiválasztása

6. A preferált laboratóriumi állatfaj az albínó nyúl, és egészséges, fiatal felnőtt állatokat kell használni. Más fajok alkalmazását megfelelően indokolni kell.

Az állatok előkészítése

7. A vizsgálat előtt körülbelül 24 órával el kell távolítani az állat szőrzetét úgy, hogy teljesen le kell nyírni az állat törzsének dorzális területét. Ügyelni kell arra, hogy eközben ne dörzsölődjön ki az állat bőre, és csak olyan állatokat szabad használni, amelyek bőre ép és egészséges.

8. Egyes nyúltörzsek szőrzete sűrű foltokban nő, amelyek az év egyes szakaszaiban még szembetűnőbbek. Az ilyen sűrű szőrzetnövekedéssel jellemzett részeket nem szabad vizsgálati területként használni.

Tartási és etetési körülmények

9. Az állatokat egyenként kell elhelyezni. Nyulak esetében a kísérleti állatok tartására szolgáló helyiség hőmérsékletének 20 °C-nak (± 3 °C) kell lennie. Noha a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, és az – a takarítás időtartamától eltekintve – lehetőség szerint nem haladhatja meg a 70 %-ot, a célértéknek 50–60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltakozásával. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett.

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

A vizsgálati vegyi anyag alkalmazása

10. A vizsgálati vegyi anyagot egy kis (körülbelül 6 cm^2-es) bőrterületre kell kijuttatni, majd egy géztapasszal le kell takarni, és nem irritáló ragasztószalaggal kell a helyén rögzíteni. Olyan esetekben, amikor a közvetlen alkalmazás nem megoldható (pl. folyadékok vagy egyes masszák esetében), a vizsgálati vegyi anyagot először a géztapaszra kell felvinni, és azután azt kell a bőrre helyezni. Az expozíciós idő tartamára a tapaszt lazán kell a bőrre rögzíteni egy megfelelő, félig záró kötés alkalmazásával. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyagot a tapaszra viszik fel, azt úgy kell a bőrre rögzíteni, hogy megfelelő legyen a kontaktus, és a bőrön egyenletes legyen az anyag eloszlása. Gondoskodni kell arról, hogy az állat ne férhessen hozzá a tapaszhoz és ne nyelhesse le vagy lélegezhesse be a vizsgálati vegyi anyagot.

11. A folyékony vizsgálati vegyi anyagok adagolása rendszerint hígítás nélkül történik. Szilárd anyagok vizsgálatakor (amelyeket szükség esetén porrá lehet őrölni) a vizsgálati vegyi anyagot a lehető legkisebb, de a bőrrel való megfelelő kontaktus biztosításához a lehető legkisebb mennyiségű vízzel (vagy szükség esetén más megfelelő vivőanyaggal) kell nedvesíteni. Ha vivőanyagként nem vizet alkalmaznak, annak lehetőleg ne, vagy csak minimális bőrirritáló hatása legyen.

12. Ha megoldható, az általában 4 órás expozíciós idő végén az adott esetben megmaradt vizsgálati vegyi anyagot vízzel vagy megfelelő oldószerrel el kell távolítani, ügyelve arra, hogy ez ne befolyásolja a meglévő válaszreakciókat vagy a felhám épségét.

Dózis

13. A vizsgálat helyére 0,5 ml folyadékot vagy 0,5 g szilárd anyagot vagy pasztát kell felvinni.

Előzetes vizsgálat (*in vivo* bőrirritációs/bőrkorróziós vizsgálat egy állat felhasználásával)

14. Ha a bizonyítékok súlyán alapuló elemzés vagy korábbi *in vitro* vizsgálat alapján a vizsgálati vegyi anyag korróziós vagy irritáló hatásúnak minősül, illetve nem osztályozandó, általában nincsen szükség további *in vivo* vizsgálatokra. Amennyiben azonban indokoltnak látszik a további adatgyűjtés, az *in vivo* vizsgálatot először egy állaton kell elvégezni, az alábbi eljárás alkalmazásával. Az állatra egymást követően legfeljebb három teszttapaszt lehet felhelyezni. Az első tapaszt három perc után kell eltávolítani. Ha nem láthatók súlyos bőrreakciók, egy második tapaszt helyeznek fel egy másik helyre, majd egy óra elteltével eltávolítják. Ha a megfigyelések ebben a szakaszban azt mutatják, hogy humánusan megengedhető az expozíció négy órára történő meghosszabbítása, egy harmadik tapaszt is fel lehet helyezni, melyet négy óra múlva eltávolítanak és a válaszreakciót kiértékelik.

15. Ha a három egymás utáni expozíció bármelyike után korróziós hatás tapasztalható, a vizsgálatot azonnal be kell fejezni. Ha az utolsó tapasz eltávolítása után sem figyelhető meg korróziós hatás, az állatot 14 napon át meg kell figyelni, kivéve, ha előbb jelentkezik korróziós hatás.

16. Azokban az esetekben, amikor a vizsgálati vegyi anyag várhatóan nem okoz korróziós hatást, de irritáló lehet, egyetlen tapaszt kell felhelyezni egy állatra, négy óra időtartamra.

Megerősítő vizsgálat (*in vivo* bőrirritációs vizsgálat további állatok felhasználásával)

17. Ha az előzetes vizsgálat során nem figyelhető meg korróziós hatás, legfeljebb további két állaton egy-egy tapasz és négyórás expozíciós idő alkalmazásával meg kell erősíteni az irritációt vagy a negatív válaszreakciókat. Ha az előzetes vizsgálat során irritációs válasz figyelhető meg, a megerősítő vizsgálat lépcsőzetesen vagy két további állat párhuzamos kezelésével is elvégezhető. Abban a kivételes esetben, ha nem végeznek előzetes vizsgálatot, két vagy három állatot lehet kezelni egy-egy tapasszal, amelyet négy óra múlva kell eltávolítani. Ha két állat használata esetén mindkettő ugyanolyan válaszreakciót mutat, további vizsgálatokra nincs szükség. Egyéb esetben egy harmadik állatot is be kell vonni a vizsgálatba. A nem egyértelmű válaszreakciókat esetlegesen további állatok bevonásával lehet értékelni.

Megfigyelési időszak

18. A megfigyelési időszak hosszát úgy kell megválasztani, hogy elegendő legyen a megfigyelt hatások visszafordíthatóságának teljes kiértékelésére. A vizsgálatot azonban azonnal meg kell szakítani, ha az állat tartósan súlyos fájdalom vagy stressz jeleit mutatja. A hatások visszafordíthatóságának meghatározásához az állatokat a tapaszok eltávolítása után legfeljebb 14 napig meg kell figyelni. Ha a visszafordíthatóság a 14 napos időszak vége előtt bebizonyosodik, a kísérletet ekkor kell befejezni.

Klinikai megfigyelések és a bőrreakciók értékelése

19. Minden állatnál meg kell vizsgálni a bőrpír (eritéma) vagy vizenyő (ödéma) jeleit és a válaszreakciókat a tapasz eltávolítása után 60 perccel, majd 24, 48 és 72 órával értékelni kell. Az egy állattal végzett előzetes vizsgálatban a vizsgálati területet a tapasz eltávolítása után azonnal is meg kell vizsgálni. A bőrreakciókat a csatolt táblázatban megadottak szerint kell értékelni és feljegyezni. Ha 72 óra elteltekor sem irritációként, sem korrózióként nem értékelhető bőrkárosodás látható, a hatások visszafordíthatóságának meghatározásához szükség lehet a megfigyelések folytatására a 14. napig. Az irritáció megfigyelésén kívül minden lokális toxikus hatást, mint például a bőr zsírtartalmának csökkentését, és bármely káros szisztémás hatást (pl. a mérgezés klinikai tüneteire és a testtömegre gyakorolt hatást) részletesen le kell írni és fel kell jegyezni. A nem egyértelmű válaszreakciók tisztázása érdekében fontolóra kell venni kórszövettani vizsgálatok elvégzését is.

20. A bőrreakciók értékelése elkerülhetetlenül szubjektív. A bőrreakciók értékelésének harmonizálása és a vizsgáló laboratóriumok, illetve a megfigyelésekben és azok értékelésében részt vevők segítése érdekében a megfigyeléseket végző személyzetet megfelelően ki kell képezni az alkalmazott értékelő rendszer (lásd a csatolt táblázatot) használatára. Hasznos lehet egy, a bőrirritációk és más léziók értékelését ismertető, illusztrált útmutató is (3).

ADATOK ÉS JELENTÉS

21. A végleges vizsgálati jelentésben a vizsgálatok eredményeit táblázatos formában kell összefoglalni, amelynek a 24. pontban felsorolt tételek mindegyikét tartalmaznia kell.

Az eredmények értékelése

22. A bőrirritációs pontszámokat a léziók jellegével és súlyosságával, illetve visszafordíthatóságával vagy visszafordíthatatlanságával összefüggésben kell értékelni. Az egyes pontszámok nem jelentenek abszolút normát egy anyag irritációs tulajdonságai tekintetében, mivel a vizsgálandó anyag egyéb hatásait is értékelni kell. Az egyes pontszámokat ehelyett referenciaértékeknek kell tekinteni, amelyeket a vizsgálat során tett összes egyéb megfigyeléssel együttesen kell értékelni.

23. Az irritációs válaszreakciók értékelésekor figyelembe kell venni a bőrléziók visszafordíthatóságát. Ha az olyan válaszreakciók, mint a szőrhiány (korlátozott területen), a kóros elszarusodás (hiperkeratózis), a szövetszaporodás (hiperplázia) vagy a hámlás a 14 napos megfigyelési időszak végére sem múlnak el, a vizsgálati vegyi anyagot irritálónak kell tekinteni.

Vizsgálati jelentés

24. A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Az in vivo vizsgálatok indokolása:

— A korábban rendelkezésre álló vizsgálati adatok WoE-elemzése, beleértve a lépcsőzetes vizsgálati stratégia során nyert adatokat is:

— a korábbi vizsgálatokból rendelkezésre álló, vonatkozó adatok ismertetése;

— a vizsgálati stratégia egyes szakaszaiban nyert adatok;

— az elvégzett *in vitro* vizsgálatok, ezen belül az eljárások, illetve a vizsgált anyaggal és a referenciaanyagokkal kapott eredmények részleteinek ismertetése;

— WoE-elemzés az *in vivo* vizsgálat elvégzéséhez.

Vizsgálati vegyi anyag:

— Egy összetevőből álló anyag: kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján;

— ismeretlen vagy változó összetételű anyagok, több összetevőből álló anyagok és keverékek, valamint komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok (UVCB-k): lehetőség szerint az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai alapján jellemezve;

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— eredet, gyártási szám, ha ismert;

— a vizsgálati vegyi anyag/kontrollanyag kezelése a vizsgálatot megelőzően, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, felhasználási határideje vagy ismételt elemzésének napja, ha ismert;

— tárolási feltételek.

Vivőanyag:

— azonosítás, (adott esetben) koncentráció, alkalmazott térfogat;

— a vivőanyag megválasztásának indokolása.

Kísérleti állat(ok):

— a felhasznált faj/törzs, adott esetben az albínó nyúltól eltérő faj(ok) alkalmazásának indokolása;

— az állat(ok) száma nemenként;

— az egyes állatok testtömege a vizsgálat előtt és annak befejezésekor;

— életkor a vizsgálat kezdetén;

— az állat(ok) származása, tartásának körülményei, takarmánya stb.

Vizsgálati körülmények:

— az állat azon testrészének előkészítése, ahová felhelyezik a tapaszt;

— a felhasznált tapasz típusának és a tapaszolási eljárásnak a részletes leírása;

— a vizsgálati vegyi anyag előkészítésének, alkalmazásának és eltávolításának részletes ismertetése.

Eredmények:

— az irritációs/korróziós válasz pontszámainak táblázatos formában történő megadása minden egyes állatra és minden egyes mérési időpontra vonatkozóan;

— az összes megfigyelt lézió ismertetése;

— a megfigyelt irritáció vagy korrózió jellegének és mértékének, illetve az esetleges kórszövettani eredményének a leíró jellegű ismertetése;

— a bőrirritáción és -korrózión kívüli egyéb káros lokális hatások (pl. a bőr zsírtartalmának csökkenése) és szisztémás hatások ismertetése.

Az eredmények értékelése

Következtetések

SZAKIRODALOM

(1) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

Táblázat

A Bőrreakciók Értékelése

Bőrpír (eritéma) és pörkképződés

Nincs bőrpír	0
Nagyon enyhe bőrpír (alig észlelhető)	1
Jól kifejezett bőrpír	2
Közepes–súlyos mértékű bőrpír	3
Pörkképződésig fokozódó súlyos bőrpír (céklavörös szín), amely lehetetlenné teszi a bőrpír osztályozását	4

Elérhető maximális pontszám: 4

Vizenyőképződés

Nincs vizenyő	0
Nagyon enyhe vizenyő (alig észlelhető)	1
Enyhe vizenyő (a terület szélei az egyértelmű kiemelkedések miatt jól kifejezettek)	2
Közepes súlyosságú vizenyő (körülbelül 1 mm-re emelkedik ki)	3
Súlyos vizenyő (több mint 1 mm-re emelkedik ki és nagyobb, mint az expozíciós terület)	4

Elérhető maximális pontszám: 4

A nem egyértelmű válaszreakciókat kórszövettani vizsgálattal lehet tisztázni.

Függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Bőrirritáció: a vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően 4 órán belül megjelenő, visszafordítható bőrkárosodás.

Bőrkorrózió: a vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően négy órán belül megjelenő, visszafordíthatatlan bőrkárosodás, azaz a felhámon át az irhára is átterjedő, látható szövetelhalás. A korróziós reakciót jellemzően fekélyek, vérzés, véres var, illetve a 14 napos megfigyelési időszak végén a bőr kifehéredése miatti elszíneződések, teljesen szőrtelen területek és hegek jellemzik. A kérdéses lézió értékeléséhez figyelembe kell venni a kórszövettant.

Vizsgálati vegyi anyag: az e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

2. A B. részben a B.17. fejezet helyébe a következő szöveg lép:

„B.17. **EMLŐSSEJTEKEN HPRT ÉS XPRT GÉNNEL VÉGZETT *IN VITRO* GÉNMUTÁCIÓS VIZSGÁLATOK**

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 476. vizsgálati iránymutatásával (2016). A vizsgálati módszereket a tudományos fejlődés, a változó szabályozási igények és az állatok kíméletének figyelembevételével rendszeresen felülvizsgálják. A B.17. vizsgálati módszer jelenlegi felülvizsgált változata a vizsgálat csaknem harminc éves alkalmazása során szerzett tapasztalatokat tükrözi, valamint annak a különálló, újonnan kifejlesztett módszernek az eredményeit, amelynek keretében timidin-kináz gén használatával végeznek emlőssejteken *in vitro* génmutációs vizsgálatokat. A B.17. vizsgálati módszer a genetikai toxikológiai vizsgálati módszerek sorozatának részét képezi. Az OECD kidolgozott egy, a genetikai toxikológiai vizsgálatokról tömör tájékoztatást nyújtó, az OECD genetikai toxikológiára vonatkozó vizsgálati iránymutatásainak közelmúltbeli változásait áttekintő dokumentumot (1).

2. Az emlőssejteken végzett *in vitro* génmutációs vizsgálat célja a vegyi anyagok által előidézett génmutációk észlelése. Az e vizsgálatokban használt sejtvonalak forward (előremutató) mutációkat mérnek riportergénekben, konkrétan az endogén hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz génben (Hprt rágcsálósejtekben és HPRT emberi sejtekben; e vizsgálati módszer keretében együttes megnevezésük Hprt-gén és HPRT-vizsgálat) és a xantin-guanin-foszforibozil-transzferáz (gpt) transzgénben (a továbbiakban: XPRT-vizsgálat). A HPRT-és XPRT-mutációvizsgálatok a genetikai események különböző spektrumait észlelik. A HPRT-vizsgálat által észlelt mutációs eseményeken (pl. bázispárok cseréje, leolvasási keret eltolódása, kisebb deléciók és inszerciók) túlmenően a gpt transzgén autoszomális helye lehetővé teheti a nagy mértékű deléciókból és esetlegesen a mitotikus rekombinációból eredő mutációk észlelését, amelyek HPRT-vizsgálattal nem észlelhetők, mivel a Hprt-gén az X kromoszómán helyezkedik el (2) (3) (4) (5) (6) (7). Szabályozási célra jelenleg az XPRT-vizsgálatot a HPRT-vizsgálatnál ritkábban alkalmazzák.

3. Az alkalmazott fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatók.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

4. Az *in vitro* végrehajtott vizsgálatok rendszerint külső forrásból származó metabolikus aktiváció alkalmazását teszik szükségessé. Az exogén metabolikus aktivációs rendszer nem utánozza teljesen az *in vivo* körülményeket.

5. Ügyelni kell arra, hogy ne álljanak elő olyan körülmények, amelyek álpozitív – tehát nem a vizsgálati vegyi anyag és a sejt genetikus anyagának közvetlen kölcsönhatásából származó – eredményre (azaz a vizsgálati rendszerrel való esetleges kölcsönhatásra) vezetnének; ilyen körülmény többek között a pH-érték vagy az ozmolalitás változása (8) (9) (10), a tenyészközeg összetevőivel való kölcsönhatás (11) (12) vagy a túlzott mértékű citotoxicitás (13). A 19. pontban meghatározott, ajánlott citotoxicitási felső határértékeket meghaladó citotoxicitás a HPRT-vizsgálat szempontjából túlzott mértékűnek minősül.

6. A vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény.

A VIZSGÁLAT ELVE

7. Azok a mutáns sejtek, amelyek nem mutatnak Hprt-enzimaktivitást a HPRT-vizsgálatban vagy xprt-enzimaktivitást az XPRT-vizsgálatban, rezisztensek a purinanalóg 6-thioguanin (TG) citosztatikus hatásaival szemben. A Hprt- (a HPRT-vizsgálatban) vagy a gpt -(az XPRT-vizsgálatban) proficiens sejtek érzékenyek a TG-re, ami a celluláris metabolizmus gátlását okozza, és megállítja a további sejtosztódást. Tehát a mutáns sejtek képesek sejtburjánzásra TG jelenlétében, míg a normál sejtek, amelyek (a HPRT-vizsgálatban) Hprt-enzimet vagy (az XPRT-vizsgálatban) gpt-enzimet tartalmaznak, nem képesek erre.

8. Szuszpenzióban vagy egyrétegű (monolayer) tenyészetben növő sejteket megfelelő időtartamig (3–6 órán keresztül) külső forrásból származó metabolikus aktivációval és anélkül (lásd a 14. pontot) kezelik a vizsgálati vegyi anyaggal, majd a sejtkultúrát átültetik, hogy meghatározzák a citotoxicitást és lehetővé tegyék a fenotípusos expressziót a mutáns kiválasztása előtt (14) (15) (16) (17). A citotoxicitást a relatív túlélés alapján kell meghatározni, ami a közvetlenül a kezelést követően mért és a kezelés során tapasztalt sejtpusztulással kiigazított kolóniaképző képesség összevetve a negatív kontrollal (18. pont és 2. függelék). A kezelt tenyészeteket megfelelő, az egyes sejtvonalakra jellemző ideig tenyészközegben tartják, hogy lehetővé váljon az indukált mutációk közel optimális fenotípusos expressziója (ez általában legalább 7–9 napot igényel). A fenotípus expressziót követően a mutációs gyakoriságot úgy határozzák meg, hogy leültetnek ismert számú sejtet a szelekciós ágenst tartalmazó tápoldatba a mutáns telepek kimutatására, valamint a szelekciós ágenst nem tartalmazó tápoldatba a kolóniaképző képesség (életképesség) meghatározására. Megfelelő inkubációs idő után megszámolják a telepeket. A mutációs gyakoriság kiszámításának alapja a mutáns telepek száma, kiigazítva a mutáns kiválasztásának idején mért kolóniaképző képességgel.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Előkészületek

Sejtek

9. A HPRT- és XPRT-vizsgálatokban használt sejttípusoknak bizonyítottan érzékenynek kell lenniük a kémiai mutagén anyagokra, magas kolóniaképző képességgel, stabil kariotípussal és stabil spontán mutációs gyakorisággal kell rendelkezniük. A HPRT-vizsgálatokhoz leggyakrabban használt sejtek közé tartoznak a CHO, CHL és V79-es kínai hörcsög sejtek, az L5178Y egér-limfómasejtek és a TK6-os humán limfoblasztoid sejtek (18) (19). Az XPRT-vizsgálathoz CHO-ból származó AS52-es sejteket használnak, amelyek tartalmazzák a gpt transzgént (és Hprt-génjüket kiütötték) (20) (21); a HPRT-vizsgálat AS52-es sejteken nem végezhető el, mert azok hprt-génjét kiütötték. Más sejtvonalak használatát indokolni és validálni kell.

10. A sejtvonalakat rutinszerűen ellenőrizni kell a modális kromoszómaszám stabilitása és az esetleges mikoplazmafertőzés szempontjából (22) (23), és a sejtek nem használhatók fel, ha fertőzöttek vagy ha a modális kromoszómaszám megváltozott. A vizsgálólaboratóriumban használt sejtek rendes sejtciklusidejét meg kell állapítani, és annak összhangban kell lennie a közzétett sejtjellemzőkkel. Az induló sejtkészletben is ellenőrizni kell a spontán mutációs gyakoriságot, és a sejteket nem szabad felhasználni, ha a mutációs gyakoriság nem elfogadható.

11. A vizsgálatban való felhasználás előtt a sejtkultúrákat, amennyiben szükséges, meg kell tisztítani a jelen lévő mutáns sejtektől, például HAT-tápfolyadékban történő tenyésztéssel a HPRT-vizsgálatnál, és MPA-tápfolyadékban az XPRT-vizsgálatnál (5) (24) (lásd az 1. függeléket). A megtisztított sejtek fagyasztással tartósíthatók, majd felolvasztva munkakészletként használhatók. Az újonnan felolvasztott munkakészlet azt követően használható fel a vizsgálathoz, hogy elérte szokásos megduplázódási idejét. XPRT-vizsgálat végzésekor a szokásos módon tenyésztett AS52-es sejtek számára olyan körülményeket kell biztosítani, amelyek garantálják a gpt-transzgén fennmaradását (20).

Tápfolyadék és tenyésztési körülmények

12. A tenyészetek fenntartására megfelelő tápfolyadékot és inkubációs feltételeket kell biztosítani (tenyésztőedények, 5 %-os CO2-koncentrációjú, vízgőzzel telített levegő és 37 °C-os inkubációs hőmérséklet). A sejttenyészeteket mindig olyan körülmények között kell tartani, amelyek biztosítják az exponenciális növekedési szakaszt. Különösen fontos a tenyészközeg és a tenyésztési körülmények olyan módon történő megválasztása, hogy azok biztosítsák az optimális növekedési feltételeket az expressziós időszak alatt, valamint azt, hogy mind a vad típusú, mind a mutáns sejtvonalak kolóniaképző képessége optimális legyen.

A tenyészetek előkészítése

13. A sejtvonalakat törzstenyészetekből kell felszaporítani, majd tápfolyadékba leoltani olyan sejtszámmal, hogy a sejtek a szuszpenziókban vagy az egyrétegű tenyészetekben a teljes kezelési és expressziós időszakban exponenciálisan növekedjenek (az egyrétegű tenyészetekben növő sejtek esetében például kerülendő a konfluencia).

Metabolikus aktiválás

14. Nem megfelelő endogén metabolikus képességű sejtek használata esetén exogén metabolikus aktivációs rendszereket kell alkalmazni. A leggyakrabban használt rendszer – amely egyéb indok fennállása hiányában általánosságban ajánlott – a kofaktorokkal kiegészített mitokondriális frakció (S9), amelyet rágcsálók (általában patkány) olyan enzimindukáló reagensekkel kezelt májából izolálnak, mint az Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28), vagy a fenobarbitál és β-naftoflavon kombinációja (29) (30) (31) (32). Ez utóbbi kombináció nem ütközik a környezetben tartósan megmaradó szerves szennyező anyagokról szóló stockholmi egyezménnyel (33), és kimutatták róla, hogy hatékonysága a vegyes funkciójú oxidázok indukálásához az Aroclor 1254-ével megegyező (29) (31). Az S9 frakció jellemzően 1–2 térfogatszázalék koncentrációban használatos, de a végső vizsgálati közegben 10 térfogatszázalékra növelhető. Az alkalmazott exogén metabolikus aktivációs rendszer vagy metabolikus induktor típusának és koncentrációjának megválasztását befolyásolhatja a vizsgált anyagok osztálya (34) (35) (36).

A vizsgálati vegyi anyag előkészítése

15. A szilárd halmazállapotú vizsgálati vegyi anyagokat a sejtek kezelése előtt megfelelő oldószerrel elő kell kezelni, és szükség esetén hígítani kell (lásd a 16. pontot). A folyékony halmazállapotú vizsgálati vegyi anyagok közvetlenül hozzáadhatók a vizsgálati rendszerhez és/vagy hígíthatók a vizsgálati rendszer kezelése előtt. A gáz halmazállapotú vagy illékony vizsgálati vegyi anyagokat a standard protokollok megfelelő módosításával, például légmentesen lezárt tenyésztőedényekben történő kezeléssel kell vizsgálni (37) (38). A vizsgálati vegyi anyagot tartalmazó készítményeket közvetlenül a kezelés előtt kell előállítani, kivéve, ha az anyag tárolás során való stabilitása bizonyított.

VIZSGÁLATI KÖRÜLMÉNYEK

Oldószerek

16. Az oldószert oly módon kell kiválasztani, hogy optimális oldhatóságot biztosítson a vizsgálati vegyi anyagnak, ugyanakkor ne befolyásolja hátrányosan a vizsgálat lebonyolítását, vagyis ne változtassa meg a sejtek növekedését, ne befolyásolja a vizsgálati vegyi anyag integritását, ne lépjen reakcióba a tenyésztőedényekkel, és ne károsítsa a metabolikus aktivációs rendszert. Amennyiben lehetséges, először valamilyen vizes oldószer (vagy tápfolyadék) használatát érdemes megfontolni. Jól bevált oldószer például a víz és a dimetil-szulfoxid. A szerves oldószerek koncentrációja a végleges kezelési közegben általában ne haladja meg az 1 térfogatszázalékot, a vizes oldószereké (sóoldat vagy víz) pedig a 10 térfogatszázalékot. Nem bevált oldószerek (például etanol vagy aceton) használata esetében a vizsgálati vegyi anyaggal és a vizsgálati rendszerrel való összeegyeztethetőségükre utaló adatokkal kell alátámasztani használatukat és azt, hogy a használt koncentrációnál nem genotoxikusak. Alátámasztó adatok hiányában szükséges nem kezelt kontrollok alkalmazása is (lásd az 1. függeléket) annak bizonyítására, hogy a kiválasztott oldószer nem vált ki káros vagy mutagén hatást.

A citotoxicitás mérése és az expozíciós koncentrációk kiválasztása

17. A vizsgálati vegyi anyag legmagasabb koncentrációjának meghatározása során kerülendő az olyan koncentráció, amely hamis pozitív válaszreakciókat válthat ki, mint például a túlzott citotoxicitást okozó koncentráció (lásd a 20. pontot), a tápfolyadékban történő kicsapódást okozó koncentráció (lásd a 21. pontot), illetve a pH vagy az ozmolalitás jelentős változását okozó koncentráció (lásd az 5. pontot). Ha a vizsgálati vegyi anyag a hozzáadásakor jelentős változást okoz a tenyészközeg pH-jában, a pH a kezelésre szolgáló végleges tenyészközeg pufferelésével kiigazítható, hogy elkerülhetők legyenek a hamis pozitív eredmények és megfelelő tenyésztési feltételeket lehessen fenntartani.

18. A koncentráció kiválasztása a citotoxicitás és egyéb megfontolások alapján történik (lásd a 20–22. pontot). Bár a fő vizsgálatban alkalmazandó koncentrációk jobb meghatározásához egy előzetes vizsgálatban érdemes meghatározni a citotoxicitást, az előzetes vizsgálat nem követelmény. Még ha sor is kerül a citotoxicitás előzetes meghatározására, a fő vizsgálat során minden kultúrára el kell végezni a citotoxicitás mérését. A citotoxicitást a relatív túlélés alapján kell értékelni, amely a közvetlenül a kezelést követően átültetett sejtek kolóniaképző képessége (CE), kiigazítva a kezelés során bekövetkezett sejtpusztulással, majd összevetve a negatív kontrollok (ezek túlélési aránya 100 %-nak tekintendő) kiigazított kolóniaképző képességével (a képletet lásd a 2. függelékben).

19. Legalább négy, az elfogadhatósági kritériumokat (megfelelő citotoxicitás, sejtszám stb.) teljesítő vizsgálati koncentrációt ki kell értékelni (az oldószeres és a pozitív kontrollokon túl). Bár két párhuzamos tenyészet használata ajánlott, az egyes vizsgált koncentrációknál párhuzamos vagy szimpla kezelt tenyészetek használhatók. A független párhuzamos tenyészetekben adott koncentráció mellett kapott eredményeket külön kell dokumentálni, az adatelemzéshez azonban összevonhatók (17). Az alacsony citotoxicitást vagy a citotoxicitás hiányát mutató vizsgálati vegyi anyagok esetében rendszerint megközelítőleg kétszeres-háromszoros koncentrációs intervallumok helyénvalóak. Citotoxicitás esetén a választott vizsgálati koncentrációknak le kell fedniük a citotoxicitást okozó koncentrációtól az azon koncentrációkig terjedő tartományt, ahol mérsékelt vagy alacsony a citotoxicitás, illetve nem jelentkezik citotoxicitás. Számos vizsgálati vegyi anyagnak meredek a koncentráció-válasz görbéje, és annak érdekében, hogy a citotoxicitás teljes tartományát le lehessen fedni, vagy részletesen meg lehessen vizsgálni a koncentráció-válasz összefüggést, szükség lehet egymáshoz közelebbi koncentrációk és négynél több koncentráció használatára, különösen olyan helyzetekben, ahol megismételt kísérlet szükséges (lásd a 43. pontot). Négynél több koncentráció alkalmazásának különösen szimpla tenyészetek alkalmazása esetében lehet jelentősége.

20. Ha a legnagyobb koncentráció a citotoxicitáson alapul, a legmagasabb koncentrációval 10 és 20 % közötti relatív túlélési arányt kell megcélozni. A kizárólag 10 %-os vagy az alatti relatív túlélésnél jelentkező pozitív eredmények kiértékelése során körültekintően kell eljárni (43. pont).

21. A legalacsonyabb oldhatatlan koncentrációnál alacsonyabb koncentrációk mellett nem citotoxikus, nehezen oldható vizsgálati vegyi anyagok esetében a legmagasabb analizált koncentrációnak a vizsgálati vegyi anyaggal történő kezelés végén szemmel vagy inverz mikroszkóp segítségével látható zavarosságot vagy kicsapódást kell okoznia. Még abban az esetben is, ha a citotoxicitás a legalacsonyabb oldhatatlan koncentráció felett jön létre, ajánlatos egyetlen egy, zavarosságot vagy látható kicsapódást okozó koncentrációt vizsgálni, mivel a kicsapódás fals hatásokat eredményezhet. A kicsapódást okozó koncentrációnál ügyelni kell annak biztosítására, hogy a kicsapódás ne zavarja a vizsgálat lebonyolítását. Hasznos lehet a tápfolyadékban való oldhatóság meghatározása a kísérlet előtt.

22. Ha nem figyelhető meg kicsapódás vagy korlátozó citotoxicitás, a legmagasabb vizsgálati koncentrációnak 10 mM-nek, 2 mg/ml-nek vagy 2 µl/ml-nek kell megfelelnie, melyek közül a legalacsonyabb a mérvadó (39) (40). Ha a vizsgálati vegyi anyag nem meghatározott összetételű, például ismeretlen vagy változó összetételű anyag, komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok (vagyis úgynevezett ismeretlen vagy változó összetételű vegyi anyagok (UVCB-k)) (41), környezeti extraktum stb., előfordulhat, hogy kellő citotoxicitás hiányában a legmagasabb koncentrációnak magasabbnak (például 5 mg/ml-nek) kell lennie ahhoz, hogy növekedjen az egyes összetevők koncentrációja. Megjegyzendő azonban, hogy ezek a követelmények eltérőek lehetnek a humán gyógyszerek esetében (42).

Kontrollok

23. Minden kísérleti körülménynél párhuzamos negatív kontrollokat kell használni (lásd a 16. pontot), amelyeknél csak oldószert alkalmaznak a tenyészközegben, és a kezelésük ugyanolyan módon történik, mint a kezelt tenyészeteké.

24. Párhuzamos pozitív kontrollok szükségesek annak igazolására, hogy a laboratórium képes az alkalmazott vizsgálati protokoll feltételei mellett mutagének azonosítására, valamint adott esetben az exogén metabolikus aktivációs rendszer eredményességének igazolására. Pozitív kontrollokra vonatkozó példák az alábbi 1. táblázatban találhatók. Indokolt esetben pozitív kontrollként alternatív anyagok használhatók. Mivel az emlőssejtek genetikai toxicitás szempontjából végzett *in vitro* vizsgálatai kellően szabványosítottak, az exogén metabolikus aktiváló rendszerrel vagy anélkül végzett kezeléseket alkalmazó vizsgálatok elvégezhetők mindössze egy – metabolikus aktiválást igénylő – pozitív kontrollal. Ebben az esetben ezen egyetlen pozitív kontroll válaszreakciója a metabolikus aktiváló rendszer aktivitását és a vizsgálati rendszer reagálóképességét is bizonyítja. Mindegyik pozitív kontrollt egy vagy több olyan koncentrációban kell alkalmazni, amely a háttérértékekhez viszonyítva reprodukálható és kimutatható növekedést okoz, hogy bizonyítani lehessen a vizsgálati rendszer érzékenységét, és a választ nem veszélyeztetheti a vizsgálati módszerben meghatározott határértékeket meghaladó citotoxicitás (lásd a 20. pontot).

1. táblázat

A laboratóriumok jártasságának értékeléséhez és a pozitív kontrollok kiválasztásához ajánlott referenciaanyagok

Metabolikus aktivációs körülmények	Lókusz	Anyag és CAS-szám
Exogén metabolikus aktiválás nélkül	*Hprt*	Etil-metán-szulfonát [CAS-szám: 62-50-0] Etil-nitrozo-karbamid [CAS-szám: 759-73-9] 4-Nitro-kinolin-1-oxid [CAS-szám: 56-57-5]
	xprt	Sztreptonigrin [CAS-szám: 3930-19-6] Mitomicin-C [CAS-szám: 50-07-7]
Exogén metabolikus aktiválással	*Hprt*	3-Metil-kolantrén [CAS-szám: 56-49-5] 7,12-Dimetil-benzantracén [CAS-szám: 57-97-6] Benzo[a]pirén [CAS-szám: 50-32-8]
	xprt	Benzo[a]pirén [CAS-szám: 50-32-8]

ELJÁRÁS

Kezelés a vizsgálati vegyi anyaggal

25. A proliferáló sejteket metabolikus aktivációs rendszer jelenlétében és hiányában kezelik a vizsgálati vegyi anyaggal. Az expozíciónak megfelelő időtartamig kell tartania (ez rendszerint 3–6 óra).

26. Az egyes vizsgálati (kontroll és kezelt) tenyészetekhez a vizsgálat bármely szakaszában alkalmazott minimális sejtszámnak a spontán mutációs gyakoriságon kell alapulnia. Általános iránymutatásként annyi sejtet kell kezelni és passzálni, amely elegendő ahhoz, hogy a vizsgálat minden szakaszában valamennyi tenyészetben előforduljon 10 spontán mutáció (17). A spontán mutációs gyakoriság rendszerint 5 és 20×10^{-6} közé esik. Az 5×10^{-6} spontán mutációs gyakoriság érdekében, valamint hogy biztosítani lehessen a spontán mutációk megfelelő számát (10 vagy több), még a kezelés során 90 %-os citotoxicitást (10 %-os relatív túlélést) okozó koncentrációk mellett kezelt tenyészetek esetében is legalább 20×10^{6} sejt kezelése szükséges. Emellett az expressziós időszak során elegendő számú (2 milliónál soha nem kevesebb) sejtet kell tenyészteni majd leültetni a mutáns kiválasztásához (17).

A fenotípusos expresszió ideje és a mutációs gyakoriság mérése

27. A kezelési időszak után a sejteket tovább kell tenyészteni, hogy a mutáns fenotípus kifejlődhessen. Általában 7–9 nap elegendő a frissen indukált Hprt- és xprt-mutánsok közel optimális fenotípusos expressziójához (43) (44). Ezen időszak alatt a sejteket az exponenciális növekedésük fenntartása érdekében rendszeresen át kell ültetni. A fenotípusos expressziót követően a sejteket újból leültetik a szelekciós ágenst (6-tioguanint) tartalmazó, illetve szelekciós ágens nélküli tápfolyadékba, hogy a kiválasztás időpontjában meg lehessen határozni a mutánsok számát, illetve a kolóniaképző képességet. A leültetés egyrétegű tenyészetek esetében végezhető tenyésztőedényekben, vagy sejtszuszpenzió esetén mikrotiter lemezeken. A mutánsok kiválasztásához a sejteket olyan sűrűségben kell átültetni, amely biztosítja a mutánsok optimális kinyerését (azaz elkerülhetővé teszi a metabolikus együttműködést) (17). A lemezeket a telepek optimális növekedését lehetővé tévő ideig (pl. 7–12 napig) inkubálni kell, és meg kell számolni a telepeket. A mutációs gyakoriság kiszámításának alapja a mutáns telepek száma, kiigazítva a mutánsok kiválasztásának idején mért kolóniaképző képességgel (a képleteket lásd a 2. függelékben).

A laboratórium jártassága

28. A laboratóriumoknak a vizsgálat rutinszerű alkalmazása előtti elegendő tapasztalat igazolása érdekében kísérletsorozatot kell végrehajtaniuk referenciaként szolgáló, különböző mechanizmussal ható pozitív anyagokkal (legalább egy metabolikus aktiválással és legalább egy metabolikus aktiválás nélkül ható, az 1. táblázatban felsoroltak közül kiválasztott anyaggal), és különböző negatív kontrollokkal (különféle oldószerek/vivőanyagok használatával). E pozitív és negatív kontrollok válaszreakcióinak összhangban kell lenniük a szakirodalommal. Ez nem vonatkozik azokra a laboratóriumokra, amelyek tapasztalattal rendelkeznek, azaz amelyeknek a rendelkezésére áll a 30–33. pontban meghatározott, történeti adatokat tartalmazó adatbázis.

29. A pozitív kontrollként kiválasztott anyagokat (lásd a 25. pontban szereplő 1. táblázatot) metabolikus aktiválás nélkül és metabolikus aktiválással is meg kell vizsgálni a laboratórium mutagén hatású vegyi anyagok kimutatásában és a metabolikus aktivációs rendszer hatékonyságának meghatározásában való jártasságának bizonyítására, valamint be kell mutatni, hogy a laboratórium megfelelően végzi a kezelés alatt a sejttenyésztést, a fenotípusos expressziót és a mutánsok kiválasztását, továbbá, hogy a kiértékelési eljárások is megfelelőek. A vizsgálati rendszer érzékenységének és dinamikus tartományának bizonyítása érdekében a kiválasztott anyagok koncentrációtartományát úgy kell megválasztani, hogy reprodukálható és koncentrációval összefüggő növekedést biztosítson a háttérértékekhez viszonyítva.

Történeti kontrolladatok

30. A laboratóriumnak meg kell állapítania a következőket:

— a pozitív történeti kontrollok tartománya és eloszlása,

— a negatív (nem kezelt, oldószeres) történeti kontrollok tartománya és eloszlása.

31. A negatív történeti kontrollok eloszlásához kapcsolódó első adatgyűjtés során a párhuzamos negatív kontrolloknak összhangban kell lenniük a kontrollokra vonatkozóan közzétett adatokkal (22). Amint több kísérleti adat is felvételre kerül a kontrollok eloszlásához, a párhuzamos negatív kontrolloknak ideális esetben az eloszlás 95 %-os ellenőrzési határértékén belül kell lenniük (17) (45) (46).

32. A laboratórium negatív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisát első lépésként legalább 10 kísérlettel kell kiépíteni, de az adatbázisnak lehetőség szerint legalább 20, összehasonlítható kísérleti körülmények között végzett kísérletet kell tartalmaznia. A laboratóriumoknak minőségellenőrzési módszereket, például ellenőrzési diagramokat (C-diagramokat vagy X-bar diagramokat (47)) kell alkalmazniuk annak meghatározására, hogy a pozitív és a negatív kontrollokra vonatkozó adataik mennyire változóak, valamint annak bizonyítására, hogy a laboratóriumukban a módszertan „ellenőrzés alatt” áll (46). A történeti adatok összeállításának és felhasználásának módjára (azaz az adatok történeti adatok közé történő felvételének és azok közül való kizárásának kritériumaira, valamint egy adott kísérlet elfogadhatósági kritériumaira) vonatkozó további ajánlások a szakirodalomban találhatók (45).

33. A negatív kontrollokra vonatkozó adatoknak tartalmazniuk kell a szimpla tenyészetből vagy lehetőség szerint a párhuzamos tenyészetekből származó mutációs gyakoriságot, ahogyan az a 23. pontban szerepel. A párhuzamos negatív kontrolloknak ideális esetben a laboratórium negatív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisa szerinti eloszlás 95 %-os ellenőrzési határértékén belül kell lenniük (17) (45) (46). Amennyiben a párhuzamos negatív kontrollokra vonatkozó adatok a 95 %-os ellenőrzési határértéken kívül esnek, akkor számíthatók be a kontrollok történeti eloszlásába, ha ezek az adatok nem szélsőségesen kiugró értékek, továbbá bizonyíték van arra, hogy a vizsgálati rendszer „ellenőrzés alatt áll” (lásd fent), valamint arra, hogy nem áll fenn szakmai vagy emberi mulasztás.

34. A kísérleti protokoll bármely módosítását meg kell vizsgálni abból a szempontból, hogy összhangban van-e a laboratórium meglévő történeti kontrolladatbázisaival. Jelentősebb következetlenségek fennállása esetén új történeti kontrolladatbázist kell létrehozni.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Az eredmények értékelése

35. Az eredmények értékelésének tartalmaznia kell a (relatív túlélési arányban kifejezett) citotoxicitás kiszámításához szükséges valamennyi adatot. Az adatoknak mind a kezelt, mind a kontrolltenyészetek esetén magukban kell foglalniuk a kezelés végén mért sejtszámot, a közvetlenül a kezelés után átültetett sejtek számát és a telepek számát (illetve mikrotiter módszer használata esetén a telepet nem tartalmazó lyukak számát). Az egyes tenyészetek relatív túlélését a párhuzamos oldószeres kontrollhoz viszonyított százalékarányban kell kifejezni (a fogalommeghatározásokat lásd az 1. függelékben).

36. Az eredmények bemutatásának tartalmaznia kell ezenfelül a mutációs gyakoriság kiszámításához szükséges valamennyi adatot. A kezelt tenyészetekre és a kontrolltenyészetekre vonatkozó adatoknak ki kell terjedniük: (1) a szelekciós ágenssel és anélkül leültetett sejtek számára (a mutánsok kiválasztása céljából történő leültetés időpontjában), valamint (2) a szelekciós ágenst tartalmazó és nem tartalmazó lemezeken számolt telepek számára (illetve mikrotiter módszer használata esetén a telepet nem tartalmazó lyukak számára). A mutációs gyakoriság kiszámításának alapja a mutáns telepek száma (a szelekciós ágenst tartalmazó lemezeken) kiigazítva a (szelekciós ágenst nem tartalmazó lemezeken mért) kolóniaképző képességgel. A mutációs gyakoriságot az 1 millió életképes sejtre jutó mutáns sejtek számaként kell kifejezni (a fogalommeghatározásokat lásd az 1. függelékben).

37. Fel kell jegyezni az egyes tenyészetekhez tartozó adatokat. Ezenkívül az összes adatot össze kell foglalni táblázatos formában.

Elfogadhatósági kritériumok

38. Egy-egy vizsgálat elfogadhatósága az alábbi kritériumokon alapul:

— A párhuzamos negatív kontroll a 33. pont szerint foglalható bele a laboratórium negatív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisába.

— A párhuzamos pozitív kontrolloknak (lásd a 24. pontot) a pozitív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisban generált válaszreakciókkal összeegyeztethető válaszokat, valamint a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva statisztikailag szignifikáns növekedést kell előidézniük.

— Két kísérleti körülmény (metabolikus aktiválással és metabolikus aktiválás nélkül történő) vizsgálatára került sor, kivéve, ha az egyik pozitív eredményeket hozott (lásd a 25. pontot).

— Megfelelő számú sejt és koncentráció elemezhető (25., 26. és 19. pont).

— A legmagasabb koncentráció kiválasztására vonatkozó kritériumok összhangban vannak a 20., 21. és 22. pontban ismertetett kritériumokkal.

Az eredmények értékelése és értelmezése

39. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen pozitívnak minősül, ha a vizsgált kísérleti körülmények bármelyikében:

— legalább az egyik vizsgálati koncentráció statisztikailag szignifikáns növekedést mutat a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva,

— a megfelelő trendpróbával történő értékelés arra utal, hogy a növekedés a koncentrációval összefügg,

— ezen eredmények bármelyike a negatív történeti kontrolladatok eloszlásán (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértéken) kívül esik; lásd a 33. pontot).

Ezen kritériumok mindegyikének teljesülése esetén úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag ebben a vizsgálati rendszerben képes génmutációkat előidézni a tenyésztett emlőssejtekben. A legmegfelelőbb statisztikai módszerekre vonatkozó ajánlások megtalálhatók a szakirodalomban (46) (48).

40. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen negatívnak minősül, ha valamennyi vizsgált kísérleti körülmény esetén fennáll, hogy:

— a vizsgálati koncentrációk egyike sem mutat statisztikailag szignifikáns növekedést a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva, a megfelelő trendpróbával végzett értékelés nem mutat koncentrációval összefüggő növekedést,

— valamennyi eredmény a negatív történeti kontrolladatok eloszlásán (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértéken) belül van; lásd a 33. pontot).

Ezt követően úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag ebben a vizsgálati rendszerben nem képes génmutációkat előidézni a tenyésztett emlőssejtekben.

41. Az egyértelműen pozitív vagy negatív válasz igazolása nem követelmény.

42. Olyan esetekben, amikor a válaszreakció – a fentiekben leírtak szerint – nem egyértelműen negatív vagy pozitív, illetve egy adott eredmény biológiai relevanciája megállapításának alátámasztása érdekében az adatokat szakértői vélemény és/vagy további vizsgálatok alapján kell értékelni. Hasznos lehet egy megismételt kísérlet lehetőleg módosított kísérleti körülmények (például a koncentrációk felosztása, más [S9-es koncentráció vagy S9 eredetű] metabolikus aktiválási feltételek) melletti elvégzése.

43. Ritka esetekben az adatkészlet még további vizsgálatok után is eleve kizárja a pozitív vagy negatív eredményekre vonatkozó következtetést. Ezért a vizsgálati vegyi anyag válaszreakcióját kétértelműnek kell minősíteni (amit úgy kell értelmezni, hogy egyenlő valószínűséggel tekinthető pozitívnak és negatívnak).

Vizsgálati jelentés

44. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag:

— eredet, gyártási szám, felhasználási határidő, ha rendelkezésre áll;

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, ha ismert;

— a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben, ha ismert;

— adott esetben a pH-érték, az ozmolalitás és a kicsapódás mérése abban a tápfolyadékban, amelyhez a vizsgálati vegyi anyagot hozzáadták.

Egy összetevőből álló anyag:

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi

— előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai révén jellemezve.

Oldószer:

— az oldószer kiválasztásának indokolása;

— az oldószernek a végleges tápfolyadékon belüli aránya.

Sejtek:

Laboratóriumi törzstenyészetek esetén:

— a sejtvonalak típusa és eredete;

— a passzálások száma, ha rendelkezésre áll, és története a laboratóriumban;

— a kariotípus jellemzői és/vagy a modális kromoszómaszám;

— a sejttenyészetek fenntartásának módszerei.

— a mikoplazmamentesség;

— sejt megduplázódási ideje.

Vizsgálati körülmények:

— a koncentrációk kiválasztásának és a tenyészetek számának indokolása, beleértve például a citotoxicitási adatokat és az oldhatóságra vonatkozó korlátokat;

— a közeg összetétele, CO_2-koncentráció, páratartalom;

— a vizsgálati vegyi anyag koncentrációja a tápfolyadékon belüli végső koncentrációjaként kifejezve (például µg vagy mg/a tápfolyadék ml-e vagy mM-ja);

— a tápfolyadékhoz adott oldószer és vizsgálati vegyi anyag koncentrációja (és/vagy térfogata);

— inkubációs hőmérséklet;

— inkubációs idő;

— a kezelés időtartama;

— sejtsűrűség a kezelés időtartama alatt;

— a metabolikus aktivációs rendszer típusa és összetétele (az S9 eredete, az S9 keverék elkészítési módszerei, az S9 keverék és az S9 koncentrációja vagy térfogata a végleges tápfolyadékban, az S9 minőségellenőrzése);

— pozitív és negatív kontrollként szolgáló anyagok, végső koncentrációk az egyes kezelési körülmények esetén;

— az expressziós időszak hossza (beleértve a leültetett sejtek számát, a szubkultúrákat és a tápfolyadékok cseréjét, ha szükséges);

— a szelekciós ágens neve és koncentrációja;

— a vizsgálatok elfogadhatósági kritériumai;

— az életképes és mutáns sejtek számának megállapítására használt módszerek;

— a citotoxicitás mérésére alkalmazott módszerek;

— a citotoxicitás és az alkalmazott módszer szempontjából lényeges kiegészítő információk;

— a leültetést követően végzett inkubálás időtartama;

— azok a kritériumok, amelyek meghatározzák, hogy a vizsgálatok pozitívnak, negatívnak vagy többféleképpen értelmezhetőnek tekintendők-e;

— a pH-érték, az ozmolalitás és a kicsapódás meghatározására alkalmazott módszerek.

Eredmények:

— az egyes tenyészetek esetében kezelt sejtek és átültetett sejtek száma;

— a citotoxicitás mérése és egyéb megfigyelések, ha vannak ilyenek;

— a kicsapódás jelei és a meghatározás időpontja;

— a szelektív és nem szelektív folyadékba leültetett sejtek száma;

— a telepek száma a nem szelektív közegben és a rezisztens telepek száma a szelektív közegben, valamint az ezeknél tapasztalható mutációs gyakoriság;

— amennyiben lehetséges, a koncentráció-válasz összefüggés;

— a párhuzamos negatív (oldószeres) és a pozitív kontrollokra vonatkozó adatok (koncentrációk és oldószerek);

— a történeti negatív (oldószeres) és a pozitív kontrollokra vonatkozó adatok, a tartományok, az átlagok, a szórás és a konfidencia-intervallum (pl. 95 %) megadásával, továbbá az adatok száma;

— statisztikai elemzések (az egyes tenyészetek és adott esetben az összevont párhuzamos tenyészetek tekintetében), valamint p-értékek, ha meghatározásra kerültek.

Az eredmények értékelése.

Következtetések

SZAKIRODALOM

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Párizs.

(2) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, New York.

(3) Chu E.H.Y. and Malling H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, 1306-1312.

(4) Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. and Dearfield K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagen. Res., 4, 394-403.

(5) Aaron C.S. and Stankowski Jr. L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res., 223, 121-128.

(6) Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. and Thompson E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res., 312, 235-239.

(7) Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. and Wasson J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program. Mutation Res., 196, 17-36.

(8) Scott D., Galloway S.M., Marshall R.R., Ishidate M., Brusick D., Ashby J. and Myhr B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A Report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147-204.

(9) Morita T., Nagaki T., Fukuda I. and Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268, 297-305.

(10) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations, Environ. Mutagen., 8, 789-886.

(11) Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. and Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutation Res., 49, 439-452.

(12) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. and Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634, 177-183.

(13) Kirkland D., Aardema M., Henderson L., and Müller L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. Mutation Res., 5841-256.

(14) Li A.P., Carver J.H., Choy W.N., Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O'Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. and Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135-141.

(15) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, 9-17.

(16) Stankowski L.F. Jr., Tindall K.R. and Hsie A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, 133-147.

(17) Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. and Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds.), Cambridge University Press, pp. 66-101.

(18) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P., and Whitfield B.L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, Mutation Res., 86, 193-214.

(19) Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, Mutation Res., 85, 165-175.

(20) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R., and Hsie A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2*gpt*-Transformed Cells, Mol. Cell. Biol., 4, 1411-1415.

(21) Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M., and Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. Proc Natl Acad Sci., 83(24): 9616-9620.

(22) Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A., Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Előkészület alatt álló kézirat).

(23) Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. and Stokes W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, ATLA, 33, 261-287.

(24) Rosen M.P., San R.H.C. and Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, Can. Lett. 8, 299-305.

(25) Natarajan A.T., Tates A.D, Van Buul P.P.W., Meijers M. and de Vogel N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37, 83-90.

(26) Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. and Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365-373.

(27) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, 347-364.

(28) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173, 215.

(29) Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. and Wolf R.C. (1992) Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen. 7, 175-177.

(30) Matsushima T., Sawamura M., Hara K. and Sugimura T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. and Philpot R.M. (szerk.), Elsevier, North-Holland, 85-88.

(31) Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. and Zeiger E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. Pathol. *Toxicol.*, 4, 55-65.

(32) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28, 51-59.

(33) UNEP. (2001). A környezetben tartósan megmaradó szerves szennyező anyagokról szóló stockholmi egyezmény, az ENSZ Környezetvédelmi Programja (UNEP). Elérhető a következő címen: [http:// www.pops.int.html].

(34) Tan E.-L. and Hsie A.W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina Cγ Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT System. Mutation Res., 84, 147-156.

(35) O'Neill J.P., Machanoff R., San Sebastian J.R., Hsie A.W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Cammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. Environ. Mol. Mutation., 4, 7-18.

(36) Li, A.P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. Environ. Mol. Mutation, 4, 7-18.

(37) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.) Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, 91-103.

(38) Zamora P.O., Benson J.M., Li A.P. and Brooks A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen., 5, 795-801.

(39) OECD (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). Hozzáférés a Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezettől kérhető.

(40) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In vitro* Chromosome Aberrations Assay, Environ. Mol. Mutation, 54, 36-43.

(41) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Ismeretlen vagy változó összetételű vegyi anyagok, komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok: UVCB-k,

(42) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Elérhető a következő címen:[https://federalregister.gov/a/2012-13774].

(43) O'Neill J.P. and Hsie A.W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguranine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system), Mutation, Res., 59, 109-118.

(44) Chiewchanwit T., Ma H., El Zein R., Hallberg L., and Au W.W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. Mutation, Res., 1335(2):121-8.

(45) Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.J., and Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation,Res., 723, 87-90.

(46) OECD (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety, Series on testing and assessment (No 199), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(47) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O., and Phillips B. (1989). Analysis of Data from *In vitro* Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (szerk.) Cambridge University Press, Cambridge, 141-154.

(48) Fleiss J. L., Levin B., and Paik M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Bázispár-szubsztitúciót okozó mutagének: azok a vegyi anyagok, amelyek a bázispárok szubsztitúcióját okozzák a DNS-ben.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Kolóniaképző képesség: azon alacsony sűrűséggel leültetett sejtek százalékaránya, amelyek képesek megszámolható teleppé fejlődni.

Koncentrációk: a vizsgálati vegyi anyagnak a tápfolyadékon belüli végső koncentrációira utalnak.

Citotoxicitás: az e vizsgálati módszerbe tartozó vizsgálatok esetében a citotoxicitás a kezelt sejtek relatív túlélésének csökkenése a negatív kontrollhoz viszonyítva (lásd az adott pontot).

Forward (előremutató) mutáció: a mutáns alak szülőktől származó típusától eltérő olyan génmutáció, amely a kódolt protein enzimaktivitásának vagy funkciójának változását vagy elvesztését eredményezi.

Frameshiftet okozó mutagének: azok a vegyi anyagok, amelyek egy vagy több bázispár addícióját vagy delécióját okozzák a DNS-ben.

Genotoxikus: általános kifejezés, amely magába foglalja a DNS- vagy kromoszómakárosodás valamennyi típusát, köztük a DNS-töréseket, adduktok képződését, átrendeződéseket, mutációkat, kromoszómaaberrációkat és aneuploidiát. A genotoxikus hatások nem minden típusa eredményez mutációkat vagy stabil kromoszómakárosodást.

HAT-tápfolyadék: hipoxantint, aminopterint és timidint tartalmazó tápfolyadék, amelyet Hprt-mutánsok szelektálására alkalmaznak.

Mitotikus rekombináció: a mitózis során a homológ kromatidok rekombinációja, ami kettős szálú DNS-töréseket vagy a heterozigótaság elvesztését okozhatja.

MPA-tápfolyadék:: xantint, adenint, timidint, aminopterint és mikofenolsavat tartalmazó tápfolyadék, amelyet Xprt-mutánsok szelektálására használnak.

Mutagén: örökletes elváltozást idéz elő a génekben lévő DNS-bázispár-szekvenciá(k)ban vagy a kromoszómák szerkezetében (kromoszómaaberrációk).

Mutációs gyakoriság: a megfigyelt mutáns telepek számának és a szelektív tápfolyadékba leültetett sejtek számának aránya, kiigazítva a szelekció idején mért kolóniaképző képességgel (vagy életképességgel).

Fenotípusos expresszió ideje: a kezelést követő időtartam, amely során a genetikai változás rögzül a genomban, és a korábban meglévő géntermékek olyan mértékben kiürülnek, hogy a fenotípus-tulajdonság megváltozik.

Relatív túlélés: A relatív túlélést a kezelés okozta citotoxicitás mértékeként használják. A relatív túlélés a közvetlenül a kezelést követően átültetett sejtek kolóniaképző képessége, kiigazítva a kezelés során bekövetkezett sejtpusztulással, majd összevetve a negatív kontrollok (túlélési arányuk 100 %-nak tekintendő) kolóniaképző képességével.

S9 májfrakciók: 9 000 g centrifugálás utáni májhomogenátum felülúszója, azaz a nyers májextraktum.

S9 keverék: az S9 májfrakció és a metabolikus enzimaktivitáshoz szükséges kofaktorok keveréke.

Oldószeres kontroll: a csak a vizsgálati vegyi anyag feloldására használatos oldószert tartalmazó kontrolltenyészetek meghatározására szolgáló általános kifejezés.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Nem kezelt kontroll: nem kezelt (azaz sem a vizsgálati vegyi anyaggal, sem oldószerrel nem kezelt), de a vizsgálati vegyi anyagot befogadó tenyészetekkel párhuzamosan és azonos módon feldolgozott tenyészetek.

UVCB: ismeretlen vagy változó összetételű vegyi anyagok, komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok.

2. függelék

A CITOTOXICITÁS ÉS A MUTÁCIÓS GYAKORISÁG MEGHATÁROZÁSÁRA SZOLGÁLÓ KÉPLETEK

A citotoxicitást a relatív túlélés alapján kell értékelni, ami a közvetlenül a kezelést követően átültetett sejtek kolóniaképző képessége (CE), kiigazítva a kezelés során bekövetkezett sejtpusztulással, majd összevetve a negatív kontrollok (túlélési arányuk 100 %-nak tekintendő) kiigazított kolóniaképző képességével (lásd alább a relatív túlélés kiszámítására szolgáló képletet).

A vizsgálati vegyi anyaggal kezelt tenyészetek kiigazított kolóniaképző készségét az alábbi módon kell meghatározni:

$$\text{Kiigazított kolóniaképző készség} = \frac{\text{A sejtek száma a kezelés végéu}}{\text{A sejtek száma a kezelés kezdetén}}$$

A vizsgálati vegyi anyaggal kezelt tenyészetek relatív túlélését az alábbi módon kell meghatározni:

$$\text{Relatív túlélés} = \frac{\text{Kiigazított kolóniaképző készség kezelt tenyészetben}}{\text{Kiigazított kolóniaképző készség oldószeres kontroliban}} \times 100$$

A mutációs gyakoriság a szelektív tápfolyadékban lévő mutáns telepek kolóniaképző képességének és a nem szelektív tápfolyadék kolóniaképző képességének aránya, amelyet ugyanazon tenyészetre vonatkozva kell meghatározni, a szelekció időpontjában.

$$\text{Mutációs gyakoriság} = \frac{\text{Mutáns telepek kolóniaképző készsége szelektív médiumban}}{\text{Kolóniaképző készség nem szelektív közegben}}$$

Amikor lemezeket alkalmaznak a kolóniaképző képesség meghatározásához:

Kolóniaképző képesség = Telepek száma/leültetett sejtek száma.

Amikor mikrotiter lemezeket alkalmaznak a kolóniaképző képesség meghatározásához:

A mikrotiter lemezek egyes lyukaiban lévő telepek száma Poisson-eloszláson alapul.

Kolóniaképző képesség = -LnP(0)/az egyes lyukakba leültetett sejtek száma

Ahol a -LnP(0) az üres lyukak valószínűsíthető száma a leoltott lyukak számához képest, és az alábbi képlettel határozható meg:

LnP(0) = -Ln (üres lyukak száma/leültetett lyukak száma)”

3. A B. részben a B.22. fejezet helyébe a következő szöveg lép:

„B.22. **DOMINÁNS LETÁLIS VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓKON**

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 478. vizsgálati iránymutatásában (2016) leírt módszerrel. A vizsgálati módszereket a tudományos fejlődés, a változó szabályozási igények és az állatok kíméletére irányuló megfontolások figyelembevételével rendszeresen felülvizsgálják. A vizsgálati módszer jelenlegi felülvizsgált változata tükrözi a vizsgálat csaknem harminc éves alkalmazása során szerzett tapasztalatokat, valamint azon alapul, hogy ez a vizsgálat beépíthető más toxicitási vizsgálatokba, például fejlődési, reprodukciós vagy genotoxicitási vizsgálatokba, vagy azokkal együtt alkalmazható; mindazonáltal a vizsgálat – korlátaiból és a kísérleti állatok nagy számából fakadóan – nem alkalmas elsődleges módszerként való használatra, ehelyett kiegészítő vizsgálati módszerként alkalmazható kizárólag olyan esetekben, amikor más módszerrel nem lehet eleget tenni a szabályozási követelményeknek. A toxicitási vizsgálatok kombinálása révén jelentősen csökkenthető a toxicitási vizsgálatokban alkalmazandó állatok száma. Az OECD kidolgozott egy, a genetikai toxikológiai vizsgálatokról tömör tájékoztatást nyújtó, az OECD genetikai toxikológiára vonatkozó vizsgálati iránymutatásainak közelmúltbeli változásait áttekintő dokumentumot (1).

2. A domináns letális vizsgálat célja annak kimutatása, hogy egy adott vegyi anyag okoz-e a csírasejtekben kromoszóma-rendellenességre visszavezethető mutációkat. Emellett a domináns letális vizsgálat a genotoxicitás értékelése szempontjából is releváns, mert az *in vivo* metabolizmus, valamint a farmakokinetikai és a DNS-hibajavító eljárások tényezői – jóllehet fajonként eltérnek – aktívak és hozzájárulnak a reakcióhoz. A vizsgálati vegyi anyag beadását követően kimutatott domináns letális mutáció azt jelzi, hogy az adott vizsgálati vegyi anyag hatást gyakorolt a vizsgált állat csíraszöveteire.

3. A domináns letális mutációk embrionális, illetve magzati elhalást okoznak. A vizsgálati vegyi anyag beadását követően kimutatott domináns letális mutáció azt jelzi, hogy az adott vizsgálati vegyi anyag a vizsgált állat esetében hatást gyakorolt a csírasejtekre.

4. A domináns letális vizsgálat hasznos a szomatikus *in vivo* végpontok használatával végzett vizsgálatok pozitív eredményének megerősítésére, továbbá releváns végpontja a csírasejtvonalon keresztül átörökített genetikai betegségekben rejlő, embereket érintő veszélyek és kockázatok előrejelzésének. A vizsgálat ugyanakkor munkaigényes, és jelentős mennyiségű állat szükséges hozzá; következésképpen elvégzése rendkívül költséges és időigényes. Mivel a domináns letális mutációk spontán gyakorisága meglehetősen nagy, a vizsgálat általában korlátozott érzékenységgel bír a mutációs gyakoriság enyhe növekedésének észlelése terén.

5. A kulcsfontosságú fogalmak meghatározásai az 1. függelékben találhatók.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK

6. A vizsgálatot leginkább egereken végzik (2) (3) (4), de egyes esetekben – amennyiben tudományosan indokolt – más fajok, például patkányok (5) (6) (7) (8) is megfelelőek lehetnek. A domináns letális hatások általában nagymérvű kromoszómakárosodásra (szerkezeti és számbeli rendellenességekre) vezethetők vissza (9) (10) (11), de a génmutáció sem zárható ki az okok közül. A domináns letális mutáció magában a csírasejtben, illetve a megtermékenyítést követően a korai embrióban alakul ki, az ivarsejt hibás működését nem idézi elő, ugyanakkor a megtermékenyített pete vagy a fejlődő embrió elhalását okozza.

7. Minden egyes hímet megfelelő időközönként egymás után szűz nőstényekkel pároztatnak. A kezelést követő pároztatások száma a domináns letális vizsgálat végső céljától függ (23. pont), és azt úgy kell meghatározni, hogy a hím csírasejt érésének összes fázisát értékelni lehessen a domináns letális hatás szempontjából (12).

8. Ha létezik arra vonatkozó bizonyíték, hogy a vizsgálati vegyi anyag vagy annak metabolitja(i) nem éri(k) el a herét, e vizsgálat alkalmazása nem megfelelő.

A VIZSGÁLAT ELVE

9. Általában hím állatokat kezelnek megfelelő expozíciós úton a vizsgálati vegyi anyaggal, és a kezelt állatokat kezeletlen szűz nőstényekkel pároztatják. Egymás után következő pároztatási időszakok alkalmazásával különféle csírasejttípusok vizsgálhatók. A pároztatást követően megfelelő idő elteltével a nőstényeken eutanáziát hajtanak végre, majd méhüket megvizsgálva megállapítják a beágyazódások, valamint az élő és elhalt embriók számát. Egy adott vizsgálati vegyi anyag domináns letalitásának meghatározásához egybevetik a kezelt csoportban egy nőstényre jutó élő, beágyazódott embriók számát a vivőanyagos/oldószeres kontrollcsoportban egy nőstényre jutó élő, beágyazódott embriók számával. Az egy nőstényre jutó élettelen, beágyazódott embriók számának növekedése a kezelt csoportban a kontrollcsoportban tapasztalható hasonló adathoz képest a vizsgálati vegyi anyag által kiváltott, beágyazódás utáni veszteséget tükrözi. A beágyazódás utáni veszteség kiszámításához meghatározzák az elhalt és az összes beágyazódott embrió arányát a kezelt csoportban, majd összevetik azt a kontrollcsoport hasonló adatával. A beágyazódás előtti veszteség úgy becsülhető meg, hogy összehasonlítják a sárgatestek számából kivont összes beágyazódott embrió számát vagy az egy nőstényre jutó összes beágyazódott embrió számát a kezelt és kontrollcsoportokban.

A LABORATÓRIUM JÁRTASSÁGÁNAK IGAZOLÁSA

10. A vizsgálatban való jártasság igazolása érdekében a laboratóriumoknak bizonyítottan képesnek kell lenniük a közzétett adatok (például (13) (14) (15) (16) (17) (18)) szerinti domináns letalitási gyakoriság reprodukálására pozitív kontrollként szolgáló – például az 1. táblázatban felsorolt – anyagokkal (ideértve a gyenge reakciókat is) és vivőanyagos kontrollokkal, valamint a negatív kontrollokból származó adatoknak olyan gyakoriságot kell mutatniuk, amely összhangban áll az elfogadható adattartománnyal (lásd a fenti referenciákat) vagy a laboratóriumi történeti kontrollok eloszlásával, ha rendelkezésre állnak történeti adatok.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Előkészületek

Az állatfaj kiválasztása

11. Egészséges, ivarérett, általánosan használt laboratóriumi állattörzsekből származó állatokat kell alkalmazni. Általában egereket használnak, bár a patkányok is megfelelőek lehetnek. Bármely egyéb megfelelő emlősfaj használható, ha a jelentésben szerepel tudományos indokolás.

Az állatok tartásának és etetésének körülményei

12. Rágcsálók esetében a kísérleti állatok tartására szolgáló helyiség hőmérsékletének 22° C-nak (±3 ° C) kell lennie. Bár ideális esetben a helyiség relatív páratartalmának 50–60 %-nak kell lennie, legyen legalább 40 %, és a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmány megválasztását a vizsgálati vegyi anyaggal való megfelelő keveredés szükségessége is befolyásolhatja, ha a vizsgálati vegyi anyag beadása ilyen módon történik. Ha agresszív viselkedés nem várható és nem tapasztalható, a rágcsálókat kezelés és pároztatás előtt azonos nemű kis (legfeljebb öt) egyedből álló csoportokban, lehetőleg szilárd, megfelelő környezetgazdagítással ellátott ketrecekben kell tartani. Ha tudományos szempontból indokolt, az állatok egyedileg is elhelyezhetők.

Az állatok előkészítése

13. Egészséges és ivarérett felnőtt hím és nőstény állatokat osztanak véletlenszerűen a kontroll- és kezelt csoportokba. Az egyes állatokat humánus, minimálisan invazív módszerrel (például gyűrűzéssel, címkézéssel, mikrocsip beültetésével vagy biometrikus azonosítással, de a lábujj vagy a fül kilyukasztása nélkül) egyedi azonosítóval kell ellátni, és legalább öt napig szoktatni kell a laboratóriumi körülményekhez. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisak legyenek a ketrec elhelyezéséből adódó esetleges hatások. A pozitív kontrollal és a vizsgálati vegyi anyaggal való keresztszennyeződés kerülendő. A vizsgálat kezdetén az állatok tömege közötti eltérésnek minimálisnak kell lennie és nem haladhatja meg az ivaronkénti átlag ± 20 %-át.

A dózisok előkészítése

14. Az állatoknak történő adagolás előtt a szilárd halmazállapotú vizsgálati vegyi anyagokat fel kell oldani vagy szuszpendálni kell megfelelő oldószerben vagy vivőanyagban, vagy bele kell keverni a takarmányba vagy az ivóvízbe. A folyékony vizsgálati vegyi anyagok közvetlenül adagolhatók vagy az adagolás előtt hígíthatók. Belélegzéses expozíció esetén a vizsgálati vegyi anyagok fizikai-kémiai tulajdonságaiktól függően gáz, gőz vagy szilárd/folyadék aeroszol formában adagolhatók. A vizsgálati vegyi anyagból mindig friss készítményeket kell alkalmazni, kivéve akkor, ha a stabilitási adatok bizonyítják a tárolás elfogadhatóságát és meghatározzák a megfelelő tárolási feltételeket.

Vizsgálati körülmények

Oldószer/Vivőanyag

15. Az oldószer/vivőanyag nem okozhat toxikus hatásokat a választott dózisok mellett, és nem alkalmazható olyan anyag, amelyről feltehető, hogy kémiai reakcióba fog lépni a vizsgálati vegyi anyaggal. Jól ismert oldószerektől eltérő oldószerek/vivőanyagok alkalmazása esetén azok használatát alá kell támasztani a kompatibilitásukat jelző referenciaadatokkal. Amennyiben lehetséges, először valamilyen vizes oldószer/vivőanyag használatát ajánlatos megfontolni. Általánosan használt, kompatibilis oldószer/vivőanyag például többek között a víz, a fiziológiás sóoldat, a metil-cellulóz-oldat, a karboximetil-cellulóz-nátriumsó-oldat, az olívaolaj és a kukoricaolaj.

Pozitív kontrollok

16. Egyidejűleg alkalmazott pozitív kontrollállatokat mindig kell alkalmazni, kivéve ha a laboratórium igazolta a vizsgálat lebonyolításában szerzett jártasságát, és a közelmúltban (például az elmúlt 5 évben) rutinszerűen használta a vizsgálatot. Ugyanakkor a pozitív kontrollcsoportba tartozó állatok esetében nem szükséges a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt állatokéval megegyező adagolási módot alkalmazni, vagy mintát venni valamennyi pároztatási időszakokban. Pozitív kontrollként olyan anyagokat kell használni, amelyekről ismert, hogy a vizsgálati feltételek mellett domináns letális hatást fejtenek ki. A kezelés kivételével a kontrollcsoportokba osztott állatokat azonos bánásmódban kell részesíteni a kezelt csoportokban lévő állatokkal.

17. A pozitív kontrollanyagok dózisát úgy kell megválasztani, hogy enyhe vagy mérsékelt hatást fejtsenek ki, lehetővé téve a vizsgálat teljesítőképességének és érzékenységének kritikus értékelését, ugyanakkor megbízhatóan pozitív domináns letális hatást eredményezzenek. A pozitív kontrollként szolgáló anyagokra és a megfelelő dózisokra az 1. táblázat tartalmaz példákat.

1. táblázat

Példák pozitív kontrollként szolgáló anyagokra

Anyag [CAS-szám] (hivatkozási szám)	Effektív dózis tartománya (mg/kg) (rágcsáló fajok)	Adagolás időtartama (napokban)
Trietilén-melamin [51-18-3] (15)	0,25 (egerek)	1
Ciklofoszfamid [50-18-0] (19)	50–150 (egerek)	5
Ciklofoszfamid [50-18-0] (5)	25–100 (patkányok)	1
Etil-metánszulfonát[62-50-0] (13)	100-300 (egerek)	5
Akrilamid monomer [79-06-1] (17)	50 (egerek)	5
Klórambucil [305-03-3] (14)	25 (egerek)	1

Negatív kontrollok

18. Minden mintavételi időpontban negatív kontrollállatokat is kell használni, amelyeket csak oldószerrel vagy vivőanyaggal kezeltek, és a kezelésük egyébiránt ugyanolyan módon történik, mint a kezelt csoportoké (20). Ha nem állnak rendelkezésre olyan történeti vagy publikált kontrolladatok, amelyek igazolják, hogy a választott oldószer/vivőanyag nem idéz elő domináns letális vagy egyéb káros hatásokat, a vivőanyagos kontroll elfogadhatóságának megállapítása érdekében nem kezelt kontrollállatokat is alkalmazni kell minden mintavételi időpontban.

ELJÁRÁS

Az állatok száma

19. Minden egyes hímet előre meghatározott megfelelő időközönként (például hetente egyszer, 21. és 23. pont) egymás után, lehetőleg egyetlen szűz nősténnyel pároztatnak. A hímek csoportonkénti számát előre meg kell határozni, méghozzá úgy, hogy (az egyes pároztatási időszakokban pároztatott nőstényekkel együtt) kellő létszámban legyenek ahhoz, hogy megfelelő statisztikai erőt képviseljenek a domináns letalitási gyakoriság legalább megduplázódásához (44. pont).

20. Az egyes pároztatási időszakokban rendelkezésre álló nőstények számát szintén az általuk képviselt statisztikai erő alapján kell előre meghatározni úgy, hogy lehetővé tudják tenni a domináns letalitási gyakoriság legalább megduplázódásának észlelését (vagyis elegendő vemhes nőstény legyen legalább összesen 400 beágyazott embrió biztosításához) (20) (21) (22) (23), illetve hogy elemzési egységenként (vagyis adagolásonkénti párztatott csoportként) legalább egy elhalt, beágyazódott embrióra lehessen számítani (24).

Beadási időszak és pároztatási időszakok

21. A kezelés utáni pároztatási időszakok számát a kezelési ütemterv határozza meg, amelynek biztosítania kell, hogy a hím csírasejt érésének minden fázisát értékelni lehessen a domináns letális hatás előidézése szempontjából (12) (25). A legfeljebb napi öt dózis beadásával járó egyszeri kezelés esetén az utolsó kezelés időpontjától számítva 8 (egereknél) vagy 10 (patkányoknál) pároztatást kell végrehajtani az egyhetes időszakok alatt. Többszöri dózis beadásakor a pároztatási időszakok száma a beadási időszak növelésével arányosan csökkenthető, amennyiben értékelni lehet a spermaképződés valamennyi fázisát (például egy 28 napos expozíciós időszak után csupán 4 hetes pároztatás elegendő az egerek összes spermaképződési fázisának elemzéséhez). Minden kezelési és pároztatási ütemtervet tudományosan indokolni kell.

22. A nőstényeknek legalább egy ivari ciklus erejéig a hímekkel kell maradniuk (egy hét például mind az egereknél, mind a patkányoknál lefed egy ivari ciklust). Az egyhetes időköz alatt nem párosított nőstények felhasználhatók a következő pároztatási időszakban. Alternatív megoldásként a nőstények mindaddig a hímekkel tarthatók, amíg a párzásra sor nem került, ami a hüvelyben a sperma jelenlétéből, illetve a hüvelyi dugó megjelenéséből határozható meg.

23. Az expozíciós és pároztatási eljárás függ a domináns letalitási vizsgálat végső céljától. Amennyiben a cél annak meghatározása, hogy egy adott vegyi anyag önmagában okoz-e domináns letális mutációt, az elfogadott módszer alapján az expozíciónak ki kell terjednie a teljes spermaképződési ciklusra (ami egerek esetén heti 5–7 kezeléssel 7 hét), és egyszer kell pároztatni, a ciklus végén. Ha azonban a cél a domináns letalitás előidézésére érzékeny csírasejttípus meghatározása, ajánlatos inkább egyszeri vagy 5 napon át tartó expozíciót követően egyhetes időközökben pároztatni.

Dózisok

24. Ha előzetes range-finding studyvizsgálatra kerül sor amiatt, mert már nem állnak rendelkezésre megfelelő adatok a dózisok megválasztásának segítéséhez, azt ugyanazon laboratóriumban, ugyanazon fajok, törzsek, nemek és kezelési eljárások alkalmazásával kell végrehajtani, mint amelyeket a fő vizsgálatban fognak használni (26). A vizsgálatnak a maximális tolerálható dózis (MTD) meghatározására kell irányulnia, amely anélkül, hogy vizsgálatkorlátozó toxicitást mutatna, a vizsgálati időszak tartamához viszonyítva a legmagasabb tolerált dózis (például rendellenes viselkedést vagy reakciókat, enyhe testtömeg-csökkenést vagy vérképzőrendszert érintő citotoxicitást vált ki), de elhullást, illetve humánus eutanáziát igénylő, bizonyított fájdalmat, szenvedést vagy stresszt nem idéz elő (27).

25. Az MTD nem befolyásolhatja kedvezőtlenül a pároztatás sikerét sem (21).

26. A kis, nem mérgező dózisban specifikus biológiai aktivitást mutató vizsgálati vegyi anyagok (mint például a hormonok és a mitogének), valamint azok a vegyi anyagok, amelyek a toxikokinetikai tulajdonságok telítődését mutatják, kivételek lehetnek a dózismeghatározási követelmények alól, és eseti alapon kell őket értékelni.

27. Annak érdekében, hogy dózis–válasz adatokat lehessen szerezni, a teljes vizsgálatnak egy negatív kontroll-csoportot, valamint legalább három dózist kell tartalmaznia, ahol a dózisok közötti szorzótényező általában 2, de legfeljebb 4. Ha a vizsgálati vegyi anyag nem okoz toxicitást a dózistartomány-kereső vizsgálatban vagy meglévő adatok alapján, egyszeri adagolás esetén a legmagasabb dózisnak 2 000 mg/testtömegkilogrammnak kell lennie. Ha azonban a vizsgálati vegyi anyag toxicitást okoz, az MTD-nek a beadott legmagasabb dózisnak kell lennie, és a használt dózisoknak lehetőleg le kell fedniük a maximálistól az alacsony mértékű toxicitást okozó vagy toxicitást egyáltalán nem okozó dózisig terjedő tartományt. Ha a vizsgálati vegyi anyag nem okoz toxicitást, legalább 14 napig tartó beadási időszak esetén, a legmagasabb dózisnak 1 000 mg/testtömeg kg/napnak, 14 napnál rövidebb beadási időszak esetében pedig 2 000 mg/testtömeg kg/napnak kell lennie.

A dózisok beadása

28. Az emberi expozíció várható útját figyelembe kell venni a vizsgálat tervezése során. Ezért az egyéb expozíciós utak – például takarmány, ivóvíz, szubkután, intravénás, topikális, inhalációs, orális (gyomorszondával) vagy implantáció – is kiválaszthatók indokoltként. Az utat mindenesetre úgy kell kiválasztani, hogy biztosítsa a célszövet(ek) megfelelő expozícióját. A hasüregbe adott injekció általában nem ajánlott, mivel az nem tervezett emberi expozíciós út, és kizárólag tudományos indokolással alkalmazható. Ha a vizsgálati vegyi anyagot a takarmányba vagy ivóvízbe keverik, különösen egyszeri adagolás esetén ügyelni kell arra, hogy a táplálék és a víz fogyasztása és a pároztatás közötti idő elegendő legyen a hatások kimutathatóságához (31. pont). A gyomorszondán át vagy injekcióval egyszerre beadható maximális folyadékmennyiség a kísérleti állat méretétől függ. A térfogata rendszerint nem haladhatja meg az 1 ml/100 testtömeggramm mennyiséget, kivéve vizes oldatok esetén, amelyeknél legfeljebb 2 ml/100 testtömeggramm használható. Ennél nagyobb mennyiségek használatát (ha azt az állatjóléti tárgyú jogszabályok lehetővé teszik) meg kell indokolni. A koncentráció megfelelő beállításával kell minimalizálni a beadott térfogat variabilitását, és így kell biztosítani, hogy minden dózisnál azonos legyen a testtömegarányos térfogat.

Megfigyelések

29. A kísérleti állatok esetében általános klinikai megfigyeléseket kell tenni, és a klinikai tüneteket legalább naponta egyszer, lehetőleg minden nap ugyanazon időpont(ok)ban rögzíteni kell, továbbá figyelembe kell venni az adagolást követően várható hatások érvényesülésének csúcsidőszakát. Az adagolási időszakban naponta legalább kétszer meg kell vizsgálni az összes állatot morbiditás és mortalitás szempontjából. Minden állat tömegét le kell mérni a vizsgálat megkezdésekor, az ismételt dózisú vizsgálatok esetén hetente legalább egyszer, valamint az állatok végleges elaltatásakor. A felvett táplálék mennyiségét heti rendszerességgel le kell mérni. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag beadására az ivóvízzel együtt kerül sor, a vízfogyasztást minden vízcsere alkalmával és legalább hetente le kell mérni. A túlzott toxicitás nem halálos jeleit mutató állatokat a vizsgálati időszak befejezése előtt végleg el kell altatni (27).

A szövetek gyűjtése és feldolgozása

30. A nőstényeket a vemhesség második felében altatják el véglegesen, az egereket a vemhesség 13. napján, a patkányokat pedig a vemhesség 14–15. napján. Megvizsgálják, hogy tapasztalhatók-e méhükben domináns letális hatások, ehhez meghatározzák a beágyazódások, az élő és elhalt embriók, valamint a sárgatestek számát.

31. A méhszarvakat és a petefészkeket átvizsgálják, hogy megszámlálják a sárgatesteket, valamint eltávolítsák és megszámolják a magzatokat és megmérjék tömegüket. Ügyelni kell arra, hogy a méhen belül feltárják az élő magzatok által takart elhalásokat és meghatározzák számukat. A magzati mortalitást fel kell jegyezni. Rögzíteni kell emellett a sikeresen megtermékenyített nőstények számát, továbbá az összes beágyazódás, beágyazódás előtti veszteség és beágyazódás utáni mortalitás számát (a korai és kései felszívódásokkal egyetemben). A látható magzatok ezenfelül legalább két hétig tartósíthatók Bouin-féle rögzítőszerben, hogy meg lehessen vizsgálni a jelentősebb külső fejlődési rendellenességeket (28), ami kiegészítő adatokat szolgáltathat a vizsgálati anyag reprodukciót és fejlődést érintő hatásairól.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Az eredmények feldolgozása

32. Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, bemutatva a pároztatott hímek számát, a vemhes nőstények számát, valamint a nem vemhes nőstények számát. Minden párzás eredményét egyedileg kell jelenteni, egyenként azonosítva a hímet és a nőstényt. A kezelt hímek esetében fel kell jegyezni a pároztatási időszakot és a dózist, és minden nőstény esetében fel kell jegyezni a beágyazódott élő és elhalt embriók számát.

33. A beágyazódás utáni veszteség kiszámításához meg kell határozni az elhalt és az összes beágyazódott embrió arányát a kezelt csoportban, majd össze kell vetni azt a vivőanyagos/oldószeres kontrollcsoport hasonló adatával.

34. A beágyazódás előtti veszteség a sárgatestek számának és a beágyazódások számának különbségéből vagy az egy nőstényre jutó átlagos beágyazódások számának a kontrollpároztatásokhoz viszonyított fogyatkozásából számítható ki. Ha vizsgálták a beágyazódás előtti veszteséget, azt is jelenteni kell.

35. A domináns letális tényező a következőképpen becsülhető meg: (beágyazódás utáni elhalálozások/összes beágyazódás nőstényenként) × 100.

36. A toxicitásra és a klinikai tünetekre vonatkozó adatokat (a 29. pont alapján) jelenteni kell.

Elfogadhatósági kritériumok

37. Az alábbi kritériumok határozzák meg a vizsgálat elfogadhatóságát:

— A párhuzamos negatív kontroll adatai összhangban vannak a negatív történeti kontrolladatokra vonatkozólag közzétett normákkal és – amennyiben rendelkezésre állnak – a laboratórium történeti kontrolladataival (lásd a 10. és a 18. pontot).

— A párhuzamos pozitív kontrollok olyan válaszreakciókat generálnak, amelyek összhangban vannak a pozitív történeti kontrolladatokra vonatkozólag közzétett normákkal és – amennyiben rendelkezésre állnak – a laboratórium pozitív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisával, továbbá a negatív kontrollhoz viszonyítva statisztikailag szignifikáns növekedést idéznek elő (lásd a 17. és a 18. pontot).

— Megfelelő számú beágyazódás és dózis képezte elemzés tárgyát (20. pont).

— A legmagasabb dózis kiválasztására vonatkozó kritériumok összhangban vannak a 24. és 27. pontban ismertetett kritériumoknak.

Az eredmények értékelése és értelmezése

38. Legalább három kezelt dóziscsoportot kell megvizsgálni annak érdekében, hogy elegendő adat álljon rendelkezésre a dózis–válasz elemzéshez.

39. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen pozitívnak minősül, ha:

— legalább az egyik vizsgálati dózis statisztikailag szignifikáns növekedést mutat a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva;

— a növekedés dózisfüggő legalább egy kísérleti körülménynél (például hetes pároztatási időszak) megfelelő vizsgálattal történő értékelés alapján; valamint

— ezen eredmények bármelyike kívül esik a negatív kontrolladatok elfogadható tartományán vagy a laboratórium negatív történeti kontrolladatainak eloszlásán (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértéken).

Ezt követően úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag képes domináns letális mutációkat előidézni a kísérleti állatok csírasejtjeiben. A legmegfelelőbb statisztikai módszerekre vonatkozó ajánlások leírását a 44. pont tartalmazza; a szakirodalomban további ajánlott statisztikai megközelítések találhatók (20) (21) (22) (24) (29). Az alkalmazott statisztikai teszteknek az állatot kell kísérleti egységnek tekinteniük.

40. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen negatívnak minősül, ha:

— a vizsgálati dózisok egyike sem mutat statisztikailag szignifikáns növekedést a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva;

— egyik kísérleti körülmény sem mutat a dózissal összefüggő növekedést; valamint

— valamennyi eredmény a negatív kontrolladatok, vagy amennyiben rendelkezésre állnak, a laboratórium negatív történeti kontrolladatainak (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértéken) tartományába esik.

Ezt követően úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag nem képes domináns letális mutációkat előidézni a kísérleti állatok csírasejtjeiben.

41. Az egyértelműen pozitív vagy egyértelműen negatív válasz igazolása nem követelmény.

42. Ha a válasz nem egyértelműen negatív és nem is egyértelműen pozitív, illetve egy adott eredmény (például kismértékű vagy határesethez közelítő növekedés) biológiai relevanciája megállapításának segítése érdekében az adatokat szakértői véleménnyel és/vagy a meglévő kísérleti adatok további vizsgálataival kell értékelni, például meg kell határozni, hogy a pozitív eredmény kívül esik-e a negatív kontrolladatok elfogadható tartományán vagy a laboratórium történeti negatív kontrolladatain (30).

43. Ritka esetekben, az adatkészlet még további vizsgálatok után is eleve kizárja a pozitív vagy negatív eredményekre vonatkozó következtetést, ezért kétértelmű reakció lesz a következtetés.

44. Az alkalmazott statisztikai teszteknek a hím állatot kell kísérleti egységnek tekinteniük. Bár előfordulhat, hogy a számadatok (pl. az egy nőstényre jutó beágyazódások száma) a Poisson-féle eloszlás és/vagy az arányszámok (pl. az elhalt beágyazódott embriók aránya) a binominális eloszlás szerint alakul, az ilyen adatok gyakori jellemzője a túlszóródás (31). Ennek megfelelően a statisztikai elemzésnek először a túl- és alulszóródás mértékét kell tesztelnie, például a Cochran-féle binomiális variancia próbával (32) vagy a Tarone-féle, binominális túlszóródást vizsgáló C(α)-próbával (31) (33). Amennyiben nem mutatható ki eltérés a binomiális eloszlástól, az egyes dózisok egymáshoz való viszonyára vonatkozó trendek vizsgálhatók Cochran-Armitage-féle trendpróbával (34), a kontrollcsoporttal való páronkénti összehasonlításhoz pedig a Fisher-egzakt teszt használható (35). Hasonlóképpen, ha nem tapasztalható eltérés a Poisson-eloszlástól, a számok alakulásának trendjei vizsgálhatók Poisson-regresszióval (36), a kontrollcsoporttal történő páronkénti összevetéshez pedig alkalmazható a Poisson-modell páronkénti kontrasztanalízise (36). Ha az eloszlás szignifikánsan túl- vagy alulbecsült, a nem paraméteres módszerek használata ajánlott (23) (31). Ilyenek a rangsor alapú próbák, például a Jonckheere–Terpstra-féle trendpróba (37) és a vivőanyagos/oldószeres kontrollcsoporttal való páronkénti összehasonlítással végzett Mann–Whitney-féle próbák (38), továbbá a tendencia feltárására és a kontrollcsoporttal történő páronkénti összehasonlításra szolgáló permutációs, újra-mintavételezési és bootstrap-eljárások (31) (39).

45. A pozitív domináns letális vizsgálat bizonyítékát szolgáltatja annak, hogy a vizsgálati vegyi anyag genotoxicitást idéz elő a vizsgálathoz használt faj kezelt hímjének csírasejtjeiben.

46. A válaszreakció biológiai jelentőségének értékelésekor támpontot adhat annak mérlegelése, hogy a megfigyelt értékek a kontrollokkal kapott régebbi eredmények tartományába esnek-e (40).

Vizsgálati jelentés

47. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Összegzés.

Vizsgálati vegyi anyag:

— eredet, gyártási szám, felhasználási határidő, ha rendelkezésre áll;

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, ha ismert;

— a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben, ha ismert;

— adott esetben a pH-érték, az ozmolalitás és a kicsapódás mérése abban a tápfolyadékban, amelyhez a vizsgálati vegyi anyagot hozzáadták.

Egy összetevőből álló anyag:

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai révén jellemezve.

A vizsgálati vegyi anyag előkészítése:

— a vivőanyag megválasztásának indokolása;

— a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert;

— a takarmány-, ivóvíz- vagy inhalációs készítmények előkészítése;

— a készítmények analitikai meghatározásai (pl. stabilitás, homogenitás, névleges koncentráció), ha végeztek ilyen meghatározásokat.

Kísérleti állatok:

— a felhasznált faj/törzs és megválasztásuk indokolása;

— az állatok száma, kora és neme;

— az állatok származása, tartási körülmények, takarmány stb.;

— az állatok egyedi azonosítására szolgáló módszerek;

— rövid távú vizsgálatok esetében: az egyes hím állatok testtömege a vizsgálat kezdetekor és végén, egy hétnél hosszabb vizsgálatok esetében: az egyes állatok testtömege a vizsgálat során és a táplálékfelvételük. A testtömegtartományt, az átlagot és a szórást minden egyes csoportnál meg kell adni.

Vizsgálati körülmények:

— a pozitív és negatív (vivőanyagos/oldószeres) kontrollok adatai;

— a dózistartomány-kereső vizsgálat adatai;

— a dózisok kiválasztásának indokolása;

— a vizsgálati vegyi anyag előkészítésének részletes ismertetése;

— a vizsgálati vegyi anyag beadására vonatkozó részletek;

— a beadási mód indokolása;

— az állati toxicitás mérésére szolgáló módszerek, beleértve adott esetben a kórszövettani vagy hematológiai elemzéseket, illetve az állatok megfigyelésének és a testtömeg mérésének gyakorisága;

— negatív eredmény esetén annak ellenőrzésére szolgáló módszerek, hogy a vizsgálati vegyi anyag elérte-e a célszövetet vagy az általános keringési rendszert;

— tényleges dózis (mg/testtömeg kg/nap) a vizsgálati vegyi anyagnak a takarmányban/ivóvízben meglévő koncentrációjából (ppm) és a fogyasztásból számítva, ha alkalmazható;

— a táplálék és víz minőségére vonatkozó részletek;

— a ketrecek környezetgazdagítására vonatkozó részletek;

— a kezelési és mintavételi ütemtervek részletes leírása és kiválasztásuk indokolása;

— a fájdalomcsillapítás módja;

— az eutanázia módja;

— a szövetek izolálására és tartósítására használt eljárások;

— valamennyi készlet és reagens beszerzési forrása és gyártási száma (ha elérhető);

— a domináns letális hatások számolására szolgáló módszerek;

— a pároztatási ütemterv;

— a párzás igazolására használt módszer;

— az eutanázia időpontja;

— a domináns letális hatások értékelésének kritériumai, többek között a sárgatestek, beágyazódások, felszívódások és beágyazódás előtti veszteségek, élő és elhalt beágyazódott embriók száma.

Eredmények:

— az állatok állapota a vizsgálati időszak előtt és alatt, beleértve a toxicitás jeleit;

— a hím egyedek testtömege a kezelési és pároztatási időszakok alatt;

— a pároztatott nőstények száma;

— a dózis-válasz összefüggés, ahol lehetséges;

— a párhuzamos és negatív történeti kontrolladatok tartományokkal, átlagértékekkel és szórásokkal;

— az egyidejűleg elvégzett pozitív kontrollokra vonatkozó adatok;

— az egyes anyaállatok táblázatba foglalt adatai: az egy anyaállatra jutó sárgatestek száma; az egy anyaállatra jutó beágyazódások száma; az egy anyaállatra jutó felszívódások és beágyazódás előtti veszteségek száma; az egy anyaállatra jutó élő beágyazódott embriók száma; az egy anyaállatra jutó elhalt beágyazódott embriók száma; a magzatok testtömege;

— a fenti adatok pároztatási időszakonkénti és dózisonkénti összefoglalása, a domináns letalitás gyakoriságával;

— statisztikai elemzések és alkalmazott módszerek.

Az eredmények értékelése.

Következtetés.

SZAKIRODALOM

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Párizs.

(2) Bateman, A.J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures B.J. Kilbey *et. al.*(Eds.) 235-334, Elsevier, Amsterdam

(3) Ehling U.H., Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., and Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Set up by the Work Group „Dominant" lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, Arch. *Toxicol.,* 39, 173-185

(4) Shelby M.D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. Mutation Res,. 352, 159-167.

(5) Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. and Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. Mutation Res., 48:267-270.

(6) Anderson D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. and Brinkworth, M.H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. Mutation Res., 397:77-74.

(7) Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. and Tarka, S.M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol.* Lett. 20, 325-329.

(8) Rao K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. and Miller, R.R. (1983). Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. Fundam. Appl. *Toxicol.,* 3:80-85.

(9) Brewen J.G., Payne, H.S., Jones, K.P., and Preston, R.J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, Mutation Res., 33, 239-249.

(10) Marchetti F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. and Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. Biol. Reprod., 70:616-624.

(11) Marchetti F. and Wyrobek, A.J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. Birth Defects Res., C 75:112-129.

(12) Adler I.D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. Mutation Res., 352:169-172.

(13) Favor J., and Crenshaw J.W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, Mutation Res., 53: 21-27.

(14) Generoso W.M., Witt, K.L., Cain, K.T., Hughes, L. Cacheiro, N.L.A, Lockhart, A.M.C. and Shelby, M.D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. Mutation Res., 345:167-180.

(15) Hastings S.E., Huffman K.W. and Gallo M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, Mutation Res., 40:371-378.

(16) James D.A. and Smith D.M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, Mutation Res., 99:303-314.

(17) Shelby M.D., Cain, K.T., Hughes, L.A., Braden, P.W. and Generoso, W.M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. Mutation Res., 173:35-40.

(18) Sudman P.D., Rutledge, J.C., Bishop, J.B. and Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, Mutation Res., 296: 143-156.

(19) Holstrom L.M., Palmer A.K. and Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In Supplementary Mutagenicity Tests. Kirkland D.J. and Fox M. (Eds.), Cambridge University Press, 129-156.

(20) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417:19–30.

(21) Adler I.D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312:313-318.

(22) Generoso W.M. and Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. Methods, *Toxicol.*, 3A:124-141.

(23) Haseman J.K. and Soares E.R. (1976).The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. Mutation. Res., 41: 277-288.

(24) Whorton E.B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, Teratogen. Carcinogen. *Mutagen.*, 1:353 – 360.

(25) Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S., and Purchase, I.F.H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. Mutation. Res., 85:417-429.

(26) Fielder R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In vivo* Mutagenicity Assays. Mutagen., 7:313-319.

(27) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.19.), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(28) Barrow M.V., Taylor W.J and Morphol J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291–306.

(29) Kirkland D.J., (Ed.)(1989). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Cambridge University Press.

(30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper P., Lovell D., Martus H.-J. and Thybaud V. (2011). „Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data", Mutation. Res., 723:87-90.

(31) Lockhart A.C., Piegorsch W.W. and Bishop J.B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. Mutation. Res., 272:35-58.

(32) Cochran W.G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests. Biometrics, 10: 417-451.

(33) Tarone R.E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: 585-590.

(34) Margolin B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. In *Encyclopedia of* Statistical Sciences, Volume 9, Kotz S. and Johnson N. L. (Eds.), 334-336. John Wiley and Sons, New York.

(35) Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London (1970).

(36) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. and Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, Chapters 14 and 17. McGraw-Hill, Boston

(37) Jonckheere R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika,* 41:133-145.

(38) Conover W.J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, New York

(39) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.

(40) Fleiss J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Sárgatest (corpus luteum): hormontermelő képződmény, amely a petefészekben alakul ki a petét kilökő tüsző helyén. A petefészkekben jelen lévő sárgatestek száma megegyezik a peteérés során keletkezett peték számával.

Domináns letális mutáció: a csírasejtben vagy a megtermékenyítést követően létrejövő mutáció, amely az embrió vagy a magzat elhalását okozza.

Termékenységi mutató: a pároztatott vemhes nőstények száma a pároztatott nőstények számához képest.

Pároztatási időszak: a kezelés vége és a kezelt hímek pároztatása között eltelő idő. Az időköz szabályozása révén felmérhetők a különböző csírasejttípusokra gyakorolt kémiai hatások. Az expozíció végét követő 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. és 8. hét során zajló egér pároztatásoknál mérhetők a spermiumot, kondenzált spermatidokat, kerek spermatidokat, pachitén spermatocitákat, korai spermatocitákat, differenciálódott spermatogóniumokat, differenciálódó spermatogóniumokat és csírasejt spermatogóniumokat ért hatások.

Beágyazódás előtti veszteség: a beágyazódások száma és a sárgatestek száma között különbség. Megbecsülhető a kezelt és a kontrollcsoportba beosztott nőstények összes beágyazódásainak összevetése alapján is.

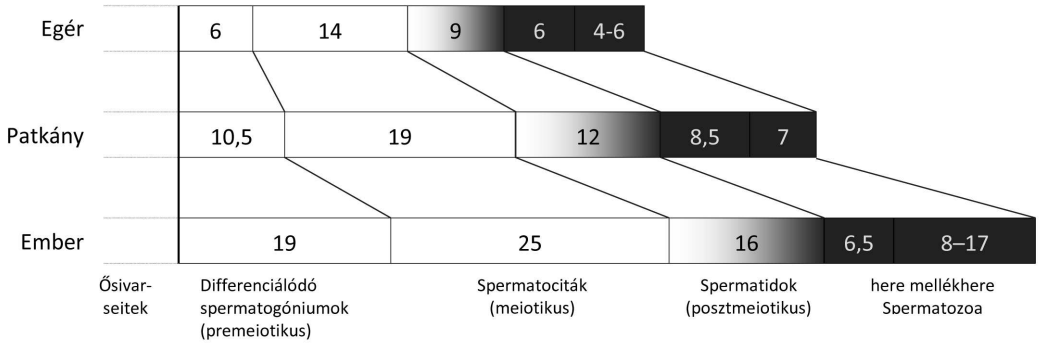
Beágyazódás utáni veszteség: a kezelt csoport elhalt beágyazódásainak aránya összehasonlítva a kontrollcsoport összes beágyazódáshoz viszonyított elhalt beágyazódásaival.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

UVCB: ismeretlen vagy változó összetételű vegyi anyagok, komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok.

2. függelék

A SPERMATOGENEZIS IDEJE EMLŐSÖKNÉL



1. ábra: A hím csírasejt (napokban megadott) fejlődési idejének összevetése egér, patkány és ember között. Az árnyékolással jelzett időszakokban nem zajlik DNS-javítás.

A fentiekben látható az egérben, patkányban és emberben lezajló spermatogenezis sematikus ábrája (forrás: Adler, 1996). A nem differenciálódott spermatogóniumok közé tartoznak: A-szimpla; A-párosított; és A-összekapcsolt spermatogóniumok (Hess and de Franca, 2008). Az A-szimpla spermatogóniumokat tekintik a valódi ősivarsejteknek; ezért az ősivarsejtekre gyakorolt hatások felmérése érdekében (egereknél) legalább 49 napnak kell eltelnie a vizsgálati vegyi anyag utolsó beadása és a pároztatás között.

Hivatkozások

Adler, ID (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between rodents and humans. Mutat Res, 352:169-172.

Hess, RA, De Franca LR (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, C. Yan Cheng (Ed), Landes Biosciences and Springer Science & Business Media:1-15.”

4. A B. részben a B.23. fejezet helyébe a következő szöveg lép:

„B.23 **SPERMATOGONIÁLIS KROMOSZÓMARENDELLENESSÉG VIZSGÁLATA EMLŐSÖKÖN**

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 483. vizsgálati iránymutatásával (2016). A vizsgálati módszereket a tudományos fejlődés, a változó szabályozási igények és az állatok kíméletére irányuló megfontolások figyelembevételével rendszeresen felülvizsgálják. A vizsgálati módszer átdolgozott változata tükrözi a vizsgálat hosszú éveken keresztüli alkalmazása során szerzett tapasztalatokat, valamint felveti annak lehetőségét, hogy ezt a vizsgálatot beépítsék más toxicitási vagy genotoxicitási vizsgálatokba, vagy azokkal együtt alkalmazzák. A toxicitási vizsgálatok kombinálása lehetővé teheti a toxicitási vizsgálatokban használt állatok számának csökkentését. E vizsgálati módszer a genetikai toxikológiai vizsgálati módszerek sorozatának részét képezi. Az OECD kidolgozott egy, a genetikai toxikológiai vizsgálatokról tömör tájékoztatást nyújtó, az OECD genetikai toxikológiára vonatkozó vizsgálati iránymutatásainak közelmúltbeli változásait áttekintő dokumentumot (1).

2. A spermatogonális kromoszómarendellenesség emlősökön történő *in vivo* vizsgálatának célja azon vegyi anyagok azonosítása, amelyek strukturális kromoszóma-rendellenességeket okoznak emlősök spermatogoniális sejtjeiben (2), (3), (4). Ez a vizsgálat ezenfelül a genotoxicitás értékelése szempontjából is releváns, mert az *in vivo* metabolizmus, a farmakokinetikai és a DNS-hibajavító eljárások tényezői – jóllehet fajonként eltérnek – aktívak és hozzájárulnak a reakciókhoz. Ezt a vizsgálati módszert nem a számszerű rendellenességek mérésére tervezték; és nem is használják rutinszerűen erre a célra.

3. E vizsgálat kimutatja (mind a kromoszóma, mind a kromatid típusú) szerkezeti kromoszóma-rendellenességeket az osztódó spermatogonális ivarsejtekben, ezért várhatóan előre jelezheti az ivarsejtek öröklődő mutációit.

4. A kulcsfontosságú fogalmak meghatározásai a függelékben találhatók.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK

5. E vizsgálatban rendszerint rágcsálók használatosak, de egyes esetekben – amennyiben tudományosan indokolt – más fajok is megfelelőek lehetnek. A rágcsálók heréiből standard citogenetikai módszerekkel előállított készítmények mitotikus (spermiogoniális) és meiotikus (spermatocita) metafázist idéznek elő. A mitotikus és a meiotikus metafázis a kromoszómák morfológiája alapján határozható meg (4). Ez az *in vivo* citogenetikus vizsgálat észleli a szerkezeti kromoszóma-rendellenességeket a spermatogonális mitózisokban. Más célsejtek nem képezik tárgyát e vizsgálati módszernek.

6. A spermatogóniumokban a kromatid típusú rendellenességek észleléséhez a kezelést követő első mitotikus sejtosztódást kell megvizsgálni, még mielőtt ezek a rendellenességek a következő sejtosztódások során kromoszóma típusú rendellenességekké alakulnának. A kezelt spermatocitákról további információk szerezhetők a diakinézis-metafázis I-ben és metafázis II-ben jelentkező szerkezeti kromoszóma-rendellenességek meiotikus kromoszómaelemzésével.

7. A herékben a spermatogóniumok számos generációja van jelen (5), és ezek a különböző ivarsejttípusok a kémiai kezeléssel szembeni érzékenység egész spektrumát átfoghatják. Így tehát az észlelt rendellenességek a kezelt spermatogónium-populációk halmozott válaszát jelentik. A herékből előállított készítményekben fellelhető mitotikus sejtek többsége B spermatogónium, amelyek megközelítőleg 26 órás sejtciklussal rendelkeznek (3).

8. Ha létezik arra vonatkozó bizonyíték, hogy a vizsgálati vegyi anyag vagy annak metabolitja(i) nem éri(k) el a herét, ez a vizsgálat nem megfelelő.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

9. Általában az állatokat megfelelő expozíciós úton kezelik a vizsgálati vegyi anyaggal, majd a kezelés után megfelelő időpontban eutanáziát hajtanak végre rajtuk. Az eutanázia előtt az állatokat metafázis-blokkoló szerrel (például kolchicinnel vagy Colcemid®-del) kezelik. Ezután kromoszómapreparátumot hoznak létre az ivarsejtekből és megfestik azokat, majd a metafázisban lévő sejtek elemzésével megállapítják a kromoszómaaberrációkat.

A LABORATÓRIUM JÁRTASSÁGÁNAK IGAZOLÁSA

10. A vizsgálatban való jártasság igazolása érdekében a laboratóriumoknak bizonyítottan képesnek kell lenniük reprodukálni a spermatogónium szerkezeti kromoszóma-rendellenességeinek gyakoriságára vonatkozó várható eredményeket pozitív kontrollként szolgáló – például az 1. táblázatban felsorolt – anyagokkal (ideértve a gyenge reakciókat is), valamint a negatív kontrollokból származó adatoknak olyan gyakoriságot kell mutatniuk, amely összhangban áll a szakirodalomban (pl. (2) (3) (6) (7) (8) (9) (10)) közzétett elfogadható adattartománnyal vagy a laboratóriumi kontrollok történeti szórásával, ha vannak történeti adatok.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Előkészületek

Az állatfaj kiválasztása

11. Egészséges, fiatal, ivarérett, általánosan használt laboratóriumi állattörzsekből származó állatokat kell alkalmazni. Rendszerint hím egereket használnak; ugyanakkor más megfelelő emlős fajok hímjei is alkalmazhatók, amennyiben az tudományosan indokolt, és lehetővé teszi a vizsgálatnak egy eltérő vizsgálati módszerrel való együttes alkalmazását. Rágcsálóktól eltérő fajok használatának tudományos indokolását közölni kell a jelentésben.

Az állatok tartásának és etetésének körülményei

12. Rágcsálók esetében a kísérleti állatok tartására szolgáló helyiség hőmérsékletének 22°C-nak (±3°C) kell lennie. Bár ideális esetben a helyiség relatív páratartalmának 50–60 %-nak kell lennie, legyen legalább 40 %, és a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltakozásával. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmány megválasztását a vizsgálati vegyi anyaggal való megfelelő keveredés szükségessége is befolyásolhatja, ha a vizsgálati vegyi anyag beadása ilyen módon történik. Ha agresszív viselkedés nem várható, a rágcsálókat kis csoportokban, lehetőleg szilárd aljú, megfelelő környezetgazdagítással ellátott ketrecekben kell tartani (ketrecenként legfeljebb öt egyed tartható). Ha tudományos szempontból indokolt, az állatok egyedileg is elhelyezhetők.

Az állatok előkészítése

13. A rendszerint egészséges, fiatal, felnőtt (a kezelés kezdetén 8–12 hetes) állatokat használnak, és véletlenszerűen osztják be a kontroll- és a kezelt csoportokba. Az egyes állatokat humánus, minimálisan invazív módszerrel (például gyűrűzéssel, címkézéssel, mikrocsip beültetésével vagy biometrikus azonosítással, de a fül vagy a lábujj kilyukasztása nélkül) egyedi azonosítóval kell ellátni, és legalább öt napig szoktatni kell a laboratóriumi körülményekhez. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisak legyenek a ketrec elhelyezéséből adódó esetleges hatások. A pozitív kontrollal és a vizsgálati vegyi anyaggal való keresztszennyeződés kerülendő. A vizsgálat kezdetén az egyes állatok tömege közötti eltérésnek minimálisnak kell lennie és nem haladhatja meg a ±20 %-ot.

A dózisok előkészítése

14. Az állatoknak történő adagolás előtt a szilárd halmazállapotú vizsgálati vegyi anyagokat fel kell oldani vagy szuszpendálni kell megfelelő oldószerben vagy vivőanyagban, vagy bele kell keverni a takarmányba vagy az ivóvízbe. A folyékony vizsgálati vegyi anyagok közvetlenül adagolhatók vagy az adagolás előtt hígíthatók. Belélegzéses expozíció esetén a vizsgálati vegyi anyagok fizikai-kémiai tulajdonságaiktól függően gáz, gőz vagy szilárd/folyadék aeroszol formában adagolhatók. A vizsgálati vegyi anyagból mindig friss készítményeket kell alkalmazni, kivéve akkor, ha a stabilitási adatok bizonyítják a tárolás elfogadhatóságát és meghatározzák a megfelelő tárolási feltételeket.

Vizsgálati körülmények – oldószer/vivőanyag

15. Az oldószer/vivőanyag nem okozhat toxikus hatásokat az alkalmazott dózisok mellett, és nem alkalmazható olyan oldószer/vivőanyag, amely képes kémiai reakcióba lépni a vizsgálati vegyi anyagokkal. Jól ismert oldószerektől eltérő oldószerek/vivőanyagok alkalmazása esetén azok használatát alá kell támasztani a kompatibilitásukat jelző referenciaadatokkal. Amennyiben lehetséges, először valamilyen vizes oldószer/vivőanyag használatát kell megfontolni. Általánosan használt, kompatibilis oldószer/vivőanyag például többek között a víz, a fiziológiás sóoldat, a metil-cellulóz-oldat, a karboximetil-cellulóz-nátriumsó-oldat, az olívaolaj és a kukoricaolaj. Ha nem állnak rendelkezésre olyan történeti vagy publikált kontrolladatok, amelyek igazolják, hogy a választott atipikus oldószer/vivőanyag nem idéz elő szerkezeti kromoszóma-rendellenességet vagy más káros hatást, az oldószeres/vivőanyagos kontroll elfogadhatóságának megállapítása érdekében előzetes vizsgálatot kell végezni.

Pozitív kontrollok

16. Egyidejűleg alkalmazott pozitív kontrollállatokat mindig kell alkalmazni, kivéve ha a laboratórium igazolta a vizsgálat lebonyolításában szerzett jártasságát, és a közelmúltban (például az elmúlt 5 évben) rutinszerűen használta a vizsgálatot. Párhuzamos pozitív kontrollcsoport hiányában minden egyes kísérletben értékelési kontrollokat (fixált és megfestetlen tárgylemezeket) kell alkalmazni. Ezek oly módon kaphatók meg, hogy a vizsgálat értékelésébe beszámítják a vizsgálat lebonyolítása szerinti laboratóriumban rendszeres időközönként (például 6–18 hónaponként) – például a jártasság vizsgálata során, vagy szükség esetén azt követően rendszeresen – pozitív kontrollokkal végzett különálló kísérlettel létrejött és tárolt megfelelő referenciamintákat.

17. A pozitív kontrollként szolgáló anyagoknak megbízható módon ki kell váltaniuk a szerkezeti kromoszóma-rendellenességekkel rendelkező sejtek spontán szinthez képest kimutathatóan gyakoribbá válását. A pozitív kontrollok dózisát úgy kell megválasztani, hogy a hatások egyértelműek legyenek, de az értékelő ne tudja beazonosítani azonnal a kódolt mintákat. A pozitív kontrollként szolgáló anyagokra az 1. táblázat tartalmaz példákat.

1. táblázat

Példák pozitív kontrollként szolgáló anyagokra

Anyag [CAS-szám] (referenciaszám)
Ciklofoszfamid (monohidrát) [CAS-szám: 50-18-0 (CAS-szám 6055-19-2)] (9)
Ciklohexil-amin [CAS-szám: 108-91-8] (7)
Mitomicin C [CAS-szám: 50-07-7] (6)
Akrilamid monomer (CAS-szám: 79-06-1] (10)
Trietilén-melamin [CAS-szám: 51-18-3] (8)

Negatív kontrollok

18. Minden mintavételi időpontban negatív kontrollállatokat is kell használni, amelyeket csak oldószerrel vagy vivőanyaggal kezeltek, és a kezelésük egyébiránt ugyanolyan módon történik, mint a kezelési csoportoké. Ha nem állnak rendelkezésre olyan történeti vagy publikált kontrolladatok, amelyek igazolják, hogy a választott oldószer/vivőanyag nem idéz elő kromoszóma-rendellenességeket vagy más káros hatásokat, a vivőanyagos kontroll elfogadhatóságának megállapítása érdekében nem kezelt kontrollállatokat is alkalmazni kell minden mintavételi időpontban.

ELJÁRÁS

Az állatok száma

19. A vizsgálat megkezdésekor a csoportok méretét úgy kell megállapítani, hogy egy csoportban legalább öt hím állat legyen. Ez a csoportonkénti állatszám elegendőnek tekinthető ahhoz, hogy megfelelő mértékű statisztikai kiértékelést lehessen végezni (vagyis általában észlelni lehessen a kromoszóma-rendellenesség gyakoriságának legalább megduplázódását, amikor a negatív kontrollszint 0,05-ös szignifikanciaszint melletti 80 %-os valószínűségnél legalább 1,0 %) (3) (11). Útmutatás az állatok maximális számára vonatkozó tipikus követelményhez: a három dóziscsoporttal és egy párhuzamos negatív kontrollcsoporttal, továbbá egy pozitív kontrollcsoporttal (amelyek mindegyike csoportonként öt állatból áll) két mintavételi időpontban végzett vizsgálathoz 45 állatra lenne szükség.

A kezelés ütemterve

20. A vizsgálati vegyi anyagot rendszerint egyetlen adagban adják be (egyszeri kezelés keretében); alkalmazható más adagolási rend is, amennyiben használata tudományos szempontból indokolt.

21. A legnagyobb adaggal kezelt csoportnál a kezelés után két különböző időpontban mintát kell venni. Mivel a vizsgálati vegyi anyag(ok) felvételéhez és anyagcseréjéhez szükséges idő, valamint annak (azoknak) a sejtciklus-kinetikára gyakorolt hatása befolyásolhatja a kromoszóma-rendellenesség kimutatásának optimális időpontját, egy korai és egy későbbi mintavételt végeznek a kezelést követően körülbelül 24 és 48 órával. A legmagasabb dózisoktól eltérő dózisok esetén korai időpontban, a kezelés után 24 órával kell mintát venni (ami megegyezik a B spermatogóniumok sejtciklusának idejével vagy annál rövidebb, így nagyobb valószínűséggel értékelhetők a kezelés utáni első metafázisok), kivéve ha más időpontról bebizonyosodott, hogy az megfelelőbb.

22. Más mintavételi idők is alkalmazhatók. Olyan vegyi anyagok esetében például, amelyek S fázistól független hatásokat fejtenek ki, megfelelőbbnek bizonyulhatnak a 24 óránál rövidebb mintavételi idők is.

23. Ismételt dózisú kezelési eljárás is használható, például ha a vizsgálat elvégzésére egy másik végpontot érintő, 28 napig tartó beadási időszakot alkalmazó vizsgálattal (pl. a B.58. vizsgálati módszerrel) összefüggésben kerül sor; ez esetben azonban a mintavételi időszakok különbözősége miatt további állatcsoportok bevonására lenne szükség. Ennek megfelelően az ilyen ütemtervek megfelelőségét eseti alapon kell tudományos érvekkel alátámasztani.

24. Az eutanázia előtt az állatok hasüregébe adott injekcióval megfelelő adag metafázist blokkoló vegyi anyagot (például Colcemid®-et vagy kolchicint) fecskendeznek be. Ezután az állatokból megfelelő időközönként mintákat kell venni. Egerek és patkányok esetében ez az időköz körülbelül 3–5 óra.

Dózisok

25. Ha előzetes dózistartomány-kereső vizsgálatra kerül sor amiatt, hogy nem állnak rendelkezésre megfelelő adatok a dózisok kiválasztásának segítéséhez, azt ugyanazon laboratóriumban, ugyanazon fajok, törzsek és kezelési eljárások alkalmazásával kell végrehajtani, mint amelyek a fő vizsgálatban alkalmazandóak, a dóziskereső vizsgálat végrehajtására vonatkozó ajánlások szerint (12). E vizsgálatnak a maximális tolerálható dózis (MTD) meghatározására kell irányulnia, amely a vizsgálati időszak hosszához képest enyhe toxikus hatásokat kiváltó dózis (például rendellenes viselkedést vagy reakciókat, enyhe testtömeg-csökkenést vagy vérképzőrendszert érintő citotoxicitást vált ki), de amely elhullást, illetve az állatok végleges elaltatását szükségessé tévő, bizonyított fájdalmat, szenvedést vagy stresszt nem idéz elő.

26. A legmagasabb adag olyan adagként is definiálható, amely létrehoz valamilyen toxicitási jelet a spermatogóniumokban (például az első és második meiotikus metafázis esetében a spermatogonális mitózis arányának csökkenése). E csökkenés nem haladhatja meg az 50 %-ot.

27. A kis, nem mérgező dózisban specifikus biológiai aktivitást mutató vizsgálati vegyi anyagok (mint például a hormonok és a mitogének), valamint azok a vegyi anyagok, amelyek a toxikokinetikai tulajdonságok telítődését mutatják, kivételek lehetnek a dózismeghatározási követelmények alól, és eseti alapon kell azokat értékelni.

28. Annak érdekében, hogy dózis-válasz adatokat lehessen szerezni, a teljes vizsgálatnak egy negatív kontrollcsoportot (18. pont), valamint legalább három dózist kell tartalmaznia, ahol a dózisok közötti szorzótényező általában 2, de legfeljebb 4. Ha a vizsgálati vegyi anyag nem okoz toxicitást a dózistartomány-kereső vizsgálatban vagy meglévő adatok alapján, egyszeri adagolás esetén a legmagasabb dózisnak 2 000 mg/testtömeg-kilogrammnak kell lennie. Ha azonban a vizsgálati vegyi anyag toxicitást okoz, az MTD-nek a beadott legmagasabb dózisnak kell lennie, és az alkalmazott dózisok lehetőleg fedjék le a maximálistól az alacsony mértékű toxicitást okozó vagy toxicitást egyáltalán nem okozó dózisig terjedő tartományt. Ha a célszövet (vagyis a here) toxicitása valamennyi vizsgált dózisnál megfigyelhető, érdemes nem toxikus dózisoknál további vizsgálatot végezni. A mennyiségi dózis-válasz adatok teljesebb körű jellemzését célzó vizsgálatok további dóziscsoportokat tehetnek szükségessé. Ezek a határértékek a vizsgálati vegyi anyagok bizonyos, külön követelmények hatálya alá tartozó típusai (például a humán gyógyszerek) esetében változóak lehetnek. Ha a vizsgálati vegyi anyag toxicitást okoz, a legmagasabb dózist és két alacsonyabb dózist kell kiválasztani (a fentiek szerint). Legalább 14 napig tartó beadási időszak esetén a legmagasabb dózisnak 1 000 mg/testtömeg kg/napnak, 14 napnál rövidebb beadási időszak esetében pedig 2 000 mg/testtömeg kg/napnak kell lennie.

A dózisok beadása

29. Az emberi expozíció várható útját figyelembe kell venni a vizsgálat tervezése során. Ezért az egyéb expozíciós utak (például takarmány, ivóvíz, topikális szubkután, intravénás, orális (gyomorszondával), inhalációs vagy implantáció) is kiválaszthatók indokoltként. Az utat mindenesetre úgy kell kiválasztani, hogy biztosítsa a célszövet megfelelő expozícióját. A hasüregbe adott injekció tudományos indokolás hiányában általában nem ajánlott, mivel az fiziológiai szempontból nem releváns emberi expozíciós út. Ha a vizsgálati vegyi anyagot a takarmányba vagy ivóvízbe keverik, különösen egyszeri adagolás esetén ügyelni kell arra, hogy a táplálék és a víz fogyasztása és a mintavétel közötti idő elegendő legyen a hatások kimutathatóságához (lásd a 33. pontot). A gyomorszondán át vagy injekcióval egyszerre beadható maximális folyadékmennyiség a kísérleti állat méretétől függ. A térfogata rendszerint nem haladhatja meg az 1 ml/100 testtömeggramm mennyiséget, kivéve vizes oldatok esetén, amelyeknél legfeljebb 2 ml/100 testtömeggramm használható. Ennél nagyobb mennyiségek használatát (ha azt az állatjóléti tárgyú jogszabályok lehetővé teszik) meg kell indokolni. A koncentráció megfelelő beállításával kell minimalizálni a beadott térfogat variabilitását, és így kell biztosítani, hogy minden dózisnál azonos legyen a testtömegarányos térfogat.

Megfigyelések

30. A kísérleti állatok esetében általános klinikai megfigyeléseket kell tenni, és a klinikai tüneteket legalább naponta egyszer, lehetőleg minden nap ugyanazon időpont(ok)ban rögzíteni kell, továbbá figyelembe kell venni az adagolást követően várható hatások érvényesülésének csúcsidőszakát. Naponta legalább kétszer meg kell vizsgálni az összes állatot morbiditás és mortalitás szempontjából. Minden állat tömegét le kell mérni a vizsgálat megkezdésekor, az ismételt dózisú vizsgálatok esetén hetente legalább egyszer, valamint az állatok végleges elaltatásakor. A legalább egy hétig tartó vizsgálatok során a felvett táplálék mennyiségét legalább heti rendszerességgel le kell mérni. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag beadására az ivóvízzel együtt kerül sor, a vízfogyasztást minden vízcsere alkalmával és legalább hetente le kell mérni. A túlzott toxicitás nem halálos jeleit mutató állatokat a vizsgálati időszak befejezése előtt el kell altatni (13).

Kromoszómapreparálás

31. Közvetlenül az eutanázia után ivarsejt-szuszpenziót vesznek egyik vagy mindkét heréből, majd hipotóniás oldatba helyezik és ismert protokollok szerint – például (2) (14) (15) – fixálják azokat. A sejteket ezután tárgylemezre kenik és megfestik (16) (17). Valamennyi tárgylemezt kóddal kell ellátni, hogy az értékelő ne tudja beazonosítani azokat.

Elemzés

32. Minden egyes állatnál legalább 200 jól szétterült metafázist kell elemezni (3) (11). Amennyiben a negatív történeti kontrolladatok 1 % alatti gyakoriságot mutatnak, a statisztikai értékelés növelése érdekében egyedenként több mint 200 sejtet kell értékelni. Olyan festési módszereket kell alkalmazni, amelyek lehetővé teszik a centromer azonosítását.

33. A kromoszóma és a kromatid típusú rendellenességeket külön-külön kell feljegyezni és altípusonként (törések, kicserélődések) kell besorolni. A Gep-eket fel kell jegyezni, de nem kell figyelembe venni annak meghatározásakor, hogy egy adott vegyi anyag előidézi-e a kromoszóma-rendellenességet mutató sejtek számának szignifikáns növekedését. A laboratóriumban alkalmazott eljárásoknál biztosítani kell, hogy a kromoszóma-rendellenességeket jól képzett értékelők elemezzék, Mivel a tárgylemezek elkészítésére szolgáló eljárások következtében gyakran kiértékelhetetlen a metafázisok bizonyos hányada, mert az eljárás kromoszómaveszteséget okoz, a sejteket a centromerszám alapján kell értékelni, ami a kiértékelt sejteknél nem lehet kevesebb mint $2n\pm2$, ahol az n az adott fajra jellemző haploid kromoszómaszám.

34. Bár a vizsgálat célja a szerkezeti kromoszóma-rendellenességek észlelése, fontos feljegyezni a poliploid sejtek és az endoreduplikált kromoszómákkal rendelkező sejtek előfordulásának gyakoriságát, amennyiben láthatók ilyen sejtek (44. pont).

ADATOK ÉS JELENTÉS

Az eredmények feldolgozása

35. Az egyes állatok adatait táblázat formájában kell megadni. Minden egyes állat esetében értékelni kell a szerkezeti kromoszómaaberrációval/-aberrációkkal rendelkező sejtek számát és a sejtenkénti kromoszóma-rendellenességek számát. Az altípusonként (törések, kicserélődések) besorolt, kromatid és kromoszóma típusú rendellenességeket külön-külön kell felsorolni, megadva a számukat és a gyakoriságukat a kísérleti és a kontrollcsoportok esetében. A Gap-eket külön kell feljegyezni. A Gap-ek gyakoriságát bele kell foglalni a jelentésbe, de általában nem kell szerepeltetni az összes szerkezeti kromoszóma-rendellenesség gyakoriságának elemzésében. A poliploid és az endoreduplikált kromoszómákkal rendelkező sejtek százalékos arányát észlelés esetén a jelentésbe kell foglalni.

36. A toxicitásra és a klinikai tünetekre vonatkozó adatokat (a 30. pont alapján) jelenteni kell.

Elfogadhatósági kritériumok

37. Az alábbi kritériumok határozzák meg a vizsgálat elfogadhatóságát:

— A párhuzamos negatív kontroll adatai összhangban vannak a negatív történeti kontrolladatokra vonatkozó közzétett normákkal (amelyek alapján a kromoszóma-rendellenességgel rendelkező sejtek aránya várhatóan > 0 % és ≤ 1,5 %) és – amennyiben rendelkezésre állnak – a laboratórium történeti kontrolladataival (lásd a 10. és a 18. pontot).

— A párhuzamos pozitív kontrollok olyan válaszokat generálnak, amelyek összhangban vannak a pozitív történeti kontrolladatokra vonatkozólag közzétett normákkal és – amennyiben rendelkezésre áll – a laboratórium pozitív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisával, továbbá a negatív kontrollhoz viszonyítva statisztikailag szignifikáns növekedést idéznek elő (lásd a 17. és a 18. pontot).

— Megfelelő számú sejt és dózis képezte elemzés tárgyát (lásd a 28. és a 32. pontot).

— A legmagasabb dózis kiválasztására vonatkozó kritériumok összhangban vannak a 25. és 26. pontban ismertetett legmagasabb dózisokkal.

38. Ha mitózist és meiózist egyaránt tapasztalnak, meg kell határozni a spermatogonális mitózisok első és második meiotikus metafázishoz viszonyított arányát, állatonként 100 osztódó sejt összes mintájában valamennyi kezelt és negatív kontrollállathoz tartozó citotoxicitás méréseként. Ha csak mitózist figyelnek meg, a mitózisindexet állatonként legalább 1 000 sejtben kell meghatározni.

Az eredmények értékelése és értelmezése

39. Legalább három kezelt dóziscsoportot kell megvizsgálni annak érdekében, hogy elegendő adat álljon rendelkezésre a dózis–válasz elemzéshez.

40. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen pozitívnak minősül, ha:

— legalább az egyik vizsgálati dózis statisztikailag szignifikáns növekedést mutat a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva;

— a növekedés legalább egy mintavételi időpont tekintetében összefügg a dózissal; valamint

— ezen eredmények bármelyike kívül esik a negatív kontrolladatok elfogadható tartományán vagy a laboratórium negatív történeti kontrolladatainak eloszlásán (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértéken).

Ezt követően úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag képes kromoszóma-rendellenességeket előidézni a vizsgált állatok spermatogóniumaiban. A legmegfelelőbb statisztikai módszerekre vonatkozó ajánlások a szakirodalomban is megtalálhatók (11) (18). Az alkalmazott statisztikai teszteknek az állatot kell kísérleti egységnek tekinteniük.

41. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen negatívnak minősül, ha:

— a vizsgálati dózisok egyike sem mutat statisztikailag szignifikáns növekedést a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva;

— egyik kísérleti körülmény sem mutat a dózissal összefüggő növekedést; valamint

— valamennyi eredmény a negatív kontrolladatok, vagy amennyiben rendelkezésre állnak, a laboratórium negatív történeti kontrolladatainak (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértéken) tartományába esik.

Ezt követően úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag nem képes kromoszóma-rendellenességeket előidézni a vizsgált állatok spermatogóniumaiban. A legmegfelelőbb statisztikai módszerekre vonatkozó ajánlások a szakirodalomban is megtalálhatók (11) (18). A negatív eredmény nem zárja ki annak lehetőségét, hogy a vegyi anyag kromoszóma-rendellenességet vagy génmutációt idéz elő a fejlődés egy későbbi, a vizsgálat tárgykörén kívül eső fázisában.

42. Az egyértelműen pozitív vagy egyértelműen negatív válasz igazolása nem követelmény.

43. Ha a válasz nem egyértelműen negatív és nem is egyértelműen pozitív, illetve egy adott eredmény (például kismértékű vagy határesethez közelítő növekedés) biológiai relevanciája megállapításának segítése érdekében az adatokat szakértői véleménnyel és/vagy a meglévő kísérleti adatok további vizsgálataival kell értékelni, például meg kell határozni, hogy a pozitív eredmény kívül esik-e a negatív kontrolladatok elfogadható tartományán vagy a laboratórium negatív történeti kontrolladatain (19).

44. Ritka esetekben, az adatkészlet még további vizsgálatok után is eleve kizárja a pozitív vagy negatív eredményekre vonatkozó következtetést, ezért kétértelmű reakció lesz a következtetés.

45. A poliploid sejtek számának növekedése azt jelezheti, hogy a vizsgálati vegyi anyag potenciálisan gátolhatja a mitotikus folyamatokat és számszerű kromoszóma-rendellenességet idézhet elő (20). Az endoreduplikált kromoszómákkal rendelkező sejtek számának növekedése azt jelezheti, hogy a vizsgálati vegyi anyag potenciálisan gátolhatja a sejtciklus előrehaladását (21) (22), ami más mechanizmus révén idéz elő számszerű kromoszóma-rendellenességet, mint a mitotikus folyamatok gátlása (lásd a 2. pontot). Ezért a poliploid sejtek és az endoreduplikált kromoszómákkal rendelkező sejtek előfordulását külön-külön kell feljegyezni.

Vizsgálati jelentés

46. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Összegzés.

Vizsgálati vegyi anyag:

— eredet, gyártási szám, felhasználási határidő, ha rendelkezésre áll;

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, ha ismert;

— a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben, ha ismert;

— adott esetben a pH-érték, az ozmolalitás és a kicsapódás mérése abban a tápfolyadékban, amelyhez a vizsgálati vegyi anyagot hozzáadták.

Egy összetevőből álló anyag:

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai révén jellemezve.

A vizsgálati vegyi anyag előkészítése:

— a vivőanyag megválasztásának indokolása;

— a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban;

— a takarmány-, ivóvíz- vagy inhalációs készítmények előkészítése;

— a készítmények analitikai meghatározásai (pl. stabilitás, homogenitás, névleges koncentráció), ha végeztek ilyen meghatározásokat.

Kísérleti állatok:

— a felhasznált faj/törzs és a felhasználásuk indokolása;

— az állatok száma és életkora,

— az állatok származása, tartási körülmények, takarmány stb.;

— az állatok egyedi azonosítására szolgáló módszerek;

— rövid távú vizsgálatok esetében: az egyes állatok testsúlya a vizsgálat kezdetekor és végén; egy hétnél hosszabb vizsgálatok esetében: az egyes állatok testtömege a vizsgálat során és a táplálékfelvételük. A testtömegtartományt, az átlagot és a szórást minden egyes csoportnál meg kell adni.

Vizsgálati körülmények:

— a pozitív és negatív (vivőanyagos/oldószeres) kontrollok adatai;

— a dózistartomány-kereső vizsgálatból kapott adatok, ha történt ilyen vizsgálat;

— a dózisok kiválasztásának indokolása;

— a beadási mód indokolása;

— a vizsgálati vegyi anyag előkészítésének részletes ismertetése;

— a vizsgálati vegyi anyag beadására vonatkozó részletek;

— a kiválasztott elpusztítási időpontok indokolása;

— az állati toxicitás mérésére szolgáló módszerek, beleértve adott esetben a kórszövettani vagy hematológiai elemzéseket, illetve az állatok megfigyelésének és a testtömeg mérésének gyakorisága;

— negatív eredmény esetén annak ellenőrzésére szolgáló módszerek, hogy a vizsgálati vegyi anyag elérte-e a célszövetet vagy az általános keringési rendszert;

— tényleges dózis (mg/testtömeg kg/nap) a vizsgálati vegyi anyagnak a takarmányban/ivóvízben meglévő koncentrációjából (ppm) és a fogyasztásból számítva, ha alkalmazható;

— a táplálék és víz minőségére vonatkozó részletek;

— a kezelési és mintavételi ütemtervek részletes leírása és kiválasztásuk indokolása;

— az eutanázia módja;

— a fájdalomcsillapítás módja (amennyiben alkalmaznak ilyet);

— a szövetek izolálására használt eljárások;

— metafázis-blokkoló vegyi anyag azonosítása, annak koncentrációja és kezelési időtartama;

— a tárgylemez preparálásának módszerei;

— a rendellenességek értékelésének kritériumai;

— az elemzett sejtek száma (állatonként);

— azon kritériumok, amelyek meghatározzák, hogy a vizsgálatok pozitívnak, negatívnak vagy többféleképpen értelmezhetőnek tekintendők-e.

Eredmények:

— az állatok állapota a vizsgálati időszak előtt és alatt, beleértve a toxicitás jeleit;

— az állatok testsúlya és szerveik tömeg a terminálláskor (több kezelés esetén a kezelési eljárás során mért testsúlyok);

— toxicitás jelei;

— mitotikus index;

— spermatogóniummitózisok aránya az első és második meiotikus metafázishoz viszonyítva, vagy a célszövet expozíciójának egyéb bizonyítéka;

— rendellenességek száma és típusa az egyes állatokban;

— a rendellenességek csoportonkénti száma összesen, átlagokkal és szórással;

— a rendellenességeket mutató sejtek csoportonkénti száma átlagokkal és szórással;

— a dózis-válasz összefüggés, ahol lehetséges;

— statisztikai elemzések és alkalmazott módszerek;

— az egyidejűleg elvégzett negatív kontrollokra vonatkozó adatok;

— negatív történeti kontrolladatok, a tartományok, az átlagok, a szórás és a 95 %-os konfidenciaintervallum (ha rendelkezésre áll) megadásával, vagy a vizsgálati eredmények elfogadhatóságának megállapításához használt, publikált negatív történeti kontrolladatok;

— az egyidejűleg elvégzett pozitív kontrollokra vonatkozó adatok;

— a ploidia változásai, ha észlelhetők, beleértve a poliploid és/vagy endoreduplikált sejtek gyakoriságát.

Az eredmények értékelése

Következtetések

SZAKIRODALOM

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris

(2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.

(3) Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.

(4) Russo, A. (2000). *In vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167-189.

(5) Hess, R.A. and de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, pp. 1-15.

(6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368-379.Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. and Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.

(7) Cattanach, B.M., and Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472-474.

(8) Cattanach, B.M., and Williams, C.E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371-375.

(9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135-140.

(10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3): 313-324.

(11) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417, 19–30.

(12) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313-319.

(13) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, (No 19.), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(14) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, 207-209.

(15) Hsu, T.C., Elder, F. and Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. Environ. Mutagen., 1, 291-294.

(16) Evans, E.P., Breckon, G., and Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289-294.

(17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In vivo* Cytogenetics Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(18) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G.and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

(19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. Mutation Res., 723, 87-90.

(20) Warr T.J., Parry E.M. and Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, Mutation Res., 287, 29-46.

(21) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. Cancer Res., 43, 1362-1364.

(22) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. Mutation Res., 119, 403-413.

Függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Aneuploidia: a normális diploid (vagy haploid) kromoszómaszámtól egyetlen kromoszómával vagy egynél több, szám feletti kromoszómával, de nem teljes kromoszómakészlettel (kromoszómakészletekkel) (poliploidia) való bármely eltérés.

Centroméra: olyan kromoszóma-régió(k), amely(ek)hez a sejtosztódás során orsórostok kötődnek, lehetővé téve a leány-kromoszómáknak az utódsejtek pólusai felé irányuló szabályos mozgását.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Kromoszómasokféleség: a kromoszómák alakjában (pl. metacentrikus, akrocentrikus stb.) és méretében megfigyelhető változatosság.

Kromatid típusú rendellenesség: olyan szerkezeti kromoszómakárosodás, amely a különálló kromatidok törésében vagy a kromatidok közötti törésben és újraegyesülésben nyilvánul meg.

Kromoszóma típusú rendellenesség: olyan szerkezeti kromoszómakárosodás, amely a két kromatid azonos helyén történt törésében, vagy törésében és újraegyesülésében nyilvánul meg.

Klasztogén: bármely olyan vegyi anyag, amely sejtek vagy szervezetek populációjában szerkezeti kromoszóma-rendellenességeket okoz.

Gap: egyetlen kromatid szélességénél kisebb és a kromatidok minimális átrendeződését okozó akromatikus lézió.

Genotoxikus: olyan általános kifejezés, amely magában foglalja a DNS- vagy kromoszómakárosodás valamennyi típusát, köztük a töréseket, a deléciókat, az adduktok képződését, a nukleotidok módosulását és kapcsolódását, az átrendeződéseket, a mutációkat, a kromoszómaaberrációkat és az aneuploidiát. A genotoxikus hatás nem minden típusa eredményez mutációkat vagy stabil kromoszómakárosodást.

Mitotikus index (MI): a metafázisban lévő sejtek és a sejtpopuláció összes sejtjének aránya; e populáció proliferációja mértékének jelzése.

Mitózis: a sejtmag osztódása, amely általában profázisra, prometafázisra, metafázisra, anafázisra és telofázisra osztható fel.

Mutagén: örökletes elváltozást idéz elő a génekben lévő DNS-bázispár-szekvenciá(k)ban vagy a kromoszómák szerkezetében (kromoszómaaberrációk).

Számszerű rendellenesség: a kromoszómák számának eltérése a felhasznált állatokra jellemző normál számértéktől.

Poliploidia: a haploid kromoszómaszám (*n*) egészszámú, de nem diploid (azaz *3n*, *4n* és így tovább) megsokszorozódása.

Szerkezeti rendellenesség: a sejtosztódás metafázisának mikroszkopikus vizsgálata során – deléciókként, fragmensekként és kicserélődésekként – észlelhető változás a kromoszóma szerkezetében.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

UVCB: ismeretlen vagy változó összetételű vegyi anyagok, komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok.”

5. A B. részben a B.40. fejezet helyébe a következő szöveg lép:

„B.40. ***IN VITRO* BŐRKORRÓZIÓ: TRANSZKUTÁN ELEKTROMOS REZISZTENCIA (TER) VIZSGÁLATI MÓDSZER**

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 430. vizsgálati iránymutatásában (2015) leírt módszerrel. A bőrkorrózió valamely vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően megjelenő, visszafordíthatatlan bőrkárosodás, amely a felhámon át az irhára is átterjedő látható szövetelhalást okoz [az Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) által kidolgozott, vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszerében (GHS) (1), valamint az Európai Unió (EU) anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendeletében (CLP-rendelet ([1])) meghatározottak szerint]. Ez a továbbfejlesztett B.40. vizsgálati módszer olyan *in vitro* eljárást biztosít, amely lehetővé teszi a korróziót nem okozó és korróziót okozó anyagok és keverékek ENSZ GHS (1) és CLP-rendelet szerinti meghatározását.

2. A bőrkorrózió felmérése jellemzően kísérleti állatokon történő vizsgálatot foglal magában (az OECD eredetileg 1981-ben elfogadott, majd 1992-ben, 2002-ben és 2015-ben felülvizsgált 404. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű B.4. vizsgálati módszer alkalmazásával) (2). E B.40. vizsgálati módszer mellett a vegyi anyagok bőrkorróziós hatásának vizsgálatára szolgáló más *in vitro* vizsgálati módszereket is validáltak és elfogadtak – az OECD 431. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű – B.40bis. vizsgálati módszerként (3) és – az OECD 435. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű – B.65. vizsgálati módszerként (4), amelyek igény szerint alkalmazhatók a korrozív vegyi anyagok alkategóriáinak azonosítására is. Az OECD 439. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű (5) B.46. vizsgálati módszer keretében pedig elfogadtak több, a bőrirritáció felmérésére szolgáló validált *in vitro* vizsgálati módszert. A bőrkorróziós és bőrirritációs vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről (IATA) szóló OECD-iránymutatás több, különböző információforrásokat és adatelemző eszközöket csoportosító modult ismertet, továbbá iránymutatást nyújt arra nézve, i. hogyan integrálhatók és használhatók az ismert vizsgálati és nem vizsgálati eredetű adatok a vegyi anyagok potenciális bőrirritációs és bőrkorróziós hatásainak felmérésére, és ii. javaslatot tesz egy, a további vizsgálatok szükségessége esetén alkalmazható megközelítésre (6).

3. Ez a vizsgálati módszer a bőrkorrózióval mint az emberi egészség károsodásának egyik végpontjával foglalkozik. Alapja a patkánybőr transzkután elektromos rezisztenciáját (TER) mérő vizsgálati módszer, amelynek keretében bőrkorongokat használnak korrozív anyagok azonosítására, vizsgálva a normál *stratum corneum* integritására és barrierfunkciójára gyakorolt károsító hatásukat. A módszernek megfelelő, eredetileg 2004-ben elfogadott OECD vizsgálati iránymutatást az IATA-iránymutatás fényében 2015-ben módosították.

4. Az *in vitro* bőrkorróziós vizsgálatok szabályozási célú értékelése érdekében elvégezték a bőrkorrózió felmérésére szolgáló, patkánybőr használatán alapuló TER vizsgálati módszer elővalidálási vizsgálatait (7), majd a hivatalos validálási vizsgálatát (8) (9) (10) (11). E vizsgálatok eredményei vezettek ahhoz az ajánláshoz, hogy a TER vizsgálati módszer (validált referenciamódszer - VRM) használható szabályozási célú *in vivo* bőrkorrózió felmérésére (12) (13) (14).

5. Mielőtt az *in vitro* TER bőrkorróziós vizsgálati módszerhez hasonló vagy ahhoz képest módosított, a validált referenciamódszertől eltérő javasolt módszer szabályozási célú alkalmazásra kerülne, a validált referenciamódszerhez való hasonlóságának biztosítása érdekében a teljesítményszabványok (15) követelményeinek megfelelően meg kell határozni a javasolt felhasználása tekintetében fennálló megbízhatóságát, relevanciáját (pontosságát) és korlátait. Az adatok OECD-megállapodás szerinti kölcsönös elfogadása csak azután garantált, hogy a teljesítményszabványok szerint javasolt új vagy átdolgozott vizsgálati módszert felülvizsgálták és belefoglalták az OECD megfelelő vizsgálati iránymutatásába.

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

6. Az alkalmazott fogalmak meghatározása a függelékben található.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK

7. A validálási vizsgálat (10) és más közzétett tanulmányok (16) (17) szerint a patkánybőr TER vizsgálati módszer egy 122 anyagból álló adatbázis tekintetében 94 %-os (51/54) összérzékenységgel és 71 %-os specificitással (48/68) képes megkülönböztetni ismert bőrkorróziót okozó és bőrkorróziót nem okozó anyagokat.

([1]) Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról (HL L 353/1., 2008.12.31.).

8. Ez a vizsgálati módszer a bőrkorrózió azonosítására szolgáló *in vitro* eljárás. Lehetővé teszi, hogy az ENSZ által kidolgozott GHS és a CLP-rendelet szerint megkülönböztessék a korróziót nem okozó és a korróziót okozó vizsgálati vegyi anyagokat. E vizsgálati módszer korlátai közé tartozik – ahogyan az a validálási vizsgálatokból kiderült (8) (9) (10) (11) –, hogy nem teszi lehetővé a korrozív anyagoknak és keverékeknek az ENSZ GHS és a CLP-rendelet szerinti alkategóriákba sorolását. A vizsgálati módszer jövőbeni használatát a vonatkozó szabályozási keret fogja meghatározni. Ez a vizsgálati módszer ugyan nem biztosít elegendő információt a bőrirritáció felméréséhez, de a B.46. vizsgálati módszer célja kifejezetten az, hogy a bőrirritációs egészségügyi hatásokat *in vitro* határozza meg (5). Egyetlen bőrexpozíció után a bőrt ért helyi hatások teljes kiértékeléséhez az integrált vizsgálati és értékelési megközelítésekről szóló OECD-iránymutatást kell tanulmányozni (6).

9. A vizsgálati módszert alátámasztó validálás során igen sokféle, többségében különálló anyagot képviselő vegyi anyagot vizsgáltak, és a validálási vizsgálat empirikus adatbázisa összesen 60 anyagot tartalmazott, amelyek lefedik a kémiai osztályok széles körét (8) (9). Az összes rendelkezésre álló adat alapján a vizsgálati módszer a legkülönbözőbb kémiai osztályokra és halmazállapotokra, azon belül folyadékokra, félszilárd, szilárd és viaszos állagú anyagokra alkalmazható. Mivel azonban bizonyos halmazállapotok tekintetében nem állnak rendelkezésre könnyen hozzáférhető, megfelelő referenciaadatokkal bíró vizsgálati tételek, a validálás során viszonylag csekély számú viaszos állagú és korrozív szilárd anyag került felmérésére. A folyadékok lehetnek vizesek vagy nem vizesek; a szilárd anyagok lehetnek vízben oldódóak vagy oldhatatlanok. Olyan esetekben, amikor bizonyítékkal igazolható, hogy a vizsgálati módszer nem alkalmazható valamely konkrét anyagkategóriára, a vizsgálati módszert nem szabad az adott anyagkategóriára alkalmazni. E vizsgálati módszerről feltételezhető továbbá, hogy az anyagokra való alkalmazhatóságának kiterjesztéseként keverékekre is alkalmazható. Mivel azonban a keverékek kategóriák és összetételek széles körét fedik le, és jelenleg kevés információ áll rendelkezésre a keverékek vizsgálatára vonatkozóan, azokban az esetekben, amikor bizonyítékkal igazolható, hogy a vizsgálati módszer valamely konkrét keverékkategóriára nem alkalmazható (pl. az Eskes és munkatársai, 2012 által javasolt stratégia alapján) (18), a vizsgálati módszer az adott keverékkategóriára nem alkalmazható. A vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény. Gázokat és aeroszolokat validálási vizsgálatok keretében még nem vizsgáltak (8) (9). Bár elképzelhető, hogy ezek is vizsgálhatók TER vizsgálati módszerrel, a jelenlegi vizsgálati módszer nem teszi lehetővé gázok és aeroszolok vizsgálatát.

A VIZSGÁLAT ELVE

10. A vizsgálati vegyi anyagot 24 órán át a bőrkorongok epidermális felületén alkalmazzák egy kétkamrás vizsgálati rendszerben, amelyben a bőrkorongok a két kamra elválasztására szolgálnak. A bőrkorongok kíméletes módon leölt, 28–30 napos patkányokról származnak. A korrozív vegyi anyagok azok, amelyek a normál *stratum corneum* integritásának és barrierfunkciójának elvesztését okozzák, amit a TER meghatározott határérték alá történő csökkenésével mérnek (16) (lásd a 32. pontot). A patkánybőr TER esetében az 5 kΩ határérték került kiválasztásra a széles tartományt felölelő anyagok nagyszámú adataiból, ahol az értékek túlnyomó többsége vagy világosan ezen érték felett (gyakran > 10 kΩ) vagy jóval alatta (gyakran < 3 kΩ) volt (16). Általában azok a vizsgálati vegyi anyagok, amelyek az állatokra nézve nem korrozívak, de irritálók vagy nem irritálók, nem csökkentik a TER-t e határérték alá. Továbbá más bőrkészítmények vagy más berendezés használata módosíthatja a határértéket, ami további validálásokat tesz szükségessé.

11. A TER-ben a pozitív értékek – beleértve az 5 kΩ körülieket is – kontrollvizsgálata céljából a vizsgálati eljárás részét képezi egy festékmegkötést biztosító lépés is. A festékmegkötést biztosító lépés meghatározza, hogy az ionáteresztő képesség fokozódását a *stratum corneum* fizikai károsodása okozza-e. A patkánybőrt alkalmazó TER módszer a B.4. vizsgálati módszer (2) alapján vizsgált nyúlban előre jelezte az *in vivo* korrozivitást.

A JÁRTASSÁG BIZONYÍTÁSA

12. Az e vizsgálati módszerhez kapcsolódó patkánybőr TER vizsgálati módszer rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak az 1. táblázatban ajánlott tizenkét jártassági tesztanyag helyes osztályozásával igazolniuk kell szakmai jártasságukat. Ha a jegyzékben szereplő valamely anyag nem áll rendelkezésre, illetve ha indokolható, megfelelő *in vivo* és *in vitro* referenciaadatokkal rendelkező más – például a referencia-vegyianyagok jegyzékében feltüntetett (16) – anyag is használható, amennyiben a kiválasztási kritériumok megegyeznek az 1. táblázatban foglaltakkal.

1. táblázat

A jártassági tesztanyagok jegyzéke [1]

Anyag	CAS-szám	Kémiai osztály [2]	ENSZ GHS/CLP szerinti, in vivo eredményeken alapuló kat. [3]	VRM szerinti, in vitro eredményeken alapuló kat.	Halmazállapot	pH [4]
In vivo korrozív hatású						
N,N'-Dimetil-dipropiléntriamin	10563-29-8	szerves bázis	1A	6 × C	F	8,3
1,2-Diaminopropán	78-90-0	szerves bázis	1A	6 × C	F	8,3
Kénsav (10 %)	7664-93-9	szervetlen sav	(1A/)1B/1C	5 × C 1 × NK	F	1,2
Kálium-hidroxid (10 %-os aq.)	1310-58-3	szervetlen bázis	(1A/)1B/1C	6 × C	F	13,2
Oktánsav (kaprilsav)	124-07-2	szerves sav	1B/1C	4 × C 2 × NK	F	3,6
2-terc-Butilfenol	88-18-6	fenol	1B/1C	4 × C 2 × NK	F	3,9
In vivo nem korrozív hatású						
Izosztearinsav	2724-58-5	szerves sav	NK	6 × NK	F	3,6
4-Amino-1,2,4-triazol	584-13-4	szerves bázis	NK	6 × NK	Sz	5,5
Fenetil-bromid	103-63-9	elektrofil	NK	6 × NK	F	3,6
4-(Metil-tio)-benzaldehid	3446-89-7	elektrofil	NK	6 × NK	F	6,8
1,9-Dekadién	1647-16-1	semleges szerves	NK	6 × NK	F	3,9
Tetraklór-etilén	127-18-4	semleges szerves	NK	6 × NK	F	4,5

Rövidítések: aq = vizes; CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám; VRM = Validált referenciamódszer; C = korrozív; NK = Nem korrozív

([1]) A jártassági tesztanyagok – amelyek felsorolása elsőként korrozív és nem korrozív hatásuk szerint, majd korrozivitási alkategóriák szempontjából, végül pedig kémiai osztályuk alapján történt – a patkánybőr TER vizsgálati módszer ECVAM által végzett validálási vizsgálatában használt anyagok közül kerültek kiválasztásra (8) (9). Ha nincs másképpen feltüntetve, az anyagokat a kereskedelmi forrásból való beszerzésükkor tapasztalt tisztasági szinten vizsgálták (8). A lehetőségekhez mérten olyan anyagok kerültek kiválasztásra, amelyek: i. a validált referenciamódszer által mérhető vagy előrevetíthető korrozivitási válaszreakciók tartományának tekintetében reprezentatívak (pl. nincs korrozív hatásuk; enyhétől az erősig terjedő korróziós hatást váltanak ki); ii. a validálási vizsgálatban használt kémiai osztályok tekintetében reprezentatívak; iii. tükrözik a validált referenciamódszer teljesítményi jellemzőit; iv. jól meghatározott kémiai szerkezettel rendelkeznek; v. egyértelmű eredményeket hoznak az *in vivo* referenciavizsgálati módszer alkalmazásakor; vi. kereskedelmi forgalomban kaphatók; és vii. nem kapcsolódnak hozzájuk kiemelkedően magas ártalmatlanítási költségek.

([2]) A Barratt és társai szerinti kémiai osztály (8).

([3]) Az ENSZ GHS/CLP-rendelet szerinti 1A, 1B és 1C kategóriának az ENSZ I., II. és III. csomagolási csoportja felel meg.

([4]) A pH-értékek forrása a Fentem és társai (9), valamint a Barratt és társai (8).

ELJÁRÁS

13. A patkánybőr TER bőrkorróziós vizsgálati módszerhez rendelkezésre állnak szabványműveleti eljárások (19). Az e vizsgálati módszer keretébe tartozó patkánybőr TER vizsgálati módszereknek az alábbi feltételeknek kell megfelelniük:

Állatok

14. Patkányokat kell használni, mert a bőrüknek a vizsgálati módszer során alkalmazható anyagokkal szembeni érzékenysége már korábban bebizonyosodott (12), emellett ez az egyetlen hivatalosan validált bőrforrás (8) (9). A patkányok kora (a bőr begyűjtésének időpontjában) és származása különösen fontos annak biztosítására, hogy a szőrtüszők nyugvó fázisban legyenek, mielőtt a felnőtt szőr nőni kezd.

15. A fiatal, körülbelül 22 napos, hím vagy nőstény patkányok (Wistar vagy hasonló törzs) háton és horpaszon lévő szőrét kis nyírógéppel óvatosan eltávolítják. Azután az állatokat óvatosan törölgetve megmossák, miközben a lenyírt területet antibiotikumot tartalmazó oldatba merítik (amely a baktériumok növekedését hatékonyan gátló koncentrációban például sztreptomicint, penicillint, klóramfenikolt és amfotericint tartalmaz). Az állatokat az első mosást követő harmadik vagy negyedik napon ismételten megmossák antibiotikummal, és a második mosást követő 3 napon belül felhasználják azokat, amikor a *stratum corneum* megerősödött a szőrtelenítés után.

A bőrkorongok előkészítése

16. Az állatokat 28–30 napos korukban kíméletes módon leölik; ez a kor kritikus. Ezután minden állatról eltávolítják a dorsolaterális bőrt, és a bőrtől való óvatos elválasztással lefejtik a felesleges szubkután zsírt. Egyenként körülbelül 20 mm-es átmérőjű bőrkorongokat távolítanak el. A bőrt a korongok felhasználása előtt tárolni lehet, ha kimutatható, hogy a pozitív és negatív kontrolladatok megegyeznek a friss bőrnél kapott adatokkal.

17. Minden bőrkorongot egy PTFE (politetrafluoroetilén) cső vége fölé helyeznek, biztosítva, hogy az epidermális felület érintkezzen a csővel. Egy „O” gumigyűrűt pontosan a cső végére illesztenek, hogy a helyén tartsa a bőrt, és a felesleges szövetet levágják. Az „O” gumigyűrűt aztán vazelinnel óvatosan tömítik a PTFE-cső végéhez. A csövet egy rugós csipesz tartja egy $MgSO_4$-oldatot (154 mM) tartalmazó befogadókamra belsejében (1. ábra). A bőrkorongot teljesen bele kell meríteni az $MgSO_4$-oldatba. Egyetlen patkánybőrből 10–15 bőrkorongot lehet készíteni. A cső és az „O” gyűrű méreteit a 2. ábra mutatja.

18. A vizsgálat kezdete előtt az egyes állati bőrök minőség-ellenőrzése céljából megmérik két bőrkorong TER-értékét. Mindkét korongnak 10 kΩ-nál nagyobb elektromosrezisztencia-értéket kell mutatnia ahhoz, hogy a többi korongot fel lehessen használni a vizsgálati módszerhez. Ha a rezisztencia értéke kisebb mint 10 kΩ, e bőrdarab többi korongját ki kell dobni.

A vizsgálati vegyi anyag és a kontrollanyagok alkalmazása

19. A vizsgálati modell megfelelő teljesítménye érdekében minden vizsgálatmenettel (kísérlettel) egyidejűleg pozitív és negatív kontrollokat kell végezni. Minden vizsgálatmenetben (kísérletben) egyetlen állatról származó bőrkorongokat kell használni. Az ajánlott pozitív, illetve negatív vizsgálati vegyi anyagok: 10 M sósav, illetve desztillált víz.

20. A folyékony vizsgálati vegyi anyagokat (150 µl) a cső belsejében egyenletesen viszik fel az epidermális felületre. Szilárd anyagokkal történő vizsgálat esetén megfelelő mennyiségű szilárd anyagot egyenletesen visznek fel a korongra annak biztosítására, hogy az epidermisz teljes felületét beborítsa. A szilárd anyagra deionizált vizet (150 µl) öntenek, és a csövet óvatosan felrázzák. A bőrrel való maximális érintkezés elérése érdekében előfordulhat, hogy a szilárd anyagot 30 °C-ra fel kell melegíteni olvasztás vagy lágyítás céljából, illetve őrölni vagy porítani kell.

21. Minden vizsgálatmenet (kísérlet) során az egyes vizsgálati és kontrollanyagokhoz három bőrkorongot használnak. A vizsgálati vegyi anyagot 24 órán át alkalmazzák 20–23 °C-on. A vizsgálati vegyi anyagot legfeljebb szobahőmérsékletű csapvízsugárral addig mossák, amíg már nem lehet további anyagot eltávolítani.

TER-mérések

22. A bőr ellenállásának TER-ként történő mérése egy kisfeszültségű, váltakozó áramú Wheatstone-híd segítségével történik (18). A mérőeszköz általános jellemzői: 1–3 Volt üzemi feszültség, 50–1 000 Hz-es szinusz- vagy négyszöghullámú váltakozó áram és legalább 0,1–30 kΩ mérési tartomány. A validálási vizsgálatban használt mérőeszköz az induktivitást, kapacitást és rezisztenciát sorrendben 2 000 H, 2 000 μF és 2 MΩ értékekig méri 100 Hz-es vagy 1 kHz-es frekvencián, soros vagy párhuzamos értékek felhasználásával. A TER-mérések céljára a korrozivitásra vonatkozó vizsgálati méréseket elektromos ellenállásban rögzítik 100 Hz-es frekvencián és soros értékeket felhasználva. Az elektromos ellenállás mérése előtt a bőr felületi feszültségét megfelelő mennyiségű 70 %-os etil-alkohollal csökkentik, amely beborítja az epidermiszt. Néhány másodperc elteltével az etil-alkoholt eltávolítják a csőből, majd azután a szövetet 3 ml $MgSO_4$ -oldat (154 mM) hozzáadásával hidratálják. Az ellenállás kΩ/bőrkorongban való méréséhez a Wheatstone-híd elektródáit ráhelyezik a bőrkorong mindkét oldalára (1. ábra). Az elektróda méretei és a krokodilcsipeszek alatti elektródaszakasz hosszúsága a 2. ábrán látható. A belső elektródához csatolt csipesz az ellenállás mérésekor a PTFE-cső tetején található annak biztosítására, hogy állandó hosszúságú elektróda merüljön az $MgSO_4$-oldatba. A külső elektródát a befogadókamra belsejébe úgy helyezik el, hogy az a kamra aljáig érjen. A rugós csipesz és a PTFE-cső alja közötti távolságot állandó értéken tartják (2. ábra), mivel ez a távolság befolyásolja a kapott rezisztencia értékét. Következésképpen a belső elektróda és a bőrkorong közötti távolságnak állandónak és minimálisnak kell lenni (1–2 mm).

23. Ha a mért rezisztencia értéke nagyobb mint 20 kΩ, az valószínűleg a bőrkorong epidermális felületét borító vegyianyag-maradvány következménye. Ennek a bevonatnak az eltávolítása megkísérelhető például úgy, hogy kesztyűs hüvelykujjal befogják a PTFE csövet, és körülbelül 10 másodpercen át rázogatják; az $MgSO_4$-oldatot eltávolítják és a rezisztenciamérést friss $MgSO_4$-tal megismétlik.

24. A vizsgálati műszer jellemzői és méretei, valamint a használt vizsgálati eljárás befolyásolhatja a kapott TER-értékeket. Az 5 kΩ korróziós határértéket az ebben a vizsgálati módszerben leírt speciális műszerrel és eljárással kapott adatok alapján számolták ki. Ha a vizsgálati feltételek megváltoznak, vagy más készüléket használnak, előfordulhat, hogy eltérő határ- és kontrollértékeket kell alkalmazni. Ezért ajánlatos a módszert és az ellenállás határértékét a validálási vizsgálatban (8) (9) használt anyagokból vagy a vizsgált anyagokhoz hasonló kémiai osztályú anyagokból kiválasztott jártassági tesztanyagok sorozatának vizsgálatával meghatározni. A megfelelő jártassági tesztanyagok jegyzékét az 1. táblázat tartalmazza.

Festékanyag-megkötő módszerek

25. Bizonyos nem korrozív anyagoknak való expozíció eredményezheti a rezisztencia 5 kΩ határérték alá történő csökkenését, ami lehetővé teszi az ionoknak a *stratum corneum*on való passzálását, csökkentve ezáltal az elektromos rezisztenciát (5). Például a semleges szerves és felületaktív anyagok (például a tisztítószerek, emulgeálószerek és más felületaktív anyagok) eltávolíthatják a bőrzsírt, ezáltal a barrier az ionok számára áthatolhatóbbá válik. Így ha az ilyen vegyi anyagok TER-értéke alacsonyabb mint 5 kΩ vagy akörül van, és nem tapasztalható látható károsodás a bőrkorongokon, a kontrollon és kezelt szöveteken festékpenetrációs vizsgálatot kell végezni annak megállapítására, hogy a kapott TER-érték a bőr fokozottabb áteresztő képességének vagy a bőrkorrózionak az eredménye-e (7) (9). Ez utóbbi esetén, amikor a *stratum corneum* szétrepedt, ha a bőrfelszínre szulforhodamin B festéket visznek fel, ez gyorsan áthatol, és megfesti az alatta lévő szövetet. Ez a különleges festékanyag az anyagok széles skálájának ellenáll, és nem érinti a lent leírt kivonási eljárás.

Szulforhodamin B festékanyag alkalmazása és eltávolítása

26. A TER-vizsgálatot követően a magnézium-szulfátot eltávolítják a csőből, és gondosan megvizsgálják, hogy a bőrön látható-e károsodás. Ha nincs nagyobb látható károsodás (pl. perforáció), szulforhodamin B festékanyag (Acid Red 52; C.I. 45100; CAS-szám: 3520-42-1), 150 μl 10 tömegszázalékos desztillált vizes oldatát alkalmazzák minden bőrkorong epidermális felületén 2 órán át. Ezeket a bőrkorongokat azután a felesleges/meg nem tapadt festékanyag eltávolítása érdekében körülbelül 10 másodpercig legfeljebb szobahőmérsékletű csapvízben lemossák. Minden egyes bőrdarabot gondosan eltávolítanak a PTFE-csőről és egy, deionizált vizet (8 ml)

tartalmazó ampullába (például egy 20 ml-es üveg szcintillációs ampullába) helyezik. Az ampullákat óvatosan 5 percen át rázogatják minden felesleges/meg nem tapadt festékanyag eltávolítása érdekében. Ezt az öblítési eljárást megismétlik, azután a bőrkorongokat kiveszik, és desztillált vízben lévő 5 ml 30 tömegszázalékos nátrium-dodecil-szulfát (SDS) vizes oldatát tartalmazó ampullába helyezik, és egy éjszakán át 60 °C-on inkubálják.

27. Az inkubálást követően minden bőrkorongot eltávolítanak és kidobnak, a fennmaradó oldatot pedig 8 percen át 21 °C-on centrifugálják (relatív centrifugális erő ~175 × g). 1 ml felülúszót kivesznek, és felhígítanak 1:5 térfogatban [azaz 1 ml + 4 ml] arányban 30 % (tömegszázalékos) SDS-sel. Megmérik az oldat optikai sűrűségét (OD) 565 nm-nél.

A festékanyag-tartalom kiszámítása

28. Az OD-értékekből kiszámítják a korongonkénti szulforhodamin B festéktartalmat (9) (szulforhodamin B festék moláris extinkciós együtthatója 565 nm-en 8,7 × l04; molekulatömege 580 g). A festékanyag-tartalmat minden egyes bőrkorong esetében megfelelő kalibrációs görbe használatával meghatározzák, azután kiszámítják a párhuzamos vizsgálatok átlagos festékanyag-tartalmát.

Elfogadhatósági kritériumok

29. Az átlag TER-eredmények elfogadhatók, ha az egyidejű pozitív és negatív kontrollértékek a vizsgálati laboratóriumban a módszer elfogadható tartományába esnek. A fent leírt módszertanra és készülékre vonatkozó elfogadható ellenállás-tartományokat az alábbi táblázat tartalmazza:

Kontroll	Anyag	Ellenállás-tartomány (kΩ)
Pozitív	10 M sósav	0,5–1,0
Negatív	Desztillált víz	10–25

30. Az átlagos festékanyag-megkötési eredmények azzal a feltétellel fogadhatók el, hogy az egyidejű kontrollértékek a módszer elfogadható tartományába esnek. A fent leírt módszertan és készülék esetében a kontrollanyagok tekintetében javasolt elfogadható festéktartalom-tartományokat az alábbi táblázat tartalmazza:

Kontroll	Anyag	Festéktartalom tartománya (μg/korong)
Pozitív	10 M sósav	40–100
Negatív	Desztillált víz	15–35

Az eredmények értelmezése

31. A TER határértékét, amely megkülönbözteti a korrozív és a nem korrozív vizsgálati vegyi anyagokat, a vizsgálati módszer optimalizálása során állapították meg, egy elővalidálási szakaszban tesztelték, és egy hivatalos validálási vizsgálatban igazolták.

32. Az ENSZ GHS/CLP-rendelet osztályozási rendszeréhez kapcsolódó patkánybőr TER bőrkorróziós vizsgálati módszer előrejelzési modellje (9) (19) az alábbiak szerint alakul:

A vizsgálati vegyi anyag a bőrre nem korrozív hatású anyagnak tekintendő:

i. ha a vizsgálati vegyi anyagra kapott átlagos TER-érték nagyobb mint (>) 5 kΩ; vagy

ii. a vizsgálati vegyi anyagra kapott átlagos TER-érték kisebb vagy egyenlő (≤) 5 kΩ-mal, és

— a bőrkorongok nem mutatnak látható károsodást (pl. perforációt), és

— a korong átlagos festéktartalma kisebb (<) a 10 M HCl egyidejű pozitív kontrollnál megállapított átlagos bőrkorong-festéktartalomnál (a pozitív kontrollértékeket lásd a 30. pontban).

A vizsgálati vegyi anyagnak a bőrre korrozív hatása van:

i. ha a vizsgálati vegyi anyagra kapott átlagos TER-érték kisebb vagy egyenlő (≤) 5 kΩ-mal, és a bőrkorongok láthatóan károsodtak (pl. perforálódtak), vagy

ii. a vizsgálati vegyi anyagra kapott átlagos TER-érték kisebb vagy egyenlő (≤) 5 kΩ-mal, és

— a bőrkorongok nem mutatnak látható károsodást (pl. perforációt), de

— a korongok átlagos festéktartalma nagyobb vagy egyenlő (≥) a 10 M HCl egyidejű pozitív kontrollnál megállapított átlagos bőrkorong-festéktartalommal (a pozitív kontrollértékeket lásd a 30. pontban).

33. Ha a besorolás egyértelmű, legalább három bőrkorong replikátum vizsgálatából álló egyszeri vizsgálatmenetnek (kísérletnek) elegendőnek kell lennie az adott vizsgálati vegyi anyag esetében. Határértéken lévő eredmények esetében azonban, ha például az egyes bőrkorong replikátumok eredményei nem egyeznek és/vagy az átlagos TER-érték 5 ± 0,5 k, megfontolandó egy második független vizsgálatmenet (kísérlet) lefolytatása, illetve ha az első és a második vizsgálatmenet (kísérlet) eredményei különbözőek, egy harmadiké is.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

34. A vizsgálati vegyi anyagokra, valamint a pozitív és negatív kontrollokra vonatkozó rezisztenciaértékeket (kΩ) és adott esetben a festékanyag-tartalom értékeket (μg/korong) táblázatos formában kell megadni, beleértve minden vizsgálatmenet (kísérlet) során az egyes bőrkorong replikátumok esetében kapott adatokat és az átlagértékeket ± szórással. A jelentésbe bele kell foglalni valamennyi megismételt kísérletet. A bőrkorongok esetleges károsodását minden vizsgálati vegyi anyag esetében fel kell tüntetni.

Vizsgálati jelentés

35. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag és kontrollként szolgáló anyagok:

— Egy összetevőből álló anyag: kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján;

— Több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek: lehetőség szerint az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai alapján jellemezve;

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— eredet, gyártási szám, ha ismert;

— a vizsgálati vegyi anyag/kontrollanyag kezelése a vizsgálatot megelőzően, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, felhasználási határideje vagy ismételt elemzésének napja, ha ismert;

— tárolási feltételek.

Kísérleti állatok:

— a használt törzs és nem;

— az állatok kora, ha donorállatként használják azokat;

— az állatok származása, tartási körülmények, takarmány stb.;

— a bőrpreparátumra vonatkozó részletek.

Vizsgálati körülmények:

— a vizsgálati eszközökre vonatkozó kalibrációs görbék;

— a festékanyag-megkötő vizsgálat kiértékelésére vonatkozó kalibrációs görbék, az OD-értékek mérésekor használt sávszélesség és adott esetben a mérőeszköz (pl. a spektrofotométer) OD-linearitási tartománya;

— a TER-méréshez használt vizsgálati eljárás részletei;

— adott esetben a festékanyag-megkötő vizsgálatához használt vizsgálati eljárás részletei;

— az alkalmazott vizsgálati dózisok, az expozíciós időszak(ok) hossza és az expozíciós hőmérséklet(ek);

— az expozíciós időszak után alkalmazott mosási eljárás részletei;

— a vizsgálati vegyi anyagonként és kontrollonként (pozitív és negatív kontrollonként) használt bőrkorong replikátumok száma;

— a vizsgálati eljárás bármilyen változtatásának leírása;

— hivatkozás a modellel kapott korábbi adatokra. Ennek többek között az alábbiakat kell magában foglalnia:

i) a pozitív és negatív kontrollok (kΩ-ban megadott) TER-értékének elfogadhatósága, tekintettel a pozitív és negatív kontrollok ellenállás-tartományára;

ii) a pozitív és negatív kontrollok (μg/korongban megadott) festékanyag-tartalom értékének elfogadhatósága, tekintettel a pozitív és negatív kontrollok festékanyagtartalom-tartományára;

iii) a vizsgálati eredmények elfogadhatósága, tekintettel a bőrkorong replikátumok adatainak korábbiakban tapasztalt változékonyságára;

— az alkalmazott döntési kritériumok/előrejelzési modell leírása.

Eredmények:

— A TER és a festékanyag-megkötő vizsgálat adatainak (ha releváns), ezek átlagának, szórásának (SD) és variációs koefficiensének (CV) táblázatba foglalása az egyes vizsgálati vegyi anyagokra és kontrollanyagokra, minden egyes vizsgálatmenetre (kísérletre) és valamennyi bőrkorong replikátumra (minden egyes állatra és minden egyes bőrmintára) vonatkozólag;

— bármilyen megfigyelt jelenség leírása;

— az alkalmazott előrejelzési modellel/döntési kritériumokkal összhangban kialakított osztályozás.

Az eredmények értékelése

Következtetések

SZAKIRODALOM

(1) Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Elérhető a következő címen:[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

(2) E melléklet B.4., Akut bőrirritáció/bőrkorrózió fejezete.

(3) E melléklet B.40bis, *In vitro* bőrmodell fejezete.

(4) E melléklet B.65., *In vitro* Membrán barrier vizsgálati módszer fejezete.

(5) E melléklet B.46., *In vitro* bőrirritáció: Rekonstruált emberi felhámmodellen végzett vizsgálati módszer című fejezete.

(6) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6.*ATLA* 23, 219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.In vitro* 12, 471-482.

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic.In vitro*12, 483-524.

(10) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H., and Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops.*ATLA*23, 129-147.

(11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(12) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneos Electrical Resistance (TER) Test (an *In vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.

(13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275–280.

(14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(15) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 218. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., and Rhodes C. (1986). An *In vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. Fd. Chem. *Toxicol.*24, 507-512.

(17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., and Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In vitro:* Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol. In vitro* 6,191-194.

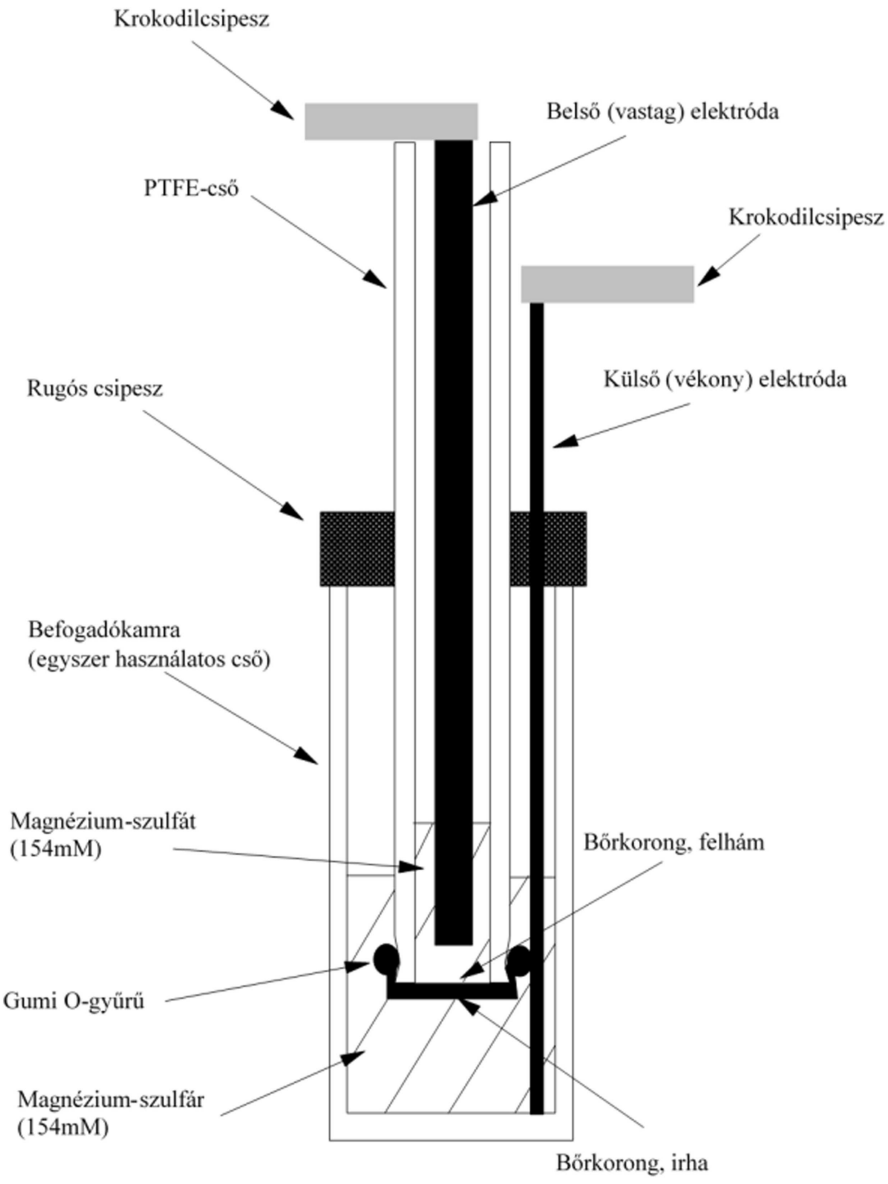
(18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. and Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol.Pharmacol.* 62, 393-403.

(19) TER SOP (December 2008). *INVITTOX* Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.

(20) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

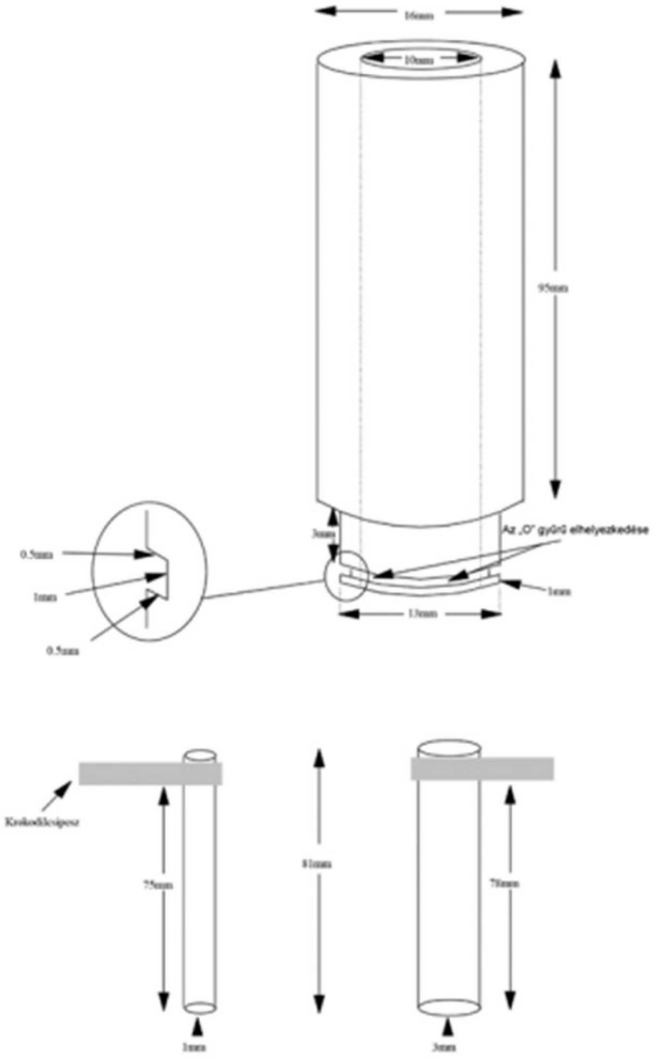
1. ábra

A Patkánybőr Ter-Vizsgálatára Szolgáló Műszer



2. ábra

Az Alkalmazott Politetrafluoroetiléncső (Ptfe-cső) És Befogadó Cső, Valamint Az Elektródák Méretei



A fent ábrázolt eszközök legfontosabb elemei:

— a PTFE-cső belső átmérője,

— az elektródák PTFE-csőhöz és befogadó csőhöz viszonyított hosszúsága olyan legyen, hogy az elektródák ne érintkezzenek a bőrkoronggal, és hogy állandó hosszúságú elektróda legyen az $MgSO_4$-oldatban,

— az $MgSO_4$-oldat befogadó csőben lévő mennyisége a PTFE-csőben lévő szinthez viszonyítva adjon egy bizonyos folyadékmélységet, ahogyan azt az 1. ábra mutatja,

— a bőrkorongot kellő erősséggel kell a PTFE-csőhöz rögzíteni úgy, hogy az elektromos ellenállás a bőr tulajdonságaira vonatkozóan valós értéket adjon.

Függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: a vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. E kifejezést gyakran használják az »egyezés« megfelelőjeként, amely egy adott vizsgálati módszer alkalmazásakor az azonos eredmények arányát fejezi ki (20).

K: korrozív.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Egyezés: a kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. A kifejezést esetenként használják a pontosság megfelelőjeként, és úgy határozzák meg, mint a helyesen pozitívként vagy negatívként besorolt összes vizsgálati vegyi anyag aránya. Az egyezés nagy mértékben függ a vizsgálat tárgyát képező vizsgálati vegyi anyag típusaiban előforduló pozitív eredmények gyakoriságától (20).

GHS (a vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az ENSZ által globálisan harmonizált rendszere): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (1).

IATA: integrált vizsgálati és értékelési megközelítés.

Keverék: két vagy több anyagot tartalmazó elegy vagy oldat.

Egy összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben az egyik fő összetevő legalább 80 tömegszázalékban van jelen.

Több összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben egynél több fő összetevő legalább 10 tömegszázalékban, de 80 tömegszázalékot nem meghaladó koncentrációban van jelen. A több összetevőből álló anyag gyártási folyamat eredménye. A keverék és a több összetevőből álló anyag között az a különbség, hogy a keverék két vagy több anyag összekeverésével, kémiai reakció nélkül jön létre. A több összetevőből álló anyag kémiai reakció eredménye.

NK: nem korrozív.

OD: optikai sűrűség.

Pozitív kontroll: a vizsgálati elrendezés valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó anyaggal kezelt rendszer. Annak biztosítása érdekében, hogy a pozitív kontrollban jelentkező hatás időbeli változását fel lehessen mérni, a pozitív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Teljesítményszabványok: hitelesített referenciamódszeren alapuló szabványok, amelyek a javasolt, végrehajtás és funkcionalitás szempontjából hasonló vizsgálati módszer összehasonlíthatósági értékelésének alapjául szolgálnak. Ide tartoznak: i. a vizsgálati módszer alapvető összetevői; ii. a referencia-vegyianyagok minimális jegyzéke, amely a validált vizsgálati módszer által nyújtott teljesítmény elfogadhatóságának igazolására használt vegyi anyagokból került összeállításra; és iii. a validált vizsgálati módszer eredményei alapján meghatározott, hasonló megbízhatósági és pontossági szintek, amelyeket a javasolt vizsgálati módszernek teljesítenie kell a minimális jegyzék referencia-vegyianyagainak felhasználásával történő értékelése során.

Relevancia: a vizsgálati módszer és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálati módszer mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálati módszer pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (20).

Megbízhatóság: a vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. A laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság kiszámításával állapítják meg (20).

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálati módszer helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (20).

In vivo *bőrkorrózió*:: a vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően négy órán belül megjelenő, visszafordíthatatlan bőrkárosodás, azaz a felhámon át az irhára is átterjedő látható szövetelhalás. A korróziós tünetek jellemzően fekély, vérzés, véres hegesedés és – 14 napos megfigyelés végén – a bőr kifehéredése miatt elszíneződés, teljes szőrhullásos területek és hegek. A kérdéses lézió értékeléséhez figyelembe kell venni a kórszövettant.

Specificitás: a vizsgálati módszerrel helyesen besorolt összes negatív/inaktív vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (20).

Anyag: olyan természetes állapotban előforduló vagy gyártási eljárásból származó kémiai elem és vegyületei, amely a stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagot és az alkalmazott eljárásból származó szennyező anyagokat is tartalmazhat, de nem tartalmaz olyan oldószert, amely az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltoztatása nélkül elkülöníthető.

Vizsgálatmenet: egyetlen vizsgálati vegyi anyag egyidejű tesztelése legalább három bőrkorong replikátumon.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Transzkután elektromos rezisztencia (TER): a bőr elektromos rezisztenciájának mérése rezisztenciaértékként, kiloohmban kifejezve. A barrierfunkció vizsgálatának egy egyszerű és nagy teljesítményű módszere, amely során az ionok bőrön történő passzálását egy Wheatstone-híd segítségével rögzítik.

UVCB:: ismeretlen vagy változó összetételű anyagok, valamint komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok.”

6. A B. részben a B.40bis. fejezet helyébe a következő szöveg lép:

„B.40bis. ***IN VITRO* BŐRKORRÓZIÓ: REKONSTRUÁLT EMBERI FELHÁMMODELLEN VÉGZETT VIZSGÁLATI MÓDSZER**

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 431. vizsgálati iránymutatásában (2016) leírt módszerrel. A bőrkorrózió valamely vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően megjelenő, visszafordíthatatlan bőrkárosodás, amely a felhámon át az irhára is átterjedő látható szövetelhalást okoz [az Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) által kidolgozott, vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszerében (GHS) (1), valamint az Európai Unió (EU) anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendeletében (CLP-rendelet) ([1]) meghatározottak szerint]. Ez a továbbfejlesztett B.40bis. vizsgálati módszer olyan *in vitro* eljárást biztosít, amely lehetővé teszi a korróziót nem okozó és korróziót okozó anyagok és keverékek ENSZ GHS és CLP-rendelet szerinti meghatározását. Emellett lehetővé teszi a korrozív anyagok részleges alkategorizálását.

2. A vegyi anyagok bőrkorróziós hatásának felmérése jellemzően kísérleti állatokon történő vizsgálatot foglal magában (az OECD eredetileg 1981-ben elfogadott, majd 1992-ben, 2002-ben és 2015-ben felülvizsgált 404. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű B.4. vizsgálati módszer alkalmazásával) (2). E B.40bis. vizsgálati módszer mellett a vegyi anyagok bőrkorróziós hatásának vizsgálatára szolgáló két másik *in vitro* vizsgálati módszert is validáltak és elfogadtak, a B.40. vizsgálati módszert (amely az OECD 430. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű) (3) és a B.65. vizsgálati módszert (amely az OECD 435. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű) (4). A potenciális bőrirritációs hatás felmérésére pedig elfogadták az *in vitro* B.46. vizsgálati módszert (mely az OECD 439. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű) (5). A bőrkorróziós és bőrirritációs vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről (IATA) szóló OECD-iránymutatás több, információforrásokat és adatelemző eszközöket csoportosító modult ismertet, továbbá iránymutatást nyújt arra nézve, i. hogyan integrálhatók és használhatók az ismert vizsgálati és nem vizsgálati eredetű adatok a vegyi anyagok potenciális bőrirritációs és bőrkorróziós hatásainak felmérésére, és ii. javaslatot tesz egy, a további vizsgálatok szükségessége esetén alkalmazható megközelítésre (6).

3. Ez a vizsgálati módszer a bőrkorrózióval mint az emberi egészség károsodásának egyik végpontjával foglalkozik. A módszerben (nem transzformált emberi epidermális keratinsejtekből felépített) rekonstruált emberi felhámot (RhE) alkalmaznak, amely nagy hasonlósággal modellezi az emberi bőr felső rétegének, azaz a felhámnak (epidermisznek) szövettani, morfológiai, biokémiai és fiziológiai tulajdonságait. A módszerrel egyenértékű, eredetileg 2004-ben elfogadott OECD-iránymutatás 2013-as átdolgozott változatába belefoglalták az RhE-modellt használó további vizsgálati módszereket és annak lehetőségét, hogy a módszereket a korrozív vegyi anyagok alkategóriába sorolására is alkalmazzák, 2015-ös átdolgozott kiadása pedig kitér az IATA-iránymutatásra és bevezet egy, az életképesség mérésére szolgáló alternatív eljárást.

4. E vizsgálati módszer négy validált, kereskedelmi forgalomban kapható RhE-modellt foglal magában. A kereskedelmi forgalomban beszerezhető vizsgálati modellek közül kettőn – az EpiSkin™ alapmodellen (SM) és az EpiDerm™ bőrkorróziós vizsgálaton (SCT) (EPI-200) – elővalidálási vizsgálatokat végeztek (7), majd ezt követően a bőrkorrózió értékelésére szolgáló hivatalos validálási vizsgálatot (8) (9) (10) is elvégezték (11) (12) (a továbbiakban validált referenciamódszerek, VRM-ek néven is hivatkozunk rájuk). E vizsgálatok következtetései vezettek ahhoz az ajánláshoz, hogy a fent említett két validált referenciamódszer használható a korrozív (K) és nem korrozív (NK) anyagok szabályozási célú megkülönböztetésére, valamint hogy az EpiSkin™ emellett a korrozív anyagok alkategóriába sorolására is alkalmazható (13) (14) (15). A teljesítményszabványok szerinti validálás alapján két másik kereskedelmi forgalomban kapható *in vitro* bőrkorróziós RhE vizsgálati modell mutatott az EpiDerm™ validált referenciamódszerhez hasonló eredményeket (16) (17) (18). Ez a két modell a SkinEthic™ RHE ([2]) és az epiCS® (korábbi nevén EST-1000), amelyek szintén használhatók a korrozív és nem korrozív anyagok szabályozási célú megkülönböztetésére (19) (20). A rekonstruált emberi felhámmodellek gyártói a validálást követően, 2012 és 2014 között vizsgálatokat végeztek egy továbbfejlesztett protokoll alapján, amely korrigálta a vizsgálati vegyi anyagok nem specifikus MTT-redukáló hatására visszavezethető interferenciákat, javítva ezáltal a modellek teljesítményét mind a korrozív/nem korrozív anyagok megkülönböztetése, mind a korrozív anyagok alkategóriába sorolása terén (21) (22). Az EpiDerm™ SCT, a SkinEthic™ RHE és az EpiCS® validálás utáni alkalmazása során nyert adatok statisztikai elemzése révén olyan alternatív előrejelzési modelleket azonosítottak, amelyek javították az alkategóriába sorolási előrejelző képességet (23).

([1]) Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról (HL L 353/1., 2008.12.31.).

([2]) Az RhE (= rekonstruált emberi felhám) rövidítés az összes RhE-technológián alapuló modell esetében használatos. A SkinEthic™ modellel összefüggésben használt RHE rövidítésnek ugyanaz a jelentése, de mivel az a szóban forgó vizsgálati módszer kereskedelmi nevének része, nagybetűvel írandó.

5. Mielőtt az *in vitro* RhE bőrkorróziós vizsgálati módszerhez hasonló vagy ahhoz képest módosított, a validált referenciamódszerektől eltérő javasolt módszer szabályozási célú alkalmazásra kerülne, a validált referenciamódszerekhez való hasonlóságának biztosítása érdekében az OECD 34. iránymutatásában lefektetett elvekkel (25) összhangban létrehozott teljesítményszabványok (24) követelményeinek megfelelően meg kell határozni a javasolt felhasználása tekintetében fennálló megbízhatóságát, relevanciáját (pontosságát) és korlátait. Az adatok kölcsönös elfogadása csak azután garantált, hogy a javasolt új vagy átdolgozott vizsgálati módszert a teljesítményszabványok szerint felülvizsgálták és belefoglalták a megfelelő vizsgálati iránymutatásba. A vizsgálati iránymutatásban szereplő vizsgálati modellek felhasználhatók az *in vitro* bőrkorróziós vizsgálati módszer vizsgálati eredményeire vonatkozó nemzeti követelmények kialakításához, ugyanakkor biztosítják az adatok kölcsönös elfogadásának előnyeit.

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

6. Az alkalmazott fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatók.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK

7. Ez a vizsgálati módszer lehetővé teszi a nem korrozív és korrozív anyagok és keverékek ENSZ GHS és CLP-rendelet szerinti azonosítását. A vizsgálati módszer emellett támogatja a korrozív anyagok és keverékek nem kötelező jellegű besorolását az ENSZ GHS (1) szerinti 1A alkategóriába, valamint egy kombinált 1B és 1C alkategóriába (21) (22) (23). A vizsgálati módszer egyik korlátja, hogy az 1C alkategóriába sorolt, ismert *in vivo* korrozív vegyi anyagok csekély száma miatt nem teszi lehetővé a bőrkorróziós 1B alkategória és 1C alkategória ENSZ GHS és CLP-rendelet szerinti megkülönböztetését. Az EpiSkin™, az EpiDerm™ SCT, a SkinEthic™ RHE és az epiCS® vizsgálati modellekkel elvégezhető az alkategóriába sorolás (vagyis 1A vagy 1B és 1C vagy nem korrozív (NK)).

8. A vizsgálati módszerben szereplő, a nem korrozív és korrozív anyagok azonosítására alkalmazott, vizsgálati modelleket alátámasztó validálás során igen sokféle, többségében különálló anyagokat képviselő vegyi anyagot vizsgáltak; a validálási vizsgálat empirikus adatbázisa összesen 60 vegyi anyagot tartalmazott, amelyek lefedik a kémiai osztályok széles körét (8) (9) (10). A vizsgálati módszer kidolgozói vizsgálták a módszer alkategóriába sorolásra való alkalmazásához kapcsolódó érzékenységét, specificitását, pontosságát és laboratóriumon belüli megismételhetőségét, e vizsgálatok eredményét az OECD felülvizsgálta (21) (22) (23). Az összes rendelkezésre álló adat alapján a vizsgálati módszer a legkülönbözőbb kémiai osztályokra és halmazállapotokra, azon belül folyadékokra, félszilárd, szilárd és viaszos állagú anyagokra alkalmazható. A folyadékok lehetnek vizesek vagy nem vizesek; a szilárd anyagok lehetnek vízben oldódóak vagy oldhatatlanok. Ahol megoldható, a szilárd anyagokat alkalmazásuk előtt finom porrá kell őrölni; a mintát előzetesen nem szükséges más módon kezelni. Olyan esetekben, amikor bizonyítékkal igazolható, hogy a vizsgálati módszer keretében alkalmazott vizsgálati modellek nem használhatók valamely konkrét vegyianyag-kategóriára, a vizsgálati modelleket nem szabad az adott vegyianyag-kategóriára alkalmazni. E vizsgálati módszerről feltételezhető továbbá, hogy az anyagokra való alkalmazhatóságának kiterjesztéseként keverékekre is alkalmazható. Mivel azonban a keverékek kategóriák és összetételek széles körét fedik le, és jelenleg kevés információ áll rendelkezésre a keverékek vizsgálatára vonatkozóan, azokban az esetekben, amikor bizonyítékkal igazolható, hogy a vizsgálati módszer valamely konkrét keverékkategóriára nem alkalmazható (pl. a (26) szakirodalomban javasolt stratégia alapján), a vizsgálati módszer az adott keverékkategóriára nem alkalmazható. A vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény. Gázokat és aeroszolokat hitelesítési vizsgálat keretében még nem vizsgáltak (8) (9) (10). Bár elképzelhető, hogy ezek is vizsgálhatók a rekonstruált emberi felhámmodelles technikával, a jelenlegi vizsgálatimódszer-leírás nem engedi meg gázok és aeroszolok vizsgálatát.

9. Azok a vizsgálati vegyi anyagok, amelyek ugyanabban a tartományban nyelik el a fényt, mint az MTT-formazán, és azok a vizsgálati vegyi anyagok, amelyek közvetlenül is képesek redukálni az MTT vitális festéket (MTT-formazánná), befolyásolhatják a szövet életképességének mérését, ennek korrigálása érdekében adaptált kontrollokra van szükség. Az esetlegesen szükséges adaptált kontrollok típusa függ a vizsgálati vegyi anyag által előidézett interferencia típusától és az MTT-formazán méréséhez használt eljárástól (lásd a 25–31. pontot).

10. Ez a vizsgálati módszer ugyan nem biztosít megfelelő információkat a bőrirritáció felméréséhez, de az RhE vizsgálati rendszeren alapuló B.46. vizsgálati módszer célja kifejezetten az, hogy *in vitro* eljárással határozza meg a bőrirritáció egészségügyi hatását, noha más protokoll alkalmazásával (5). Egyetlen bőrexpozíció után a bőrt ért helyi hatások teljes kiértékeléséhez a vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről szóló OECD-iránymutatást kell tanulmányozni (6). Ezen integrált vizsgálati és értékelési megközelítés szerint *in vitro* bőrkorróziós vizsgálatokat (mint az ebben a vizsgálati módszerben leírtak) és bőrirritációs vizsgálatokat kell lefolytatni mielőtt az élő állatokon végzett vizsgálatokat fontolóra lehetne venni. Elfogadott tény, hogy az emberi bőr használatára nemzeti és nemzetközi etikai megfontolások és feltételek vonatkoznak.

A VIZSGÁLAT ELVE

11. A vizsgálati vegyi anyagot egy olyan nem transzformált emberi epidermális keratinocitákat tartalmazó, háromdimenziós rekonstruált emberi felhámmodellre viszik fel topikálisan, amelyeket úgy tenyésztettek ki, hogy többrétegű, erősen differenciált emberi felhámot (epidermiszt) alkossanak. Ez szervezett bazális, spinózus és granuláris sejtrétegekből, valamint intercelluláris lamelláris lipidrétegeket tartalmazó többrétegű szarurétegből (*stratum corneum*) áll, amely tartalmazza a fő lipid osztályokat, amelyek analógok az *in vivo* megtalálhatókkal.

12. Az RhE vizsgálati módszer azon az előfeltételen alapul, hogy a korrozív vegyi anyagok diffúzióval vagy erózióval képesek áthatolni a *stratum corneum*on, és az alatta lévő sejtrétegekre citotoxikus hatást gyakorolnak. A sejtek életképességét az MTT [3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid, tiazolil kék tetrazólium-bromid; CAS-száma: 298–93–1)] vitális festék enzimatikus úton kék formazán kristállyá történő átalakulása alapján mérik, amelyet a szövetekből történő kivonás után mennyiségileg meghatároznak (27). A korrozív hatású vegyi anyagokat azon képességük alapján azonosítják, hogy a sejtek életképességét meghatározott határérték alá csökkentik (lásd a 35. és a 36. pontot). Az RhE-alapú bőrkorróziós vizsgálati módszerről kimutatták, hogy képes előrejelezni a B.4. vizsgálati módszer (2) alapján nyulakon meghatározott *in vivo* bőrkorróziós hatásokat.

A JÁRTASSÁG BIZONYÍTÁSA

13. Az e vizsgálati módszerhez kapcsolódó négy validált RhE vizsgálati modell rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak a 1. táblázatban felsorolt tizenkét jártassági tesztanyag megfelelő besorolásával igazolniuk kell szakmai jártasságukat. Valamely módszer alkategóriába sorolás céljára történő használta esetén bizonyítani kell az alkategóriák megfelelő meghatározásában való jártasságot is. Ha a jegyzékben szereplő valamely anyag nem áll rendelkezésre, illetve ha indokolható, megfelelő *in vivo* és *in vitro* referenciaadatokkal rendelkező más – például a referencia-vegyianyagok jegyzékében feltüntetett (24) – anyag is használható, amennyiben a kiválasztási kritériumok megegyeznek az 1. táblázatban foglaltakkal.

1. táblázat

A jártassági tesztanyagok jegyzéke [1]

Anyag	CAS-szám	Kémiai osztály [2]	ENSZ GHS/CLP szerinti, *in vivo* eredményeken alapuló kat. [3]	VRM szerinti, *in vitro* eredményeken alapuló kat. [4]	MTT-redukáló [5]	Halmaz-állapot
1A alkategóriájú *in vivo* korrozív anyagok						
Brómecetsav	79-08-3	Szerves sav	1A	(3) 1A	—	Sz
Bór-trifluorid-dihidrát	13319-75-0	Szervetlen sav	1A	(3) 1A	—	F
Fenol	108-95-2	Fenol	1A	(3) 1A	—	Sz
Diklór-acetil-klorid	79-36-7	Elektrofil	1A	(3) 1A	—	F
Kombinált 1B–1C alkategóriájú *in vivo* korrozív anyagok						
Glioxilsav-monohidrát	563-96-2	Szerves sav	1B–1C	(3) 1B–1C	—	Sz

Anyag	CAS-szám	Kémiai osztály ([2])	ENSZ GHS/CLP szerinti, *in vivo* eredményeken alapuló kat. ([3])	VRM szerinti, *in vitro* eredményeken alapuló kat. ([4])	MTT-redukáló ([5])	Halmaz-állapot
1A alkategóriájú *in vivo* korrozív anyagok						
Tejsav	598-82-3	Szerves sav	1B–1C	(3) 1B–1C	—	F
Etanolamin	141-43-5	Szerves bázis	1B	(3) 1B–1C	I	Viszkózus
Sósav (14,4 %)	7647-01-0	Szervetlen sav	1B–1C	(3) 1B–1C	—	F
In vivo Nem korrozív anyagok						
Fenetil-bromid	103-63-9	Elektrofil	NK	(3) NK	I	F
4-Amino-1,2,4-triazol	584-13-4	Szerves bázis	NK	(3) NK	—	Sz
4-(metil-tio)-benzaldehid	3446-89-7	Elektrofil	NK	(3) NK	I	F
Laurinsav	143-07-7	Szerves sav	NK	(3) NK	—	Sz

Rövidítések: CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám; VRM = Validált referenciamódszer; NK = Nem korrozív; I = Igen; Sz = szilárd; F = folyékony

([1]) A jártassági tesztanyagok – amelyek felsorolása elsőként korrozív és nem korrozív hatásuk szerint, majd korrozivitási alkategóriák szempontjából, végül pedig kémiai osztályuk alapján történt – az ECVAM által az EpiSkin™ és az EpiDerm™ modellről készített validálási vizsgálatokban használt anyagok közül (8) (9) (10), valamint az EpiSkin™ (22), az EpiDerm™, a SkinEthic™ és az epiCS® előállítói által rendelkezésre bocsátott adatok alapján végzett validálás utáni vizsgálatokból (23) kerültek kiválasztásra. Ha nincs másképpen feltüntetve, az anyagokat a kereskedelmi forrásból való beszerzésükkor tapasztalt tisztasági szinten vizsgálták (8) (10). A lehetőségekhez mérten olyan anyagok kerülnek kiválasztásra, amelyek: i. a validált referenciamódszerek által mérhető vagy előrevetíthető korrozivitási válaszreakciók tartományának tekintetében reprezentatívak (pl. nincs korrozív hatásuk; enyhétől az erősig terjedő korróziós hatást váltanak ki); ii. a validálási vizsgálatokban használt kémiai osztályok tekintetében reprezentatívak; iii. jól meghatározott kémiai szerkezettel rendelkeznek; iv. megismételhető eredményeket váltanak ki a validált referenciamódszerben; v. egyértelmű eredményeket hoznak az *in vivo* referencia vizsgálati módszer alkalmazásakor; vi. kereskedelmi forgalomban kaphatók; és vii. nem kapcsolódnak hozzájuk kiemelkedően magas ártalmatlanítási költségek.

([2]) A Barratt és társai szerinti kémiai osztály (8).

([3]) Az ENSZ GHS/CLP-rendelet szerinti 1A, 1B és 1C kategóriának az ENSZ I., II. és III. csomagolási csoportja felel meg.

([4]) A validált referenciamódszer táblázatban szereplő *in vitro* előrejelzései a vizsgálati módszer kidolgozói által az EpiSkin™ és az EpiDerm™ vizsgálati modellekkel végzett, validálást követő vizsgálatokból származnak.

([5]) Az ECVAM bőrkorróziós validálási vizsgálataiból származó életképességi értékek esetében nem korrigálták a közvetlen MTT-redukáló hatást (a validálási vizsgálatok során nem végeztek kontrollt elhalt szöveteken). Viszont a táblázatban feltüntetett, a vizsgálati módszer kidolgozóitól származó validálás utáni adatokat adaptált kontrollvizsgálatok alkalmazásával nyerték (23).

14. A jártasság igazolásának részeként ajánlott, hogy a felhasználó a rekonstruált emberi felhámmodell előállítója által meghatározottak szerint, átvétel után ellenőrizze a szövetek barrierjellemzőit. Ez különösen fontos, ha a szöveteket nagy távolságra/hosszú ideig szállították. Ha egy vizsgálati módszert már sikeresen igazoltak, és az alkalmazásában való jártasságot bizonyították, ilyen jellegű ellenőrzéseket nem szükséges rutinszerűen végezni. Ha azonban egy vizsgálati módszert rutinszerűen alkalmaznak, a barrierjellemzőket javasolt továbbra is rendszeres időközönként ellenőrizni.

ELJÁRÁS

15. Az alábbiak általános leírását adják a vizsgálati módszer keretében alkalmazott, a bőrkorrózió felmérésére szolgáló RhE vizsgálati modellek összetevőinek és eljárásainak. Azok a rekonstruált emberi felhámmodellek, amelyeknek e vizsgálati módszer keretében történő használatát tudományosan megalapozottként elfogadták – vagyis az EpiSkin™ (SM), az EpiDerm™ (EPI-200), a SkinEthic™ RHE és az epiCS® modellek (16) (17) (19) (28) (29) (30) (31) (32) (33) – kereskedelmi forgalomban beszerezhetők. E négy rekonstruált emberi felhámmodellhez rendelkezésre állnak szabványműveleti eljárások (34) (35) (36) (37), vizsgálati módszerük főbb összetevőit pedig a 2. melléklet foglalja össze. E modellek bármelyikének laboratóriumi kivitelezése és alkalmazása során tanácsos tanulmányozni a vonatkozó szabványműveleti eljárást. Az ehhez a vizsgálati módszerhez tartozó négy rekonstruált emberi felhámmodellel végzett vizsgálatoknak az alábbi feltételeknek kell megfelelniük:

A RHE VIZSGÁLATI MÓDSZER ÖSSZETEVŐI

Általános feltételek

16. Az epitélium felépítéséhez nem transzformált emberi keratinocita sejteket kell használni. Élő epitélsejtek több rétegének (bazális réteg, *stratum spinosum, stratum granulosum*) kell jelen lennie a funkcionális *stratum corneum* alatt. A *stratum corneum*nak többrétegűnek kell lennie, és tartalmaznia kell az elengedhetetlenül szükséges lipidprofilt, hogy nagy ellenálló képességgel rendelkező funkcionális barriert képezzen a citotoxikus referencia-vegyianyagok, pl. a nátrium-dodecil-szulfát (SDS) vagy a Triton X-100 gyors áthatolása ellen. A barrierfunkciót bizonyítani kell, ennek értékeléséhez meghatározható az a referencia-vegyianyag koncentráció, amely meghatározott idejű expozíciót követően 50 %-kal csökkenti a szövetek életképességét (IC_{50}), vagy az az expozíciós idő, amely alatt egy adott, állandó koncentrációjú referencia-vegyianyag hatására a sejtek életképessége 50 %-kal csökken (ET_{50}) (lásd a 18. pontot). A rekonstruált emberi felhámmodell folyadékzáró tulajdonságainak meg kell akadályozni, hogy az anyag passzáljon a *stratum corneum* körül az élő szövetbe, amely a bőr expozíciójának rossz modellezését eredményezné. A rekonstruált emberi felhámmodellnek baktérium-, vírus-, mikoplazma- és gombafertőzéstől mentesnek kell lennie.

Funkcionális feltételek

Életképesség

17. A szövetek életképességének számszerű mérése MTT-vizsgálattal történik (27). A rekonstruált emberi felhám szövetkonstrukciójának élő sejtjei az MTT vitális festéket kék MTT-formazán kicsapódássá redukálják, amelyet azután izopropanol (vagy hasonló oldószer) használatával kivonnak a szövetből. Az extraháló oldószer optikai sűrűségének (OD) eléggé alacsonynak, azaz 0,1 alattinak kell lennie. A kivont MTT-formazán mennyisége meghatározható hagyományos abszorbancia (OD) méréssel vagy HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárással (38). A rekonstruált emberi felhámmodell felhasználóinak biztosítaniuk kell, hogy az alkalmazott RhE-modell minden egyes tétele megfeleljen a negatív kontrollra vonatkozóan meghatározott kritériumoknak. A rekonstruált emberi felhámmodell előállítójának/forgalmazójának meg kell határoznia a negatív kontroll OD-értékének elfogadhatósági tartományát (alsó és felső határértékét). A vizsgálati módszerhez kapcsolódó négy validált RhE vizsgálati modell negatív kontrolljának OD-értékére vonatkozó elfogadhatósági tartományokat a 2. táblázat tartalmazza. Az HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárást használóknak a negatív kontroll elfogadhatósági kritériumaként a 2. táblázatban szereplő negatív kontrollra vonatkozó OD-tartományok szolgálnak. Dokumentálni kell, hogy a negatív kontrollal kezelt szövetek az expozíció időtartama alatt stabil tenyészetben vannak (hasonló OD-értékeket adnak).

2. táblázat

A negatív kontroll OD-értékének elfogadhatósági tartománya a tétel minőségének ellenőrzéséhez

	Alsó elfogadási határ	Felső elfogadási határ
EpiSkin™ (SM)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

Barrierfunkció

18. A *stratum corneum*nak és lipidprofiljának az IC_{50} vagy ET_{50} alapján végzett becslések szerint (3. táblázat) megfelelő ellenálló képességgel kell rendelkeznie ahhoz, hogy meg tudja akadályozni bizonyos citotoxikus referencia-vegyianyagok (pl. a nátrium-dodecil-szulfát (SDS) vagy a Triton X-100) gyors áthatolását. Az RhE-modell előállítójának/forgalmazójának, a szövetek végfelhasználóhoz történő kiszállításakor igazolnia kell az alkalmazott rekonstruált emberi felhámmodell minden egyes tételének barrierfunkcióját (lásd a 21. pontot).

Morfológia

19. A rekonstruált emberi felhámmodellen szövettani vizsgálatot kell végezni, amely igazolja a többrétegű – bazális, spinózus és granuláris sejtrétegekből (*stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum*) és szarurétegből (*stratum corneum*) álló – humán epidermiszszerű szerkezetet, valamint azt, hogy a modell lipidprofilja hasonlatos az emberi felhám lipidprofiljához. Az RhE-modell előállítójának/forgalmazójának, a szövetek végfelhasználóhoz történő eljuttatásakor az alkalmazott rekonstruált emberi felhámmodell minden tételén szövettani vizsgálattal igazolnia kell a szövetek megfelelő morfológiáját (lásd a 21. pontot).

Reprodukálhatóság

20. A vizsgálati módszer felhasználóinak pozitív és negatív kontrollokkal igazolniuk kell a vizsgálati módszerek időbeli reprodukálhatóságát. Emellett a vizsgálati módszer kizárólag alkalmazható, ha az RhE-modell előállítója/forgalmazója adatokkal támasztja alá, hogy a módszer – pl. a jártassági tesztanyagok jegyzékében (1. táblázat) szereplő – korrozív és nem korrozív vegyi anyagokkal időben megismételhető. Valamely vizsgálati módszer alkategóriába sorolás céljára történő alkalmazása esetén a megismételhetőséget az alkategóriába sorolás tekintetében is bizonyítani kell.

Minőség-ellenőrzés

21. A rekonstruált emberi felhámmodell csak abban az esetben alkalmazható, ha előállítója/forgalmazója igazolja, hogy az alkalmazott RhE-modell minden egyes tétele megfelel a gyártás utáni felszabadításra vonatkozóan meghatározott feltételeknek, amelyek közül az életképességre (17. pont), a barrierfunkcióra (18. pont) és a morfológiára (19. pont) vonatkozó kritériumok a leglényegesebbek. Ezeket az adatokat a vizsgálati módszer felhasználóinak rendelkezésére kell bocsátani, hogy ezeket az információkat fel tudják tüntetni a vizsgálati jelentésben. A korrozív hatás besorolásának megbízható előrejelzéseként kizárólag minőség-ellenőrzésen elfogadott szövettételeken végzett vizsgálatok eredményei fogadhatók el. Az IC50 és az ET50 eljárás elfogadhatósági tartományát (alsó és felső határértékét) a rekonstruált emberi felhámmodell előállítójának/forgalmazójának kell meghatároznia. A négy validált vizsgálati modell elfogadhatósági tartományát a 3. táblázat ismerteti.

3. táblázat

Minőség-ellenőrzési tételfelszabadítás feltételei

	Alsó elfogadási határ	Felső elfogadási határ
EpiSkin™ (SM) (18 órás kezelés nátrium-dodecil-szulfáttal (SDS)) (33)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (34)	ET50 = 4,0 óra	ET50 = 8,7 óra
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (35)	ET50 = 4,0 óra	ET50 = 10,0 óra
epiCS® (1 % Triton X-100) (36)	ET50 = 2,0 óra	ET50 = 7,0 óra

A vizsgálati vegyi anyag és a kontrollként szolgáló vegyi anyagok alkalmazása

22. Minden expozíciós időszak során valamennyi vizsgálati vegyi anyaghoz és kontrollhoz legalább két szövetreplikátumot kell használni. Folyékony és szilárd vegyi anyagok esetében egyaránt megfelelő mennyiségű vizsgálati vegyi anyagot kell alkalmazni, hogy az egyenletesen fedje az epidermisz felszínét, azaz minimum 70 µl/cm^2 vagy 30 mg/cm^2-t, ugyanakkor el kell kerülni a végtelen dózis alkalmazását. Modelltől függően szilárd vegyi anyagok alkalmazása előtt az epidermisz felületét ionmentesített vagy desztillált vízzel be kell nedvesíteni, hogy jobb legyen az érintkezés a vizsgálati vegyi anyag és az epidermisz felszíne között (34) (35) (36) (37). A szilárd anyagokat, amikor csak lehetséges finom por alakban kell vizsgálni. A felvitel módjának meg kell felelnie a

vizsgálati vegyi anyagnak (lásd például a 34–37. referenciát). Az expozíciós időszak lejártával a vizsgálati vegyi anyagot vizes alapú pufferrel vagy 0,9 %-os NaCl-dal óvatosan le kell mosni az epidermisz felületéről. Attól függően, hogy a négy validált RhE vizsgálati modell közül melyiket használják, vizsgálati vegyi anyagonként két vagy három expozíciós időszak alkalmazandó (mind a négy validált rekonstruált emberi felhámmodell esetében: 3 perc és 1 óra; az EpiSkin™ esetében plusz egy 4 órás expozíciós időszak). Az alkalmazott RhE vizsgálati modell és a meghatározott expozíciós időszak függvényében az expozíció alatti inkubációs hőmérséklet szobahőmérséklet és 37 °C között változhat.

23. Minden vizsgálatmenetben párhuzamos negatív és pozitív kontrollokkal bizonyítani kell, hogy a szövetek életképessége (negatív kontrollokkal), barrierfunkciója és az abból fakadó érzékenysége (pozitív kontrollokkal) egy meghatározott dokumentált elfogadhatósági tartományba esik. A javasolt pozitív kontrollanyag az alkalmazott rekonstruált emberi felhámmodelltől függően a jégecet vagy a 8N KOH. Megjegyzendő, hogy a 8N KOH közvetlen MTT-redukáló hatású, ezért szükség lehet a 25. és 26. pontban ismertetett adaptált kontrollok elvégzésére. A javasolt negatív kontrollanyag a 0,9 vegyesszázalékos NaCl-oldat vagy a víz.

A sejtek életképességének mérése

24. E vizsgálati módszer alkalmazása során a sejtek életképességének mérésére a kvantitatív MTT-vizsgálatot kell alkalmazni (27). A szövetmintát 3 órára megfelelő koncentrációjú (0,3 vagy 1 mg/ml) MTT-oldatba helyezik. A kicsapódott kék formazán terméket azután oldószer (pl. izopropanol, savas izopropanol) használatával eltávolítják a szövetből, és egy maximum ±30 nm-es sávszűrő alkalmazásával 570 nm hullámhosszon az OD-érték meghatározásával, vagy egy HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárás útján (lásd a 30. és 31. pontot) (38) megmérik a formazán koncentrációját.

25. A vizsgálati vegyi anyagok megzavarhatják az MTT-vizsgálatot azáltal, hogy közvetlenül kék formazánná redukálják az MTT-t és/vagy azáltal, hogy színinterferenciát okoznak, ha a vizsgálati vegyi anyag jellegénél fogva vagy a kezelési eljárás következtében a formazánnal azonos OD-tartományban nyeli el a fényt (570 ± 30 nm, többnyire kék vagy lila vegyi anyagok esetében). E vizsgálati vegyi anyagok potenciális zavaró hatásának kiszűrése és korrigálása érdekében további kontrollokat kell végezni, mint például a nem specifikus MTT-redukció (NSMTT) kontrollt és a nem specifikus színeződés (NSC) kontrollt (lásd a 26–30. pontot). Ez különösen fontos abban az esetben, amikor egy adott vizsgálati vegyi anyagot nem távolítottak el teljesen a szövetből a mosás során, vagy amikor az anyag áthatol az epidermiszen, és így az MTT életképességi vizsgálat elvégzése során jelen van a szövetekben. A vizsgálati modellek szabványműveleti eljárásai részletes leírással szolgálnak arról, hogyan kell korrigálni a közvetlen MTT-redukáló hatást és a színezőanyagok okozta zavaró hatást (34) (35) (36) (37).

26. A közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező anyagok azonosítása érdekében minden vizsgálati vegyi anyagot frissen készített MTT-közegbe kell helyezni (34) (35) (36) (37). Amennyiben a vizsgálati vegyi anyagot tartalmazó MTT-keverék színe kékre/lilára változik, a vizsgálati vegyi anyag feltételezhetően közvetlenül redukálja az MTT-t, ezért kiegészítő funkcionális ellenőrzést kell végezni elhalt epidermiszen, független vizsgálat keretében hagyományos abszorbancia (OD) mérés, illetve HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárás útján. E kiegészítő funkcionális ellenőrzés során elhalt szöveteket használnak, amelyek reziduális metabolikus aktivitással rendelkeznek csupán, ugyanakkor a vizsgálati vegyi anyagot az élő szövetekhez hasonló mértékben abszorbeálják. Az egyes MTT-redukáló hatású vegyi anyagokkal expozíciós időszakonként legalább két elhalt szövetreplikátumot kezelnek, amelyeken elvégzik a teljes bőrkorróziós vizsgálatot. Ezután meghatározzák a szövetek valódi életképességét, ehhez az MTT-redukáló anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott életképességi arányból levonják az ugyanazon MTT-redukáló anyaggal kezelt elhalt szövetekkel kapott nem specifikus MTT-redukció arányát, amelyet a vizsgálattal párhuzamosan végzett negatív kontrollal korrigálva számítanak ki (NSMTT-arány).

27. Annak érdekében, hogy meghatározható legyen a színes vizsgálati vegyi anyagok, illetve a vízzel vagy izopropanollal való érintkezés következtében elszíneződött vizsgálati vegyi anyagok potenciális zavaró hatása, és dönteni lehessen a kiegészítő kontrollok szükségességéről, el kell végezni a vizsgálati vegyi anyag spektrumelemzését vízben (expozíciós környezet) és/vagy izopropanolban (extraháló oldat). Amennyiben vízben és/vagy izopropanolban a vizsgálati vegyi anyag 570 ± 30 nm-es tartományban nyeli el a fényt, további színezőanyag-kontrollokra van szükség, illetve alternatív megoldásként HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárást lehet végezni, amelynek alkalmazásakor ezek a kontrollok nem szükségesek (lásd a 30. és 31. pontot). Hagyományos abszorbancia (OD) mérés esetén az egyes zavaró hatású színes vizsgálati vegyi anyagokkal expozíciós időszakonként legalább két élő szövetreplikátumot kezelnek, amelyeken elvégzik a teljes bőrkorróziós vizsgálatot, de az MTT

inkubációs fázis során MTT-mentes oldatba helyezik azokat, hogy létrehozzanak egy nem specifikus színeződés ($NSC_{élő}$) kontrollt. Az élő szövetekre jellemző biológiai változékonyságból kifolyólag az $NSC_{élő}$ kontrollt (minden egyes vizsgálatmenetben) valamennyi expozíciós időszakkal és színes vizsgálati vegyi anyaggal párhuzamosan el kell végezni. Ezután meghatározzák a szövetek valódi életképességét, ehhez a zavaró hatású vizsgálati vegyi anyaggal kezelt és MTT-oldatban inkubált élő szövetekkel kapott életképességi arányból levonják a korrigálandó vizsgálattal párhuzamosan elvégzett, a zavaró hatású vizsgálati vegyi anyaggal kezelt, viszont MTT nélküli közegben inkubált élő szövetekkel kapott nem specifikus elszíneződési százalékot ($NSC_{élő}$ arány).

28. Azon hagyományos abszorbancia (OD) méréssel értékelt vizsgálati vegyi anyagok esetében, amelyek egyaránt okoznak közvetlen MTT-redukciót (lásd a 26. pontot) és színinterferenciát (lásd a 27. pontot), az előző pontokban ismertetett NSMTT és $NSC_{élő}$ kontrollok mellett szükség van egy harmadik fajta kontrollra is. Általában ez a helyzet áll elő az MTT-vizsgálatot zavaró sötét színű (pl. kék, lila, fekete) vizsgálati vegyi anyagoknál, mivel saját színük akadályozza, hogy a 26. pontban leírtak szerint értékelni lehessen közvetlen MTT-redukáló hatásukat. Ezek a vizsgálati vegyi anyagok egyaránt kötődhetnek élő és elhalt szövetekhez, ezért az NSMTT-kontroll nem csupán a vizsgálati vegyi anyag által előidézett közvetlen MTT-redukáló hatást korrigálja, hanem az anyag elhalt szövetekhez való kötődéséből eredő színinterferenciát is. Ez viszont a színinterferencia kétszeri korrekciójához vezethet, mivel az $NSC_{élő}$ kontroll már korrigálja a vizsgálati vegyi anyag élő szövetekhez való kötődéséből fakadó színinterferenciát. A színinterferencia esetleges kétszeri korrekciójának kiküszöbölése érdekében szükség van egy harmadik kontrollra, amely az elhalt szövetek esetében méri a nem specifikus elszíneződést (NSC_{elhalt}). E kiegészítő kontroll során a vizsgálati vegyi anyaggal expozíciós időszakonként legalább két elhalt szövetreplikátumot kezelnek, amelyeken elvégzik a teljes bőrkorróziós vizsgálatot, de az MTT inkubációs fázis során MTT-mentes oldatba helyezik azokat. A független vizsgálatok/vizsgálatmenetek számától függetlenül vizsgálati vegyi anyagonként elegendő egyetlen NSC_{elhalt} kontroll, azt azonban az NSMTT-kontrollal egyidejűleg, és ha megoldható, ugyanazon szövettételen kell elvégezni. Ezután meghatározzák a szövetek valódi életképességét, ehhez a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott életképességi arányból levonják az NSMTT-arányt és az $NSC_{élő}$ arányát, majd hozzáadják a zavaró hatású vizsgálati vegyi anyaggal kezelt és MTT nélküli közegben inkubált elhalt szövetekkel kapott nem specifikus elszíneződési arányt, amelyet a korrigálandó vizsgálattal párhuzamosan végzett negatív kontrollhoz viszonyítva számítanak ki (NSC_{elhalt} arány).

29. Fontos megjegyezni, hogy a nem specifikus MTT-redukció és a nem specifikus színinterferencia a spektrofotométer linearitási tartománya fölé növelheti a szövetkivonat leolvasott értékeit. Ebből kifolyólag minden laboratóriumnak kereskedelmi forgalomban kapható MTT-formazán (CAS-száma: 57360-69-7) segítségével meg kell határoznia spektrofotométerének linearitási tartományát, mielőtt megkezdené a vizsgálati vegyi anyagok szabályozási célú vizsgálatát. A spektrofotométert használó hagyományos abszorbancia (OD) mérés alkalmas a közvetlen MTT-redukáló hatással bíró és színinterferenciát okozó vizsgálati vegyi anyagok értékelésére, amikor a szövetkivonatok vizsgálati vegyi anyaggal kapott, közvetlen MTT-redukció és/vagy színinterferencia tekintetében nem korrigált OD-értékei a spektrofotométer linearitási tartományán belül vannak, illetve amikor a vizsgálati vegyi anyaggal kapott nem korrigált életképességi arány alapján a vizsgálati vegyi anyag korrozívnak tekinthető (lásd a 35. és 36. pontot). Mindazonáltal a negatív kontroll 50 %-ánál nagyobb NSMTT-arányt és/vagy $NSC_{élő}$ arányt előidéző vizsgálati vegyi anyagok eredményei óvatosan értelmezendők.

30. Azon színes vizsgálati vegyi anyagok esetében, amelyek nagy mértékben befolyásolják az MTT-vizsgálatot, és ezért hagyományos abszorbancia (OD) méréssel nem vizsgálhatók, az MTT-formazán HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárással történő meghatározását lehet alkalmazni (lásd a 31. pontot) (37). A HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszer lehetővé teszi, hogy az MTT-formazánt mennyiségi meghatározása előtt elkülönítsék a vizsgálati vegyi anyagtól (38). Ezért HPLC/UPLC spektrofotometriás módszer használata esetén a vizsgálati vegyi anyagtól függetlenül soha nincs szükség $NSC_{élő}$ és NSC_{elhalt} kontrollra. Az NSMTT-kontroll ugyanakkor alkalmazandó, ha a vizsgálati vegyi anyag gyaníthatóan közvetlenül redukálja az MTT-t, vagy a színe miatt közvetlen MTT-redukáló hatását nem lehet felmérni (a 26. pontban ismertetett módon). Amennyiben HPLC/UPLC spektrofotometriásan mérik az MTT-formazánt, a szövetek életképességi aránya a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott MTT-formazán csúcsterület és a párhuzamos negatív kontrollal kapott MTT-formazán csúcsterület aránya lesz. A közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező vizsgálati vegyi anyagok

esetében a szövetek valódi életképességét úgy számítják ki, hogy a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott életképességi arányból kivonják az NSMTT-arányt. Végül megjegyzendő, hogy azok a közvetlen MTT-redukáló hatású, esetleg színinterferenciát is okozó vegyi anyagok, amelyek a kezelést követően visszamaradnak a szövetben és olyan erős MTT-redukáló hatással bírnak, hogy a vizsgált szövetkivonatok OD-értéke (hagyományos OD mérés esetén), illetve csúcsterülete (HPLC/UPLC spektrofotometriás mérés esetén) kívül esik a spektrofotométer linearitási tartományán, nem értékelhetők, bár ilyen csak igen ritka esetben fordul elő.

31. A HPLC/UPLC spektrofotometria bármely típusú vizsgálati vegyi anyagnál (színes, nem színes, MTT-redukáló vagy nem MTT redukáló hatású) alkalmazható az MTT-formazán mérésére (38). A HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszerek sokfélesége miatt szükség van arra, hogy a szövetkivonatok MTT-formazán-tartalmának meghatározása előtt igazolják a HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszer minősítését azzal, hogy eleget tesznek az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyelete (FDA) által az iparág számára kiadott, bioanalitikus módszerek validálására vonatkozó iránymutatásban (38) (39) szereplő standard minősítési paramétereken alapuló elfogadhatósági kritériumoknak. E kulcsfontosságú paraméterekről és elfogadhatósági kritériumokról a 4. függelék nyújt tájékoztatást. Amint eleget tettek a 4. függelékben meghatározott elfogadhatósági kritériumoknak, a HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszer minősítettnek tekintendő, és alkalmas arra, hogy az itt leírt vizsgálati módszerben bemutatott kísérleti feltételek mellett elvégezze az MTT-formazán mérését.

Elfogadhatósági kritériumok

32. Minden vizsgálati módszer esetében, amelynek során érvényes RhE-modelleket alkalmaznak, a negatív kontrollal kezelt szöveteknek olyan OD-értéket kell mutatniuk, amely tükrözi a szövetek 2. táblázatban feltüntetett értékek szerinti minőségét, és amely nem lehet alacsonyabb a korábbi adatok alapján megállapított határértékeknél. A pozitív kontrollanyaggal, vagyis jégecettel vagy 8N KOH-hal kezelt szöveteknek tükrözniük kell a szövetek azon képességét, hogy a vizsgálati modell feltételei mellett reagálnak a korrozív vegyi anyagokra (lásd a 2. függeléket). A vizsgáltati és/vagy kontroll vegyi anyagokkal kezelt szövetreplikátumok variabilitásának az egyes érvényes RhE-modellek követelményeiben szereplő elfogadott határértéken belül kell maradnia (lásd a 2. függeléket) (*pl.* a két szövetreplikátum közötti variabilitási különbség nem haladhatja meg a 30 %-ot). Amennyiben egy adott vizsgálatmenet negatív vagy pozitív kontrollja kívül esik az elfogadott tartományon, a vizsgálatmenetet érvénytelennek kell nyilvánítani, és meg kell ismételni. Ha a vizsgálati vegyi anyag variabilitása kívül esik a meghatározott tartományon, meg kell ismételni a vizsgálatát.

Az eredmények értelmezése és az előrejelzési modell

33. Az egyes vizsgálati vegyi anyagokra vonatkozó OD-értéket kell felhasználni a 100 %-nak vett negatív kontrollhoz viszonyított százalékos életképesség kiszámításához. HPLC/UPLC spektrofotometria alkalmazása esetén a szövetek életképességi aránya a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott MTT-formazán csúcsterület és a párhuzamos negatív kontrollal kapott MTT-formazán csúcsterület arányaként kerül meghatározásra. A sejtéletképesség százalékban megállapított határértéke, amelynek alapján megkülönböztethetők a korrozív és nem korrozív vizsgálati vegyi anyagok (vagy a különböző korrozív alkategóriák), és amelynek alapján az eredményeket értelmezni kell, a vizsgálati módszerhez tartozó vizsgálati modellekre vonatkozólag az alábbi 35. és 36. pontban kerül meghatározásra.

34. Ha a létrejött besorolás egyértelmű, legalább két szövetreplikátum vizsgálatából álló egyszeri vizsgálatmenetnek elegendőnek kell lennie az adott vizsgálati vegyi anyag esetében. Határértéken lévő eredmények esetében azonban, ha például az egyes szövetreplikátumok eredményei nem egyeznek, megfontolható egy második vizsgálatmenet lefolytatása, és ha az első és a második vizsgálatmenet eredményei különbözőek, egy harmadiké is.

35. Az ENSZ GHS/CLP-rendelet osztályozási rendszeréhez kapcsolódó EpiSkin™ bőrkorróziós vizsgálati modell előrejelzési modellje (9) (34) (22) a 4. táblázat szerint alakul:

4. táblázat

EpiSkin™ előrejelzési modell

Adott expozíciós időpontokban mért életképesség (t = 3, 60 és 240 perc)	Megfontolandó javaslat
< 35 % 3 perc expozíció után	**Korrozív:** •Opcionális 1A alkategóra (*)
≥ 35 % 3 perc expozíció után **ÉS** < 35 % 60 perc expozíció után **VAGY** ≥ 35 % 60 perc expozíció után **ÉS** < 35 % 240 perc expozíció után	**Korrozív:** •Opcionális 1B és 1C alkategória kombinációja
≥ 35 % 240 perc expozíció után	**Nem korrozív**

(*) Az RhE vizsgálati modellek alkategóriába sorolásra való alkalmasságának felmérése során nyert adatok azt mutatták, hogy az EpiSkin™ vizsgálati modell használatával az 1A alkategóriába sorolt anyagok mintegy 22 %-a valójában az 1B alkategóriába vagy az anyagok/keverékek 1C alkategóriájába tartozna (vagyis felülkategorizálás történt) (lásd a 3. függeléket).

36. Az ENSZ GHS/CLP-rendelet osztályozási rendszeréhez kapcsolódó EpiDerm™ SCT (10) (23)(35), SkinEthic™ RHE (17) (18) (23) (36) és epiCS® (16) (23) (37) bőrkorróziós vizsgálati modellek előrejelzési modellje az 5. táblázat szerint alakul:

5. táblázat

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE és epiCS®

Adott expozíciós időpontokban mért életképesség (t = 3 és 60 perc)	Megfontolandó javaslat
1. LÉPÉS EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE és epiCS® használata esetén	
< 50 % 3 perc expozíció után	**Korrozív**
≥ 50 % 3 perc expozíció után **ÉS** < 15 % 60 perc expozíció után	**Korrozív**
≥ 50 % 3 perc expozíció után **ÉS**≥ 15 % 60 perc expozíció után	**Nem korrozív**
2. LÉPÉS EpiDerm™ SCT használata esetén – az 1. lépésben korrozívnak minősített anyagoknál/keverékeknél	
< 25 % 3 perc expozíció után	Opcionális 1A alkategóra *

Adott expozíciós időpontokban mért életképesség (t = 3 és 60 perc)	Megfontolandó javaslat
1. LÉPÉS EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE és epiCS® használata esetén	
≥ 25 % 3 perc expozíció után	Opcionális kombinált 1B–1C alkategória
2. LÉPÉS SkinEthic™ RHE használata esetén – az 1. lépésben korrozívnak minősített anyagoknál/keverékeknél	
< 18 % 3 perc expozíció után	Opcionális 1A alkategóra *
≥ 18 % 3 perc expozíció után	Opcionális kombinált 1B–1C alkategória
2. LÉPÉS epiCS® használata esetén – az 1. lépésben korrozívnak minősített anyagoknál/keverékeknél	
< 15 % 3 perc expozíció után	Opcionális 1A alkategóra *
≥ 15 % 3 perc expozíció után	Opcionális kombinált 1B–1C alkategória

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

37. Mindegyik vizsgálatra vonatkozóan táblázatos jelentést kell készíteni az egyes szövetreplikátumok adatairól (például OD-értékek és számított százalékos sejt-életképességi adatok az egyes vizsgálati vegyi anyagok esetében, a besorolást is beleértve), amelyben szerepelnie kell a megismételt kísérletek adatainak is, ha voltak ilyenek. Ezen túlmenően jelentésbe kell foglalni az egyes vizsgálatokban használt szövetreplikátumok átlagát, életképességi tartományát és variációs koefficiensét. Az MTT-reagens és a közvetlen MTT-redukáló hatású vagy színes vizsgálati vegyi anyagok között megfigyelt kölcsönhatásokat a jelentésben minden vizsgálati vegyi anyag esetében fel kell tüntetni.

Vizsgálati jelentés

38. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag és kontrollként szolgáló vegyi anyagok:

— Egy összetevőből álló anyag: kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján;

— Több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek: amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai jellemzik;

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— eredet, gyártási szám, ha ismert;

— a vizsgálati vegyi anyag/kontrollanyag kezelése a vizsgálatot megelőzően, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, felhasználási határideje vagy ismételt elemzésének napja, ha ismert;

— tárolási feltételek.

Az alkalmazott RhE-modell és protokoll, valamint használatuk indokolása (amennyiben szükséges)

Vizsgálati körülmények:

— az alkalmazott RhE-modell (és gyártási szám);

— az MTT-formazán mennyiségi meghatározására használt mérőeszköz (*pl.* spektrofotométer) kalibrálási adatai, a hullámhossz és (adott esetben) a sávszélesség, valamint a mérőeszköz linearitási tartománya;

— az MTT-formazán számszerű mérésére alkalmazott módszer leírása;

— a HPLC/UPLC-spektrofotometriás rendszer minősítésének leírása, ha releváns;

— az alkalmazott specifikus RhE-modellre vonatkozó teljes körű alátámasztó adatok, köztük a modell teljesítménye. Ennek többek között az alábbiakat kell magában foglalnia:

i. életképesség;

ii. barrierfunkció;

iii. morfológia;

iv. reprodukálhatóság és előrejelző képesség;

v. a modell minőség-ellenőrzése;

— hivatkozás a modellel kapott korábbi adatokra. Ennek többek között magában kell foglalnia a minőség-ellenőrzési adatok elfogadhatóságát, tekintettel a korábbi tételadatokra;

— a vizsgálati módszer végrehajtásában való jártasság bizonyítása a módszer rutinszerű használata előtt, a jártassági tesztanyagok vizsgálata révén.

Vizsgálati eljárás:

— az alkalmazott vizsgálati eljárás részletes leírása (ideértve az expozíciós időszak utáni öblítési eljárásokat);

— a vizsgálati vegyi anyag és a kontrollként szolgáló vegyi anyagok dózisa;

— az expozíciós időszak(ok) hossza és az expozíciós hőmérséklet(ek);

— a közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező és/vagy színváltozást okozó vizsgálati vegyi anyagokhoz alkalmazott kontrollok feltüntetése, amennyiben releváns;

— vizsgálati vegyi anyagonként és kontrollonként (pozitív kontroll, negatív kontroll, NSMTT, $NSC_{élő}$ és NSC_{elhalt}, ha releváns), valamint az egyes expozíciós időszakok során használt szövetreplikátumok;

— a használt RhE-modell alapján alkalmazott döntési kritériumok/előrejelzési modell leírása;

— a vizsgálati eljárás (többek között a mosási eljárások) bármilyen változtatásának leírása.

A vizsgálatmenet és a vizsgálat elfogadásának kritériumai:

— a pozitív és negatív kontrollok átlagértéke és elfogadhatósági tartománya a korábbi adatokon alapul;

— a pozitív és negatív kontrollokban használt szövetreplikátumok közötti elfogadható mértékű variabilitás;

— a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt szövetreplikátumok közötti elfogadható mértékű variabilitás.

Eredmények:

— az egyes vizsgálati vegyi anyagokra és kontrollokra, minden expozíciós időpontra, vizsgálatmenetre és szövetmérésre vonatkozó adatok, többek között az OD-érték vagy az MTT-formazán csúcsterület, szövetek életképességi aránya, szövetek átlagos életképességi aránya, a replikátumok közötti eltérések, szórások és/vagy variációs koefficiensek (amennyiben releváns) táblázatba foglalása;

— amennyiben alkalmazandó, a közvetlen MTT-redukáló hatású és/vagy elszíneződést okozó vizsgálati vegyi anyagokhoz használt kontrollok eredményei, ideértve az OD-értéket vagy az MTT-formazán csúcsterületet, az NSMTT, az $NSC_{élő}$ és az NSC_{elhalt} arányt, a szövetreplikátumok közötti különbségeket, szórásokat és/vagy variációs koefficienseket (amennyiben releváns), és a szövetek helyes végső életképességi arányát;

— a meghatározott vizsgálatmenet és a vizsgálat elfogadhatósági kritériumai tekintetében a vizsgálati vegyi anyaggal/anyagokkal és a kontrollként szolgáló vegyi anyagokkal kapott eredmények;

— a megfigyelt egyéb hatások leírása.

— az alkalmazott előrejelzési modellel/döntési kritériumokkal összhangban kialakított osztályozás.

Az eredmények értékelése

Következtetések

SZAKIRODALOM

(1) UN (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth Revised Edition, UN New York valamint Geneva. Elérhető a következő címen:http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) E melléklet B.4., Akut bőrirritáció/bőrkorrózió fejezete.

(3) E melléklet B.40., *In vitro* bőrkorrózió fejezete.

(4) E melléklet B.65., *In vitro* Membrán barrier vizsgálati módszer fejezete.

(5) E melléklet B.46., *In vitro* bőrirritáció: Rekonstruált emberi felhámmodellen végzett vizsgálati módszer című fejezete.

(6) OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203) Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop 6.*ATLA* 23:219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. *Toxicol.In vitro* 12:471-482.

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhutter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In vitro* Tests for SkinCorrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicol.*in vitro* 12:483-524.

(10) Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. and Holzhütter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, *ATLA* 28: 371-401.

(11) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H. et Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, ATLA 23:129-147.

(12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological TestMethods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(13) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(14) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.

(15) EC-ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21 March 2000.

(16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. and Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol.In vitro* 19: 925-929.

(17) Kandárová H., Liebsch M., Spielmann,H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N, Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., and Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol.In vitro* 20: 547-559.

(18) Tornier C., Roquet M. and Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0,5 cm^2 Tissue Sample. *Toxicol. In vitro* 24: 1379-1385.

(19) EC-ECVAM (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), 17 November 2006.

(20) EC-ECVAM (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 12 June 2009.

(21) OECD (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 190). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(22) Alépée N., Grandidier M.H., and Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. In vitro* 28:131-145.

(23) Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., and Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. *Toxicol. In vitro* 29:2055-2080.

(24) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 219). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(25) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(26) Eskes C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62, 393-403.

(27) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.

(28) Tinois E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In vitro*. In: *In vitro* Skin Toxicology. Rougier A.,. Goldberg A.M and Maibach H.I. (Eds): 133-140.

(29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. and Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol.in vitro* 8:889 - 891.

(30) Ponec M., Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J and Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. Inter. J. Pharmaceu. 203:211 - 225.

(31) Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. and Thivolet J. (1991). *In vitro* and Post - Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193:310-319.

(32) Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS and Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9, 163-171.

(33) Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF and Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8:747-756.

(34) EpiSkin™ SOP (December 2011). *INVITTOX* Protocol (No 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.

(35) EpiDerm™ SOP (February 2012). Version MK-24-007-0024 Protocol for: *In vitro* EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm.

(36) SkinEthic™ RHE SOP (January 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.

(37) EpiCS® SOP (January 2012). Version 4.1 *In vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) CellSystems.

(38) Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M., and McNamee P. Use of HPLC/UPLC- spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In vitro* 29: 741-761.

(39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (2001. május). Elérhető a következő címen: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: a vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. E kifejezést gyakran használják az »egyezés« megfelelőjeként, amely egy adott vizsgálati módszer alkalmazásakor az azonos eredmények arányát fejezi ki (25).

Sejtek életképessége: a sejtpopulációk teljes aktivitását mérő paraméter (például a celluláris mitokondriális dehidrogenázoknak az MTT ([3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid, tiazolil kék] vitális festéket redukáló képessége), amely – a mért végponttól és az alkalmazott vizsgálati tervtől függően – korrelációt mutat az élő sejtek teljes számával és/vagy életképességével.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Egyezés: a kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. A kifejezést esetenként használják a pontosság megfelelőjeként, és úgy határozzák meg, mint a helyesen pozitívként vagy negatívként besorolt összes vizsgálati vegyi anyag aránya. Az egyezés nagy mértékben függ a vizsgálat tárgyát képező vizsgálati vegyi anyag típusaiban előforduló pozitív eredmények gyakoriságától (25).

ET_{50}: a referencia-vegyianyag meghatározott, állandó koncentrációban történő alkalmazása esetén a sejt életképességének 50 %-kal való csökkentéséhez szükséges expozíciós idő meghatározásával becsülhető meg, lásd még az IC_{50}-et.

GHS (a vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszere): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (1).

HPLC:: nagy teljesítményű folyadékkromatográfia.

IATA: integrált vizsgálati és értékelési megközelítés.

IC_{50}: annak a koncentrációnak a meghatározásával becsülhető meg, amelynél egy adott referencia-vegyianyag egy meghatározott expozíciós idő elteltével 50 %-kal (IC_{50}) csökkenti a szövetek életképességét; lásd még az ET_{50}-et.

Végtelen dózis: az epidermiszen alkalmazott vizsgálati vegyi anyag azon mennyisége, amely meghaladja az epidermisz felszínének teljes és egyenletes befedéséhez szükséges mennyiséget.

Keverék: két vagy több anyagból álló keverék vagy oldat, amelyben az anyagok nem lépnek egymással reakcióba.

Egy összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben az egyik fő összetevő legalább 80 tömegszázalékban van jelen.

MTT: 3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid; tiazolil kék tetrazólium-bromid.

Több összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben egynél több fő összetevő több mint 10 tömegszázalékban, de 80 tömegszázalékot nem meghaladó koncentrációban van jelen. A több összetevőből álló anyag gyártási folyamat eredménye. A keverék és a több összetevőből álló anyag között az a különbség, hogy a keverék két vagy több anyag összekeverésével, kémiai reakció nélkül jön létre. A több összetevőből álló anyag kémiai reakció eredménye.

NK: nem korrozív.

NSC_{elhalt} kontroll: elhalt szöveteken végzett, nem specifikus színeződést mérő kontroll.

$NSC_{élő}$ kontroll: élő szöveteken végzett, nem specifikus színeződést mérő kontroll.

NSMTT: nem specifikus MTT-redukció.

OD: optikai sűrűség.

Pozitív kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó vegyi anyaggal kezelt replikátum. Annak biztosítása érdekében, hogy a pozitív kontrollban jelentkező hatás időbeli változását fel lehessen mérni, a pozitív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Teljesítményszabványok: hitelesített referenciamódszeren alapuló szabványok, amelyek a javasolt, végrehajtás és funkcionalitás szempontjából hasonló vizsgálati módszer összehasonlíthatósági értékelésének alapjául szolgálnak. Ide tartoznak: i. a vizsgálati módszer alapvető összetevői; ii. a referencia-vegyianyagok minimális jegyzéke, amely a validált vizsgálati módszer által nyújtott teljesítmény elfogadhatóságának igazolására használt vegyi anyagokból került összeállításra; és iii. a validált vizsgálati módszer eredményei alapján meghatározott, azokhoz hasonló megbízhatósági és pontossági szint, amelyet a javasolt vizsgálati módszernek teljesítenie kell a referencia-vegyianyagok minimális jegyzéke szerinti értékelése során (25).

Relevancia: a vizsgálati módszer és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálati módszer mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálati módszer pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (25).

Megbízhatóság: a vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. A laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság kiszámításával állapítják meg (25).

Vizsgálatmenet: egy vizsgálatmenet során egy vagy több vizsgálati vegyi anyagot vizsgálnak egy párhuzamos negatív kontrollal és egy pozitív kontrollal.

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálati módszer helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (25).

In vivobőrkorrózió: a vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően négy órán belül megjelenő, visszafordíthatatlan bőrkárosodás, azaz a felhámon át az irhára is átterjedő látható szövetelhalás. A korróziós reakciót fekélyek, vérzés, véres var, illetve a 14 napos megfigyelési időszak végén a bőr kifehéredése miatti elszíneződések, teljesen szőrtelen területek és hegek jellemzik. A kérdéses lézió értékeléséhez figyelembe kell venni a kórszövettant.

Specificitás: a vizsgálati módszerrel helyesen besorolt összes negatív/inaktív vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (25).

Anyag: olyan természetes állapotban előforduló vagy gyártási eljárásból származó kémiai elem és vegyületei, amely a stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagot és az alkalmazott eljárásból származó szennyező anyagokat is tartalmazhat, de nem tartalmaz olyan oldószert, amely az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltoztatása nélkül elkülöníthető.

Vizsgálati vegyi anyag:: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

UPLC: ultranagy teljesítményű folyadékkromatográfia.

UVCB: ismeretlen vagy változó összetételű anyagok, valamint komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok.

2. függelék

A BŐRKORRÓZIÓS VIZSGÁLATKÉNT VALIDÁLT RHE VIZSGÁLATI MODELLEK FŐBB ÖSSZETEVŐI

A vizsgálati modell összetevői	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
A modell felülete	0,38 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
A szövetreplikátumok száma	Expozíciós időszakonként legalább 2	Expozíciós időszakonként legalább 2–3	Expozíciós időszakonként legalább 2	Expozíciós időszakonként legalább 2
A kezelési dózisok és alkalmazásuk	Folyadékok és viszkózus anyagok: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm^2) Szilárd anyagok: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm^2) + 100 µl ± 5 µl NaCl-oldat (9 g/l) Viaszos/ragadós anyagok: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm^2) nejlonhálóval	Folyadékok: 50 µl (79,4 µl/cm^2) nejlonhálóval vagy anélkül *Elővizsgálat a vizsgálati vegyi anyag nejlonhálóval való kompatibilitására* Félszilárd anyagok: 50 µl (79,4 µl/cm^2) Szilárd anyagok: 25 µl H_2O (vagy szükség esetén több) + 25 mg (39,7 mg/cm^2) Viaszos anyagok: kb. 8 mm átmérőjű lapos „korongszerű” darab helyezendő a 15 µl H_2O-val megnedvesített szövetre.	Folyadékok és viszkózus anyagok: 40 µl ± 3µl (80 µl/cm^2) nejlonháló használatával *Elővizsgálat a vizsgálati vegyi anyag nejlonhálóval való kompatibilitására* Szilárd anyagok: 20 µl ± 2 µl H_2O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) Viaszos/ragadós anyagok: 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) nejlonháló használatával	Folyadékok: 50 µl (83,3 µl/cm^2) nejlonháló használatával *Elővizsgálat a vizsgálati vegyi anyag nejlonhálóval való kompatibilitására* Félszilárd anyagok: 50 µl (83,3 µl/cm^2) Szilárd anyagok: 25 mg (41,7 mg/cm^2) + 25 µl H_2O (vagy szükség esetén több) Viaszos anyagok: kb. 8 mm átmérőjű lapos „keksz alakú” darab helyezendő a 15 µl H_2O-val megnedvesített szövetre

A vizsgálati modell összetevői	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Közvetlen MTT-redukáló hatás előzetes felmérése	50 µl (folyadék) vagy 20 mg (szilárd)+ 2 ml MTT 0,3 mg/ml oldat 180 ± 5 percig 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH mellett → ha az oldat színe kékre/lilára vált, vízben elölt adaptált kontrollt kell végezni	50 µl (folyadék) vagy 25 mg (szilárd)+ 1 ml MTT 1 mg/ml oldat 60 percig 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH mellett → ha az oldat színe kékre/lilára vált, fagyasztással elölt adaptált kontrollt kell végezni	40 µl (folyadék) vagy 20 mg (szilárd)+ 1 ml MTT 1 mg/ml oldat 180± 15 percig 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH mellett → ha az oldat színe kékre/lilára vált, fagyasztással elölt adaptált kontrollt kell végezni	50 µl (folyadék) vagy 25 mg (szilárd)+ 1 ml MTT 1 mg/ml oldat 60 percig 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH mellett → ha az oldat színe kékre/lilára vált, fagyasztással elölt adaptált kontrollt kell végezni
Színinterferencia előzetes felmérése	10 µl (folyadék) vagy 10 mg (szilárd) + 90 µl H_2O szobahőmérsékleten keverve 15 percig → ha az oldat elszíneződik, élő szöveteken adaptált kontrollt kell végezni	50 µl (folyadék) vagy 25 mg (szilárd) + 300 µl H_2O 60 percre 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH mellett → ha az oldat elszíneződik, élő szöveteken adaptált kontrollt kell végezni	40 µl (folyadék) vagy 20 mg (szilárd) + 300 µl H_2O szobahőmérsékleten keverve 60 percig → ha a vizsgálati vegyi anyag elszíneződik, élő szöveteken adaptált kontrollt kell végezni	50 µl (folyadék) vagy 25 mg (szilárd) + 300 µl H_2O 60 percre 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH mellett → ha az oldat elszíneződik, élő szöveteken adaptált kontrollt kell végezni
Expozíciós idő és hőmérséklet	3 perc, 60 perc (± 5 perc) és 240 perc (± 10 perc) Szellőztetett fülkében Szobahőmérsékleten (szobahőm., 18–28 °C)	3 perc szobahőmérsékleten, és 60 perc 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH mellett	3 perc szobahőmérsékleten, és 60 perc 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH mellett	3 perc szobahőmérsékleten, és 60 perc 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH mellett
Öblítés	25 ml 1x PBS (2 ml/öblítésenként)	20 alkalommal mosni 1x PBS-sel	20 alkalommal mosni 1x PBS-sel	20 alkalommal mosni 1x PBS-sel

A vizsgálati modell összetevői	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Negatív kontroll	50 µl NaCl-oldat (9 g/l) Minden expozíciós időpontban vizsgálva	50 µl H_2O Minden expozíciós időpontban vizsgálva	40 µl H_2O Minden expozíciós időpontban vizsgálva	50 µl H_2O Minden expozíciós időpontban vizsgálva
Pozitív kontroll	50 µl jégecet Csak 4 órán át vizsgálva	50 µl 8N KOH Minden expozíciós időpontban vizsgálva	40 µl 8N KOH Csak 1 órán át vizsgálva	50 µl 8N KOH Minden expozíciós időpontban vizsgálva
MTT-oldat	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT inkubációs idő és hőmérséklet	180 perc (± 15 perc) 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH mellett	180 perc 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH mellett	180 perc (± 15 perc) 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH mellett	180 perc 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH mellett
Extraháló oldószer	500 µl savasított izopropanol (0,04 N HCl izopropanolban) (izolált szövetet teljesen bemerítve)	2 ml izopropanol (kinyerés az inzert tetejéről és aljáról)	1,5 ml izopropanol (kinyerés az inzert tetejéről és aljáról)	2 ml izopropanol (kinyerés az inzert tetejéről és aljáról)
Extrakciós időtartam és hőmérséklet	Éjszakán át szobahőmérsékleten, fénytől védett helyen	Szobahőmérsékleten rázás nélkül éjszakán át vagy 120 perces rázatással (~120 rpm)	Szobahőmérsékleten rázás nélkül éjszakán át vagy 120 perces rázatással (~120 rpm)	Szobahőmérsékleten rázás nélkül éjszakán át vagy 120 perces rázatással (~120 rpm)

A vizsgálati modell összetevői	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
OD leolvasás	570 nm (545–595 nm) referenciaszűrő nélkül	570 nm (vagy 540 nm) referenciaszűrő nélkül	570 nm (540–600 nm) referenciaszűrő nélkül	540–570 nm referenciaszűrő nélkül
Szövet minőség-ellenőrzése	18 órás kezelés SDS-sel 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,0 mg/ml	Kezelés 1 % Triton X-100-zal 4,08 óra ≤ ET_{50} ≤ 8,7 óra	Kezelés 1 % Triton X-100-zal 4,0 óra ≤ ET_{50} ≤ 10,0 óra	Kezelés 1 % Triton X-100-zal 2,0 óra ≤ ET_{50} ≤ 7,0 óra
Elfogadhatósági kritériumok	1. A negatív kontrollal (NaCl) kezelt szövetreplikátumok átlagos OD-értékének minden expozíciós időszakban legalább 0,6-nak és legfeljebb 1,5-nek kell lennie 2. A pozitív kontrollal (jégecet) 4 órán át kezelt szövetreplikátumok átlagos életképessége, a negatív kontrollhoz viszonyított százalékos arányban kifejezett értéke nem haladhatja meg a 20 %-ot 3. 20–100 %-os életképességi tartományban és legalább 0,3-as OD-értéknél a két szövetreplikátum életképessége közötti különbség nem haladhatja meg a 30 %-ot	1. A negatív kontrollal (H_2O) kezelt szövetreplikátumok átlagos OD-értékének minden expozíciós időszakban legalább 0,8-nak és legfeljebb 2,8-nak kell lennie 2. A pozitív kontrollal (8N KOH) 1 órán át kezelt szövetreplikátumok átlagos, a negatív kontroll százalékában kifejezett életképessége nem érheti el a 15 %-ot 3. 20–100 %-os életképességi tartományban a szövetreplikátumok közötti variációs koefficiens nem haladhatja meg a 30 %-ot.	1. A negatív kontrollal (H_2O) kezelt szövetreplikátumok átlagos OD-értékének minden expozíciós időszakban legalább 0,8-nak és legfeljebb 3,0-nak kell lennie 2. A pozitív kontrollal (8N KOH) 1 órán át (adott esetben 4 órán át) kezelt szövetreplikátumok átlagos, a negatív kontroll százalékában kifejezett életképessége nem érheti el a 15 %-ot 3. 20–100 %-os életképességi tartományban és legalább 0,3-as OD-értéknél a két szövetreplikátum életképessége közötti különbség nem haladhatja meg a 30 %-ot.	1. A negatív kontrollal (H_2O) kezelt szövetreplikátumok átlagos OD-értékének minden expozíciós időszakban legalább 0,8-nak és legfeljebb 2,8-nak kell lennie 2. A pozitív kontrollal (8N KOH) 1 órán át kezelt szövetreplikátumok átlagos, a negatív kontroll százalékában kifejezett életképessége nem érheti el a 20 %-ot 3. 20–100 %-os életképességi tartományban és legalább 0,3-as OD-értéknél a két szövetreplikátum életképessége közötti különbség nem haladhatja meg a 30 %-ot.

3. függelék

A VIZSGÁLATI MODELLEKNEK AZ ALKATEGÓRIÁBA SOROLÁS TERÉN NYÚJTOTT TELJESÍTMÉNYE

Az alábbi táblázat ismerteti a négy vizsgálati modellnek a vizsgálat négy kidolgozója által tesztelt, 80 vegyi anyagon nyújtott teljesítményét. A számításokat az OECD Titkársága végezte el, amelyek eredményét egy szakértői alcsoport vizsgálata felül és hagyta jóvá (21) (23).

Az EpiSkin™, az EpiDerm™, a SkinEthic™ és az epiCS® vizsgálati modellekkel elvégezhető az alkategóriába sorolás (vagyis 1A vagy 1B és 1C vagy nem korrozív (NK)).

A négy vizsgálati modell teljesítménye, felülkategorizálási aránya, alulkategorizálási aránya és pontossága (előrejelző képessége) az összes vizsgálati modellben 2 vagy 3 vizsgálatmenet során vizsgált, 80 elemből álló vegyi anyag készlet alapján:

ELŐREJELZÉSI STATISZTIKA A TELJES VEGYI ANYAG KÉSZLET ALAPJÁN

(n= 80 vegyi anyag 2 független vizsgálatmenetben vizsgálva az epiCS® esetében, illetve 3 független vizsgálatmenetben vizsgálva az EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ és SkinEthic™ RHE esetében, ami 159 (*), illetve 240 besorolást jelent)

	EpiSkin™	EpiDerm ™	SkinEthic™	epiCS®
Felülkategoriázálások:				
1B–1C osztályba tartozók 1A osztályba sorolása	21,50 %	29,0%	31,2%	32,8%
NK-anyagok 1B–1C osztályba sorolása	20,7%	23,4%	27,0 %	28,4 %
NK-anyagok 1A osztályba sorolása	0,00%	2,7%	0,0 %	0,00%
Felülkategorizálás korr.	20,7%	26,1%	27,0%	28,4%
Összesített felülkategorizálási ráta (minden kategória)	**17,9%**	**23,3%**	**24,5%**	**25,8%**
Alulkategorizálások:				
1A osztályba tartozók 1B–1C osztályba sorolása	16,7%	16,7 %	16,7%	12,5 %
1A osztályba tartozók NK-anyagként való besorolása	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
1B–1C osztályba tartozók NK-anyagként való besorolása	2,2%	0,00%	7,5%	6,6%
Összesített alulkategorizálási ráta (minden kategória)	**3,3%**	**2,5%**	**5,4%**	**4,4%**
Helyes kategorizálások:				
1A osztályba tartozók helyes besorolása	83,3%	83,3%	83,3%	87,5%
1B–1C osztályba tartozók helyes besorolása	76,3%	71,0%	61,3%	60,7%
NK-anyagok helyes besorolása	79,3%	73,9%	73,0%	71,62%
Összesített pontosság	**78,8%**	**74,2%**	**70%**	**69,8%**

NC: Nem korrozív

(*) az egyik vegyi anyagot egyszer vizsgálták az epiCS® modellben, mert nem állt rendelkezésre (23)

4. függelék

A rekonstruált emberi felhámszövetből kivont MTT-formazán mérésére használt HPLC/UPLC spetrofotometriás rendszer minősítésének főbb paraméterei és elfogadhatósági kritériumai

Paraméter	Az FDA-iránymutatás szerinti protokoll (37) (38)	Elfogadhatósági kritériumok
Szelektivitás	Izopropanol elemzése, élő vakpróba (nem kezelt élő RhE-szövetekből kivont izopropanol), elhalt vakpróba (nem kezelt elhalt RhE-szövetekből kivont izopropanol)	$Terület_{interferencia} \leq Terület_{AMHÉ}$[1] 20 %-a ([1])
Precizitás	Minőség-ellenőrzések (vagyis MTT-formazán 1,6 μg/ml, 16 μg/ml és 160 μg/ml mellett) izopropanolban (n=5)	Variációs koefficiens ≤ 15 % vagy ≤ az AMHÉ 20 %-a
Pontosság	Minőség-ellenőrzés izopropanolban (n=5)	Eltérési arány ≤ 15 % vagy ≤ az AMHÉ 20 %-a
Mátrixhatás	Minőség-ellenőrzés élő vakpróbán (n=5)	85 % ≤ Mátrixhatás % ≤ 115 %
Átvitel	Izopropanol elemzése egy FMHÉ[2] szabvány után ([2])	$Terület_{interferencia} \leq Terület_{AMHÉ}$ 20 %-a
Megismételhetőség (napon belüli)	3 független kalibrációs görbe (izopropanolba helyezett MTT-formazán 6 egymás utáni 1/3-os hígítása kezdve a FMHÉ-nél, vagyis 200 μg/ml-nél); Minőség-ellenőrzés izopropanolban (n=5)	Kalibrációs görbék: Eltérési arány ≤ 15 % vagy ≤ az AMHÉ 20 %-a Minőség-ellenőrzések: Eltérési arány ≤ 15 % és variációs koefficiens ≤ 15 %
Megismételhetőség (napok közötti)	1. nap: 1 kalibrációs görbe és minőség-ellenőrzések izopropanolban (n=3) 2. nap: 1 kalibrációs görbe és minőség-ellenőrzések izopropanolban (n=3) 3. nap: 1 kalibrációs görbe és minőség-ellenőrzések izopropanolban (n=3)	
Az MTT-formazán rövid távú stabilitása az RhE szövetkivonatban	Minőség-ellenőrzések élő vakpróbán (n=3) a készítés napján és 24 órás szobahőmérsékleten való tárolás után	Eltérési arány ≤ 15 %
Az MTT-formazán hosszú távú stabilitása az RhE szövetkivonatban, ha szükséges	Minőség-ellenőrzések élő vakpróbán (n=3) a készítés napján és több napi, meghatározott hőmérsékleten (pl. 4 °C, -20 °C, -80 °C) történő tárolás után	Eltérési arány ≤ 15 %

([1]) AMHÉ: Alsó meghatározási határérték, amely 1–2 %-os szöveti életképességet takar, vagyis 0,8 μg/ml.
([2]) FMHÉ: Felső meghatározási határérték, amely legalább kétszer akkora mint a negatív kontroll izopropanolban várható legmagasabb MTT-formazán koncentrációja, vagyis 200 μg/ml.

”

7. A B. részben a B.46. fejezet helyébe a következő szöveg lép:

„B.46. ***IN VITRO* BŐRIRRITÁCIÓ: REKONSTRUÁLT EMBERI FELHÁMMODELLEN VÉGZETT VIZSGÁLATI MÓDSZER**

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 439. vizsgálati iránymutatásában (2015) leírt módszerrel. A bőrirritáció a vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően 4 órán belül megjelenő, visszafordítható bőrkárosodás [az Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) által kidolgozott, vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszerében (GHS)] (1), valamint az Európai Unió (EU) anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendeletében (CLP-rendelet) ([1]) meghatározottak szerint. Ez a vizsgálati módszer olyan *in vitro* eljárást biztosít, amely lehetővé teszi az ENSZ által kidolgozott GHS és a CLP-rendelet szerinti 2-es kategóriának megfelelő, irritációt okozó vegyi anyagok (anyagok és keverékek) jelentette veszély meghatározását (2). Azokban a régiókban, amelyekben nem alkalmazzák az ENSZ GHS szerinti opcionális 3. kategóriát (enyhe irritáló hatású anyagok), e vizsgálati módszert a kategóriába nem sorolt vegyi anyagok azonosítására is használhatják. Ezért a szabályozási keret és a használatban lévő osztályozási rendszer függvényében e vizsgálati módszer egyaránt használható az *in vivo* bőrirritációs vizsgálatokat önállóan helyettesítő vizsgálatként és valamely vizsgálati stratégia keretében alkalmazott részlegesen helyettesítő vizsgálatként a vegyi anyagok bőrirritációs hatásának meghatározására (3).
2. A bőrirritáció felmérése jellemzően kísérleti állatokon történő vizsgálatot foglal magában (az OECD eredetileg 1981-ben elfogadott, majd 1992-ben, 2002-ben és 2015-ben felülvizsgált 404. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű B.4. vizsgálati módszer alkalmazásával) (4). A korrozivitás vizsgálata terén három validált *in vitro* vizsgálati módszert fogadtak el: (az OECD 430. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű) B.40. uniós vizsgálati módszert, (az OECD 431. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű) B.40bis. vizsgálati módszert és (az OECD 435. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű) B.65. vizsgálati módszert (5) (6) (7). A bőrkorróziós és bőrirritációs vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről (IATA) szóló OECD-iránymutatás több, információforrásokat és adatelemző eszközöket csoportosító modult ismertet, továbbá iránymutatást nyújt arra nézve, i. hogyan integrálhatók és használhatók az ismert vizsgálati és nem vizsgálati eredetű adatok a vegyi anyagok potenciális bőrirritációs és bőrkorróziós hatásainak felmérésére, és ii. javaslatot tesz egy, a további vizsgálatok szükségessége esetén alkalmazható megközelítésre (3).
3. Ez a vizsgálati módszer a bőrirritációval mint az emberi egészség károsodásának egyik végpontjával foglalkozik. Ez a módszer rekonstruált emberi felhám (RhE) *in vitro* vizsgálati rendszerén alapul, amely nagy hasonlósággal modellezi az emberi bőr felső rétegének, azaz a felhámnak (epidermisznek) biokémiai és fiziológiai tulajdonságait Az RhE vizsgálati rendszer nem transzformált emberi keratinocitákat alkalmaz sejtforrásként, amelyekből rekonstruálnak egy szövettani és sejtfelépítés szempontjából reprezentatív felhámmodellt. A hasonló és módosított RhE-alapú vizsgálati módszerek validálásának és értékelésének elősegítése érdekében rendelkezésre állnak teljesítményszabványok, az OECD 34. iránymutatásában lefektetett elvekkel összhangban (8) (9). A módszerrel egyenértékű, eredetileg 2010-ben elfogadott vizsgálati iránymutatás 2013-as átdolgozott változatába belefoglaltak további RhE-modelleket, 2015-ös átdolgozott kiadása pedig kitér az IATA-iránymutatásra és bevezet egy, az életképesség mérésére szolgáló alternatív eljárást.
4. Az RhE vizsgálati rendszeren (érzékenysége 80 %, specificitása 70 % és pontossága 75 %) alapuló négy kereskedelmi forgalomban kapható *in vitro* vizsgálati modellen végeztek elővalidálási, optimalizálási és validálási vizsgálatokat (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). E vizsgálati iránymutatás magában foglalja ezt a négy vizsgálati modellt, felsorolásuk a 2. mellékletben található, amely tájékoztatást nyújt az adott vizsgálati módszerek validálásához alkalmazott validálási vizsgálat típusáról is. Ahogyan az a 2. mellékletben is megjegyzésre került, e vizsgálati módszer és a teljesítményszabványok (8) a validált referenciamódszer alapján kerültek kidolgozásra.
5. Az adatok OECD-megállapodás szerinti kölcsönös elfogadása csak a teljesítményszabványoknak (8) megfelelően validált vizsgálati modellek esetében lesz garantált, ha a vizsgálati modelleket az OECD felülvizsgálta és elfogadta. Az e vizsgálati módszer és az annak megfelelő OECD vizsgálati iránymutatás részét képező vizsgálati modellek egységesen használhatók arra, hogy eleget tegyenek az *in vitro* bőrirritációs vizsgálati módszerekből származó vizsgálati eredményekre vonatkozó nemzeti követelményeknek, ugyanakkor biztosítják az adatok kölcsönös elfogadásának előnyeit.
6. A dokumentumban alkalmazott fogalmak meghatározása az 1. függelékben található.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

7. A vizsgálati módszer korlátai közé tartozik – ahogyan az az RhE vizsgálati módszereket értékelő és jellemző teljes körű előretekintő validálási vizsgálatból kiderült (16) –, hogy nem teszi lehetővé a vegyi anyagok ENSZ GHS szerinti opcionális 3. kategóriába (enyhe irritáló hatású anyagok) sorolását (1). Ezért a vizsgálati módszer jövőbeni használatát a tagállamok szabályozási kerete fogja meghatározni. Az EU a 3. kategóriát nem foglalta bele a CLP-rendeletbe. Egyetlen bőrexpozíció után a bőrt ért helyi hatások teljes kiértékeléséhez a vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről szóló OECD-iránymutatást kell tanulmányozni (3). Elfogadott tény, hogy az emberi bőr használatára nemzeti és nemzetközi etikai megfontolások és feltételek vonatkoznak.

([1]) Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról (HL L 353/1., 2008.12.31.).

8. Ez a vizsgálati módszer a bőrirritációval mint az emberi egészség károsodásának egyik végpontjával foglalkozik. Bár ez a vizsgálati módszer nem nyújt megfelelő információt a bőrkorrózióról, megjegyzendő, hogy a bőrkorrózió vizsgálatára irányuló (az OECD 431. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű) B.40bis. módszer ugyanezen a rekonstruált emberi felhámmodelles vizsgálati rendszeren alapul, noha más protokollt alkalmaz (6). Ez a vizsgálati módszer emberi keratinsejteket tartalmazó rekonstruált emberi felhámmodelleken alapul, tehát a vizsgált faj célszervének *in vitro* vizsgálatáról van szó. Továbbá közvetlenül lefedi az irritáció során *in vivo* zajló gyulladásos kaszkád/hatásmechanizmus kezdeti lépését (körülírt sérülést eredményező sejt- és szövetkárosodás). E vizsgálati módszer validálási eljárása során a vegyi anyagok széles körét vizsgálták, és a validálási vizsgálat adatbázisa összesen 58 vegyi anyagra terjedt ki (16) (18) (23). A vizsgálati módszer szilárd anyagokra, folyadékokra, félszilárd anyagokra és viaszos anyagokra alkalmazandó. A folyadékok lehetnek vizesek vagy nem vizesek; a szilárd anyagok lehetnek vízben oldódóak vagy oldhatatlanok. Ahol megoldható, a szilárd anyagokat alkalmazásuk előtt finom porrá kell őrölni; a mintát előzetesen nem szükséges más módon kezelni. Gázokat és aeroszolokat hitelesítési vizsgálat keretében még nem vizsgáltak (29). Bár elképzelhető, hogy ezek is vizsgálhatók a rekonstruált emberi felhámmodelles technikával, a jelenlegi vizsgálatimódszer-leírás nem engedi meg gázok és aeroszolok vizsgálatát.

9. A vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény. Mivel azonban a keverékek kategóriák és összetételek széles körét fedik le, és jelenleg kevés információ áll rendelkezésre a keverékek vizsgálatára vonatkozóan, azokban az esetekben, amikor bizonyítékkal igazolható, hogy a vizsgálati módszer valamely konkrét keverékkategóriára nem alkalmazható (pl. az Eskes és társai, 2012 által javasolt stratégia alapján (30)), a vizsgálati módszer az adott keverékkategóriára nem alkalmazható. Hasonló elővigyázatossággal kell eljárni azokban az esetekben, amikor egyes kémiai osztályokról vagy fizikai-kémiai tulajdonságokról bizonyosodik be, hogy e vizsgálati módszer keretében nem alkalmazhatók.

10. Azok a vizsgálati vegyi anyagok, amelyek ugyanabban a tartományban nyelik el a fényt, mint az MTT-formazán, és azok a vizsgálati vegyi anyagok, amelyek közvetlenül is képesek redukálni az MTT vitális festéket (MTT-formazánná), befolyásolhatják a sejtek életképességének mérését, ennek korrigálása érdekében adaptált kontrollvizsgálatokra van szükség (lásd a 28–34. pontot).

11. Ha a besorolás egyértelmű, három szövetreplikátum vizsgálatából álló egyszeri vizsgálatmenetnek elegendőnek kell lennie az adott vizsgálati vegyi anyag esetében. Határértéken lévő eredmények esetében azonban, ha például az egyes szövetreplikátumok eredményei nem egyeznek és/vagy az átlagos százalékos életképesség 50 ± 5 %, megfontolandó egy második vizsgálatmenet lefolytatása, és ha az első és a második vizsgálatmenet eredményei különbözőek, egy harmadiké is.

A VIZSGÁLAT ELVE

12. A vizsgálati vegyi anyagot egy olyan nem transzformált emberi epidermális keratinsejtekből képződött, háromdimenziós emberi felhámmodellre viszik fel topikálisan, amelyeket úgy tenyésztettek ki, hogy többrétegű, erősen differenciált emberi felhámot (epidermiszt) alkossanak. Ez szervezett bazális, spinózus és granuláris sejtrétegekből, valamint többrétegű szarurétegből (*stratum corneum*) áll, amelyek intercellulárisan lipid kettősréteget tartalmaznak, megtalálhatók a fő lipidcsoportok, amik analógok az *in vivo* megtalálható lipidcsoportokkal.

13. A vegyi anyagok által előidézett bőrirritáció, amely főként bőrpírt és ödémát okoz, egy kaszkád jellegű folyamat eredménye, amelynek első lépéseként a vegyi anyagok áthatolnak a *stratum corneum*on, ahol károsíthatják az alatta lévő, keratinsejtekből és más bőrsejtekből álló rétegeket. A károsodott sejtek vagy gyulladást okozó anyagokat bocsátanak ki, vagy egy gyulladásos kaszkádot indítanak el, amelyek szintén az irhában lévő sejtekre hatnak – főként a vérerek stromális és endoteliális sejtjeire. A megfigyelt bőrpírt és ödémát az endoteliális sejtek tágulása és fokozott permeabilitása idézi elő (29). Mivel az *in vitro* vizsgálati rendszerben nincsenek vérerek, a rekonstruált emberi felhámmodellen alapuló vizsgálati módszerek a kaszkád kiváltó eseményeit, vagyis a sejt-, illetve szövetkárosodást mérik (16), (17), a sejtek életképessége alapján.

14. A rekonstruált emberi felhámmodellekben lévő sejtek életképességét az MTT [3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid, tiazolil kék; CAS-száma: 298–93–1)] vitális festék enzimatikus úton kék formazán kristállyá történő átalakulása alapján mérik, amelyet a szövetekből történő kivonás után mennyiségileg meghatároznak (31). Az irritatív hatású anyagokat azon képességük alapján azonosítják, hogy a sejtek életképességét meghatározott határérték alá (azaz az ENSZ GHS/CLP-rendelet szerinti 2. kategóriájú anyagok esetében ≤ 50 % alá) csökkentik. A szabályozási kerettől és a vizsgálati módszer alkalmazhatóságától függően a határérték feletti sejtéletképességet eredményező vizsgálati vegyi anyagok, amelyek a definált küszöbérték feletti értéket mutatnak nem irritálónak tekinthetők (vagyis 50 % feletti érték, nincs kategóriába sorolva).

A JÁRTASSÁG BIZONYÍTÁSA

15. Az e vizsgálati módszer alá tartozó (2. függelékben ismertetett) négy validált vizsgálati modell rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak az 1. táblázatban felsorolt tíz jártassági tesztanyag használatával igazolniuk kell szakmai jártasságukat. Az olyan helyzetekben, mint amikor a jegyzékben szereplő valamely anyag nem áll rendelkezésre, megfelelő *in vivo* és *in vitro* referenciaadatokkal rendelkező más – például a referencia-vegyianyagok jegyzékében feltüntetett (8) – anyag is használható, amennyiben a kiválasztási kritériumok megegyeznek az 1. táblázatban foglaltakkal. Más jártassági tesztanyag alkalmazását meg kell indokolni.
16. A jártassági vizsgálat részeként ajánlott, hogy a felhasználók a rekonstruált emberi felhámmodell gyártója által meghatározottak szerint, átvétel után ellenőrizzék a szövetek barrierjellemzőit. Ez különösen fontos, ha a szöveteket nagy távolságra/hosszú ideig szállították. Ha egy vizsgálati módszert már sikeresen igazoltak, valamint jártasságot szereztek az alkalmazásában és bizonyították azt, ilyen jellegű ellenőrzéseket nem szükséges rutinszerűen végezni. Ha azonban egy vizsgálati módszert rutinszerűen alkalmaznak, a barrierjellemzőket javasolt továbbra is rendszeres időközönként ellenőrizni.

1. táblázat

Jártassági tesztanyagok ([1])

Anyag	CAS-szám	*In vivo* eredmény ([2])	Halmazállapot	ENSZ GHS szerinti kategória
KATEGÓRIÁBA NEM SOROLT ANYAGOK (ENSZ GHS szerint „nem besorolt”)				
naftalin-ecetsav	86-87-3	0	Szilárd	Kategória nélküli
izopropanol	67-63-0	0,3	Folyadék	Kategória nélküli
metil-sztearát	112-61-8	1	Szilárd	Kategória nélküli
heptil-butirát	5870-93-9	1,7	Folyadék	Kategória nélküli (*Opcionális 3. kategória*) ([3])
hexil-szalicilát	6259-76-3	2	Folyadék	Kategória nélküli (*Opcionális 3. kategória*) ([3])
KATEGORIZÁLT ANYAGOK (ENSZ GHS szerinti 2. kategória)				
ciklámen-aldehid	103-95-7	2,3	Folyadék	2. kategória
1-brómhexán	111-25-1	2,7	Folyadék	2. kategória
kálium-hidroxid (5 %-os vizes oldat)	1310-58-3	3	Folyadék	2. kategória
1-metil-3-fenil-1-piperazin	5271-27-2	3,3	Szilárd	2. kategória
heptanál	111-71-7	3,4	Folyadék	2. kategória

([1]) A jártassági tesztanyagok az anyagok olyan csoportját alkotják, amelyet felhasználtak a validálási vizsgálat során, kiválasztásuk pedig az alábbi kritériumok alapján történt: i. a vegyi anyagok kereskedelmi forgalomban kaphatók; ii. lefedik a Draize-féle irritációs pontértékek teljes tartományát (a nem irritálótól az erősen irritálóig); iii. jól meghatározott kémiai szerkezettel rendelkeznek; iv. reprezentatívak a validálási folyamat során alkalmazott kémiai funkcionalitás tekintetében; v. több vizsgálat során és több laboratóriumban megismételhető *in vitro* eredményeket biztosítottak; vi. az *in vitro* vizsgálatokban megfeleltek az előrejelzéseknek, és vii. nem rendelkeznek rendkívül toxikus profillal (például karcinogén hatással vagy reproduktív toxicitással), valamint nem kapcsolódnak hozzájuk elrettentő mértékű ártalmatlanítási költségek.
([2]) Az *in vivo* pontszám összhangban van a B.4. vizsgálati módszerrel (4).
([3]) E vizsgálati módszer alapján az ENSZ GHS szerinti opcionális 3. kategóriába tartozó anyagok (enyhe irritáló hatású anyagok) (1) „kategória nélküli” anyagoknak minősülnek.

ELJÁRÁS

17. Az alábbiakban ismertetjük a bőrirritáció felmérésére szolgáló RhE vizsgálati módszer összetevőit és eljárásait (az egyes vizsgálati modellekhez kapcsolódó paraméterekről a 3. függelék nyújt további tájékoztatást). A vizsgálati módszernek megfelelő négy modellhez rendelkezésre állnak szabványműveleti eljárások (32) (33) (34) (35).

A RHE VIZSGÁLATI MÓDSZER ÖSSZETEVŐI

Általános feltételek

18. Az epitélium felépítéséhez nem transzformált emberi keratinsejteket kell használni. Élő epitélsejtek több rétegének (bazális réteg, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*) kell jelen lennie a funkcionális *stratum corneum* alatt. A *stratum corneum*nak többrétegűnek kell lennie, és tartalmaznia kell az elengedhetetlenül szükséges lipidprofilt, hogy nagy ellenálló képességgel rendelkező funkcionális barriert képezzen a citotoxikus referencia-vegyianyagok, pl. a nátrium-dodecil-szulfát (SDS) vagy a Triton X-100 gyors áthatolása ellen. A barrierfunkciót bizonyítani kell, ennek értékeléséhez meghatározható az a referencia-vegyianyag koncentráció, amely meghatározott idejű expozíciót követően 50 %-kal csökkenti a szövetek életképességét (IC_{50}), vagy az az expozíciós idő, amely alatt egy adott, állandó koncentrációjú referencia-vegyianyag hatására a sejtek életképessége 50 %-kal csökken (ET_{50}). A rekonstruált emberi felhámmodell folyadékzáró tulajdonságainak meg kell akadályozni, hogy az anyag passzáljon a *stratum corneum* körül az élő szövetbe, amely a bőr expozíciójának rossz modellezését eredményezné. A rekonstruált emberi felhámmodellnek baktérium-, vírus-, mikoplazma- és gombafertőzéstől mentesnek kell lennie.

Funkcionális feltételek

Életképesség

19. Az életképesség számszerű mérése MTT-vizsgálattal történik (31). A rekonstruált ember felhám szövetkonstrukciójának élő sejtjei képesek az MTT vitális festéket kék MTT-formazán kristályokká redukálni, amelyeket azután izopropanol (vagy hasonló oldószer) használatával kivonják a szövetből. Az extraháló oldószer optikai sűrűségének (OD) eléggé alacsonynak, azaz 0,1 alattinak kell lennie. A kivont MTT-formazán mennyisége meghatározható hagyományos abszorbancia (OD) méréssel vagy HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárással (36). A rekonstruált emberi felhámmodell felhasználóinak biztosítaniuk kell, hogy az alkalmazott RhE-modell minden egyes tétele megfeleljen a negatív kontrollra vonatkozóan meghatározott kritériumoknak. A rekonstruált emberi felhámmodell előállítójának/forgalmazójának meg kell határoznia a negatív kontroll során nyert OD-értékek (bőrirritációs vizsgálati módszer körülményei alatti) elfogadhatósági tartományát (alsó és felső határértékeket). A vizsgálati módszerhez kapcsolódó négy validált RhE vizsgálati modell elfogadhatósági tartományát a 2. táblázat tartalmazza. A HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárás alkalmazása esetén a negatív kontroll elfogadhatósági feltételeként a 2. táblázatban szereplő negatív kontrollra vonatkozó OD-tartományok szolgálnak. Dokumentálni kell, hogy a negatív kontrollal kezelt szövetek stabilak a tenyészetben (hasonló életképességi értékeket adnak) a vizsgálat során alkalmazott expozíciós időszak alatt.

2. táblázat

Negatív kontrollra vonatkozó OD-értékek elfogadhatósági tartománya a vizsgálati módszer alá tartozó vizsgálati modellek alkalmazása esetén

	Alsó elfogadási határ	Felső elfogadási határ
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0,8	≤ 2,8
SkinEthic™ RHE	≥ 0,8	≤ 3,0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0,7	≤ 2,5

Barrierfunkció

20. A *stratum corneum*nak és lipidprofiljának az IC_{50} vagy ET_{50} alapján végzett becslések szerint (3. táblázat) megfelelő ellenálló képességgel kell rendelkeznie ahhoz, hogy meg tudja akadályozni a citotoxikus referencia-vegyianyagok (pl. a nátrium-dodecil-szulfát (SDS) vagy a Triton X-100) gyors áthatolását.

Morfológia

21. A rekonstruált emberi felhámmodellen szövettani vizsgálatot kell végezni a humán epidermiszszerű szerkezet (beleértve a többrétegű *stratum corneum*) igazolására.

Reprodukálhatóság

22. A vizsgálati módszer alkalmazása során végzett pozitív és negatív kontrollok eredményeinek igazolniuk kell a módszer időbeni megismételhetőségét.

Minőség-ellenőrzés

23. A rekonstruált emberi felhámmodell csak abban az esetben alkalmazható, ha előállítója/forgalmazója igazolja, hogy az alkalmazott RhE-modell minden egyes tétele megfelel a gyártás utáni felszabadításra vonatkozóan meghatározott feltételeknek, amelyek közül az *életképességre* (19. pont), a *barrierfunkcióra* (20. pont) és a *morfológiára* (21. pont) vonatkozó kritériumok a leglényegesebbek. Ezeket az adatokat a vizsgálati módszer felhasználóinak rendelkezésére kell bocsátani, hogy ezeket az információkat fel tudják tüntetni a vizsgálati jelentésben. Az IC_{50} és az ET_{50} eljárás elfogadhatósági tartományát (alsó és felső határértékét) a rekonstruált emberi felhámmodell előállítójának/forgalmazójának kell meghatároznia. Az irritáló hatás besorolásának megbízható előrejelzéseként kizárólag minősített szöveteken végzett vizsgálatok eredményei fogadhatók el. Az e vizsgálati iránymutatáshoz kapcsolódó négy vizsgálati modell elfogadhatósági tartományát a 3. táblázat ismerteti.

3. táblázat

Minőség-ellenőrzés tételenkénti, kibocsátási kritériumai az e vizsgálati módszer alá tartozó vizsgálati modellek alkalmazása esetén

	Alsó elfogadási határ	Felső elfogadási határ
EpiSkin™ (SM) (18 órás kezelés nátrium-dodecil-szulfáttal (SDS)) (32)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (33)	ET_{50} = 4,0 óra	ET_{50} = 8,7 óra
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (34)	ET_{50} = 4,0 óra	ET_{50} = 10,0 óra
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18 órás kezelés nátrium-dodecil-szulfáttal (SDS)) (35)	IC_{50} = 1,4 mg/ml	IC_{50} = 4,0 mg/ml

A vizsgálati vegyi anyag és a kontrollként szolgáló vegyi anyagok alkalmazása

24. Minden vizsgálatmenetben valamennyi vizsgálati vegyi anyaghoz és kontrollhoz legalább három szövetreplikátumot kell használni. Folyékony és szilárd anyagok esetében egyaránt megfelelő mennyiségű vizsgálati vegyi anyagot kell alkalmazni, hogy az egyenletesen fedje az epidermisz felszínét, azaz 26 és 83 µl/cm^2 vagy mg/cm^2 közötti mennyiséget (lásd a 3. függeléket), ugyanakkor el kell kerülni a végtelen dózis alkalmazását. Szilárd anyagok esetében alkalmazásuk előtt az epidermisz felületét ionmentesített vagy desztillált vízzel be kell nedvesíteni, hogy jobb legyen az érintkezés a vizsgálati vegyi anyag és az epidermisz felszíne között. A szilárd anyagokat, amikor csak lehetséges finom por alakban kell vizsgálni. Bizonyos esetekben a szétterítés megkönnyítésére nejlonháló használható (lásd a 3. függeléket). Az expozíciós idő lejártával a vizsgálati vegyi anyagot vizes alapú pufferrel vagy 0,9 %-os NaCl-dal óvatosan le kell mosni az epidermisz felületéről. Az alkalmazott RhE vizsgálati modelltől függően az expozíciós időszak 15 és 60 perc között, az inkubációs hőmérséklet pedig 20 és 37 °C között változhat. Az expozíciós időt és hőmérsékletet minden egyes RhE vizsgálati módszerre optimalizálták, hogy azok tükrözzék a vizsgálati modellek különböző belső tulajdonságai (pl. barrierfunkcióját) (lásd a 3. függeléket).
25. Minden vizsgálatmenetben párhuzamos negatív és pozitív kontrollokat kell végezni annak bizonyítására, hogy a szövetek életképessége (negatív kontrollok esetében), barrierfunkciója és az abból fakadó érzékenysége (pozitív kontrollok esetében) egy meghatározott történeti elfogadhatósági tartományba esik. A javasolt pozitív kontrollanyag nátrium-dodecil-szulfát (SDS) 5 %-os vizes oldata. A javasolt negatív kontrollanyag a víz vagy a foszfátpuffert tartalmazó sóoldat (PBS).

A sejtek életképességének mérése

26. A vizsgálati eljárás szerint fontos, hogy az életképességi mérést ne azonnal a vizsgálati vegyi anyaggal végzett expozíció után végezzék, hanem friss tápközegben, megfelelő hosszúságú inkubációs utókezelési időszakot követően. Ez az időszak egyaránt lehetővé teszi az enyhe irritatív hatás utáni felépülést, valamint az egyértelmű citotoxikus hatások megjelenését. A vizsgálati módszer alapjául szolgáló RhE-alapú vizsgálati modellek közül kettőnek az esetében elvégzett optimalizálási vizsgálat során a 42 órás kezelés utáni inkubációs időszak bizonyult optimálisnak (11) (12) (13) (14) (15).

27. Az MTT-vizsgálat egy szabványosított kvantitatív módszer, amelyet e vizsgálati módszer során a sejtek életképességének méréséhez kell alkalmazni. A vizsgálat kompatibilis a háromdimenziós szövetkonstrukcióban történő használattal. A szövetmintát 3 órára megfelelő koncentrációjú (például 0,3–1 mg/ml) MTT-oldatba kell helyezni. Az MTT-t az élő sejtek kék formazánná alakítják. A kicsapódott kék formazán terméket azután oldószer (pl. izopropanol, savas izopropanol) használatával eltávolítják a szövetből, és az OD-értéket 570 nm-es hullámhosszon (a maximumhoz képest ± 30 nm-es eltérés lehetséges), vagy egy HPLC/UPLC spektrofotométeres eljárás útján (lásd a 34. pontot) (36) meghatározzák a formazán koncentrációját.

28. A vizsgálati vegyi anyag optikai tulajdonságai vagy az MTT-re gyakorolt kémiai hatása folytán (pl. a vegyi anyagok meggátolhatják vagy megfordíthatják a színképződést, vagy éppen fokozhatják azt) befolyásolhatja a vizsgálatot, ami az életképesség helytelen megbecsüléséhez vezet. Ez következhet be, amikor egy adott vizsgálati vegyi anyagot mosással nem távolítottak el teljesen a szövetből, vagy amikor az anyag áthatol az epidermiszen. Ha a vizsgálati vegyi anyag közvetlen hatást gyakorol az MTT-re (pl. MTT-redukáló), természetes állapotában is színes, vagy a szövetkezelés során elszíneződik, további kontrollokat kell alkalmazni annak kimutatására és korrigálására, hogy a vizsgálati vegyi anyag befolyásolja az életképesség mérésének módját (lásd a 29. és 33. pontot). A vizsgálati módszer alá tartozó négy validált modell szabványműveleti eljárásában megtalálható annak részletes leírása, hogyan kell korrigálni a közvetlen MTT-redukáló hatást és a színezőanyagok okozta zavaró hatást (32) (33) (34) (35).

29. A közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező anyagok azonosítása érdekében minden vizsgálati vegyi anyagot friss MTT-oldatba kell helyezni. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyagot tartalmazó MTT-keverék színe kékre/lilára változik, a vizsgálati vegyi anyag feltételezhetően közvetlenül redukálja az MTT-t, ezért kiegészítő funkcionális ellenőrzést kell végezni elhalt rekonstruált emberi felhámszöveteken, független vizsgálat keretében, hagyományos abszorbancia (OD) mérés, illetve HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárás útján. E kiegészítő funkcionális ellenőrzés során elhalt szöveteket használnak, amelyek reziduális metabolikus aktivitással rendelkeznek csupán, ugyanakkor az élő szövetekhez hasonló módon abszorbeálják a vizsgálati vegyi anyagot. Az egyes MTT-redukáló hatású vizsgálati vegyi anyagokkal legalább két elhalt szövetreplikátumot kezelnek, amelyeken elvégzik a teljes vizsgálatot azzal a céllal, hogy egy nem specifikus MTT-redukciót (NSMTT) hozzanak létre (32) (33) (34) (35). A független vizsgálatok/vizsgálatmenetek számától függetlenül vizsgálati vegyi anyagonként elegendő egyetlen NSMTT-kontrollt végezni. Ezután meghatározzák a szövetek valódi életképességét, ehhez az MTT-redukáló anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott életképességi arányból levonják az ugyanazon MTT-redukáló anyaggal kezelt elhalt szövetekkel kapott nem specifikus MTT-redukció arányát, amelyet a vizsgálattal párhuzamosan végzett negatív kontrollal korrigálva számítanak ki (NSMTT-arány).

30. Annak érdekében, hogy meghatározható legyen a színes vizsgálati vegyi anyagok, illetve a vízzel vagy izopropanollal való érintkezés következtében elszíneződött vizsgálati vegyi anyagok potenciális zavaró hatása, és dönteni lehessen a kiegészítő kontrollok szükségességéről, el kell végezni a vizsgálati vegyi anyag spektrumelemzését vízben (expozíciós környezet) és/vagy izopropanolban (extraháló oldat). Amennyiben vízben és/vagy izopropanolban a vizsgálati vegyi anyag 570 ± 30 nm-es tartományban nyeli el a fényt, további színezőanyag-kontrollokra van szükség, illetve alternatív megoldásként HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárást lehet végezni, amelynek alkalmazásakor ezek a kontrollok nem szükségesek (lásd a 33. és 34. pontot). Hagyományos abszorbancia (OD) mérés esetén az egyes zavaró hatású színes vizsgálati vegyi anyagokkal legalább két élő szövetreplikátumot kezelnek, amelyeken elvégzik a teljes vizsgálatot, de az MTT inkubációs fázis során MTT-mentes oldatba helyezik azokat, hogy létrehozzanak egy nem specifikus elszíneződés ($NSC_{élő}$) kontrollt. Az élő szövetekre jellemző biológiai változékonyságból kifolyólag az $NSC_{élő}$ kontrollt a színes vizsgálati vegyi anyag vizsgálatával párhuzamosan kell elvégezni, több vizsgálat esetén pedig (minden egyes vizsgálatmenetnél) minden vizsgálattal egyidejűleg független $NSC_{élő}$ kontrollt kell végezni. Ezután meghatározzák a szövetek valódi életképességét, ehhez a zavaró hatású vizsgálati vegyi anyaggal kezelt és MTT-oldatban inkubált élő szövetek életképességi arányából levonják a zavaró hatású vizsgálati vegyi anyagnak kitett és MTT nélküli közegben inkubált élő szövetek nem specifikus elszíneződésének arányát, amelyet a korrigálandó vizsgálattal párhuzamosan vizsgáltak ($NSC_{élő}$ arány).

31. Azon hagyományos abszorbancia (OD) méréssel értékelt vizsgálati vegyi anyagok esetében, amelyek egyaránt okoznak közvetlen MTT-redukciót (lásd a 29. pontot) és színinterferenciát (lásd a 30. pontot), az előző pontokban ismertetett NSMTT és $NSC_{élő}$ kontrollok mellett szükség van egy harmadik fajta kontrollvizsgálatra is. Általában ez a helyzet áll elő az MTT-vizsgálatot zavaró sötét színű (pl. kék, lila, fekete) vizsgálati vegyi anyagoknál, mivel saját színük akadályozza, hogy a 29. pontban leírtak szerint értékelni lehessen közvetlen MTT-redukáló hatásukat. Ezek a vizsgálati vegyi anyagok egyaránt kötődhetnek élő és elhalt szövetekhez, ezért az NSMTT-kontroll nem csupán a vizsgálati vegyi anyag által előidézett közvetlen MTT-redukáló hatást korrigálja, hanem az anyag elhalt szövetekhez való kötődéséből eredő színinterferenciát is. Ez viszont a színinterferencia kétszeri korrekciójához vezethet, mivel az NSCélő kontroll már korrigálja a vizsgálati vegyi anyag élő

szövetekhez való kötődéséből fakadó színinterferenciát. A színinterferencia esetleges kétszeri korrekciójának kiküszöbölése érdekében szükség van egy harmadik kontrollra, amely az elhalt szövetek esetében méri a nem specifikus elszíneződést (NSC_{elhalt}). E kiegészítő kontroll során a vizsgálati vegyi anyaggal legalább két elhalt szövetreplikátumot kezelnek, amelyeken elvégzik a teljes vizsgálatot, de az MTT inkubációs fázis során MTT-mentes oldatba helyezik azokat. A független vizsgálatok/vizsgálatmenetek számától függetlenül vizsgálati vegyi anyagonként elegendő egyetlen NSCelhalt kontroll, azt azonban az NSMTT-kontrollal egyidejűleg, és ha megoldható, ugyanazon szövettételen kell elvégezni. Ezután meghatározzák a szövetek valódi életképességét, ehhez a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott életképességi arányból levonják az NSMTT-arányt és az NSCélő arányát, majd hozzáadják a zavaró hatású vizsgálati vegyi anyaggal kezelt és MTT nélküli közegben inkubált elhalt szövetekkel kapott nem specifikus elszíneződési arányt, amelyet a korrigálandó vizsgálattal párhuzamosan végzett negatív kontrollhoz viszonyítva számítanak ki (NSCelhalt arány).

32. Fontos megjegyezni, hogy a nem specifikus MTT-redukció és a nem specifikus színinterferencia a spektrofotométer linearitási tartománya fölé növelheti a szövetkivonat leolvasott értékeit. Ebből kifolyólag minden laboratóriumnak kereskedelmi forgalomban kapható MTT-formazán (CAS-száma: 57360-69-7) segítségével meg kell határoznia spektrofotométerének linearitási tartományát, mielőtt megkezdené a vizsgálati vegyi anyagok szabályozási célú vizsgálatát. A spektrofotométert használó hagyományos abszorbancia (OD) mérés alkalmas a közvetlen MTT-redukáló hatással bíró és színinterferenciát okozó vizsgálati vegyi anyagok értékelésére, amikor a szövetkivonatok vizsgálati vegyi anyaggal kapott, közvetlen MTT-redukció és/vagy színinterferencia tekintetében nem korrigált OD értékei a spektrofotométer linearitási tartományán belül vannak, illetve amikor a vizsgálati vegyi anyaggal kapott nem korrigált életképességi arány már ≤ 50 %. Mindazonáltal a negatív kontroll 50 %-ával egyező vagy annál nagyobb NSMTT-arányt és/vagy $NSC_{élő}$ arányt előidéző vizsgálati vegyi anyagok eredményei óvatosan értelmezendők, mivel ezt a határértéket használják a kategorizált és nem kategorizált vegyi anyagok megkülönböztetésére (lásd a 36. pontot).

33. Azon színes vizsgálati vegyi anyagok esetében, amelyek nagy mértékben befolyásolják az MTT-vizsgálatot, és ezért hagyományos abszorbancia (OD) méréssel nem vizsgálhatók, az MTT-formazán HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárással történő meghatározását lehet alkalmazni (lásd a 34. pontot) (36). A HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszer lehetővé teszi, hogy az MTT-formazánt mennyiségi meghatározása előtt elkülönítsék a vizsgálati vegyi anyagtól (36). Ezért HPLC/UPLC spektrofotometriás módszer használata esetén a vizsgálati vegyi anyagtól függetlenül soha nincs szükség $NSC_{élő}$ és NSC_{elhalt} kontrollra. Az NSMTT-kontroll ugyanakkor alkalmazandó, ha a vizsgálati vegyi anyag gyaníthatóan közvetlenül redukálja az MTT-t, vagy a színe miatt közvetlen MTT-redukáló hatását nem lehet felmérni (a 29. pontban ismertetett módon). Amennyiben HPLC/UPLC spektrofotometriásan mérik az MTT-formazánt, a szövetek életképességi aránya a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott MTT-formazán csúcsterület és a párhuzamos negatív kontrollal kapott MTT-formazán csúcsterület aránya lesz. A közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező vizsgálati vegyi anyagok esetében a szövetek valódi életképességét úgy számítják ki, hogy a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott életképességi arányból kivonják az NSMTT-arányt. Végül megjegyzendő, hogy azok a közvetlen MTT-redukáló hatású, esetleg színinterferenciát is okozó vegyi anyagok, amelyek a kezelést követően visszamaradnak a szövetben és olyan erős MTT-redukáló hatással bírnak, hogy a vizsgált szövetkivonatok OD-értéke (hagyományos OD mérés esetén), illetve csúcsterülete (HPLC/UPLC spektrofotometriás mérés esetén) kívül esik a spektrofotométer linearitási tartományán, nem értékelhetők, bár ilyen csak igen ritka esetben fordul elő.

34. A HPLC/UPLC spektrofotometria bármely típusú vizsgálati vegyi anyagnál (színes, nem színes, MTT-redukáló vagy nem MTT redukáló hatású) alkalmazható az MTT-formazán mérésére (36). A HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszerek sokfélesége miatt szükség van arra, hogy a szövetkivonatok MTT-formazán-tartalmának meghatározása előtt igazolják a HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszer minősítését azzal, hogy eleget tesznek az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyelete (FDA) által az iparág számára kiadott, bioanalitikus módszerek validálására vonatkozó iránymutatásban (36) (37) szereplő standard minősítési paramétereken alapuló elfogadhatósági kritériumoknak. E kulcsfontosságú paraméterekről és elfogadhatósági kritériumokról a 4. függelék nyújt tájékoztatást. Amint eleget tettek a 4. függelékben meghatározott elfogadhatósági kritériumoknak, a HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszer minősítettnek tekintendő, és alkalmas arra, hogy az itt leírt vizsgálati módszerben bemutatott kísérleti feltételek mellett elvégezze az MTT-formazán mérését.

Elfogadhatósági kritériumok

35. Minden olyan vizsgálati módszer esetében, amelynek során érvényes RhE-modell tételeket alkalmaznak (lásd a 23. pontot), a negatív kontrollal kezelt szöveteknek olyan OD-értéket kell mutatniuk, amely tükrözi a szöveteknek a szállítást és az átvételi lépéseket, valamint az összes protokollfolyamatot követő minőségét. A kontrollok OD-értékei nem lehetnek alacsonyabbak a korábbi adatok alapján megállapított határértékeknél. Hasonlóképpen a pozitív kontrollanyaggal, vagyis nátrium-dodecil-szulfát (SDS) 5 %-os vizes oldatával kezelt szöveteknek tükrözniük kell azon képességüket, hogy a vizsgálati módszer feltételei mellett reagálnak az irritáló vegyi anyagokra (lásd a 3. függeléket, további információkért pedig az e vizsgálati iránymutatáshoz tartozó négy vizsgálati modell szabványműveleti eljárását (32) (33) (34) (35)). A szövetreplikátumok közötti, ezzel kapcsolatos megfelelő eltérés, vagyis a szórás mértékének az alkalmazott vizsgálati modellhez tartozó elfogadási határértéken belül kell maradnia (lásd a 3. függeléket).

Az eredmények értelmezése és az előrejelzési modell

36. Az egyes vizsgálati vegyi anyagokra vonatkozóan kapott OD-értékek felhasználhatók a negatív kontrollra normalizált életképesség százalékos arányának kiszámításához, amely 100 %-ra vonatkozik. HPLC/UPLC spektrofotometria alkalmazása esetén a szövetek életképességi aránya a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott MTT-formazán csúcsterület és a párhuzamos negatív kontrollal kapott MTT-formazán csúcsterület arányaként kerül meghatározásra. Az irritáló anyagokat a kategória nélküli vizsgálati vegyi anyagoktól megkülönböztető százalékos sejtéletképesség határértékét, valamint az eredmények értékeléséhez és az irritáló hatású vegyi anyagok meghatározásához alkalmazott statisztikai eljárás(oka)t egyértelműen meg kell határozni, dokumentálni kell, és megfelelőségüket igazolni kell (további információkért lásd a vizsgálati modellek szabványműveleti eljárását). Az irritáló hatás előrejelzésére alkalmazott határértékek az alábbiak:

— A vizsgálati vegyi anyagot szükséges az ENSZ GHS/CLP-rendelet szerint osztályozni és címkézni (2. kategória vagy 1. kategória), ha a szövet expozíciót és kezelés utáni inkubációt követően meghatározott átlagos életképességi aránya kisebb vagy egyenlő (≤) 50 %-kal. Mivel az e vizsgálati módszer alá tartozó RhE vizsgálati modellek nem tudnak különbséget tenni az ENSZ GHS/CLP-rendelet szerinti 1. és 2. kategória között, a vizsgálati vegyi anyag végleges osztályba sorolásához a bőrkorróziós hatására vonatkozó további információkra van szükség [lásd még az OECD IATA-iránymutatását (3)]. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyagról (a B.40., B.40bis. vagy B.65. vizsgálati módszer alapján) kiderül, hogy nem korrozív hatású, továbbá az expozíciót és kezelés utáni inkubációt követően a kezelt szövet életképessége kisebb vagy egyenlő (≤) 50 %-kal, az ENSZ GHS/CLP-rendelet 2. kategóriája szerint az adott anyag bőrirritáló hatásúnak tekintendő.

— Ha az expozíciót és kezelés utáni inkubációt követően a kezelt szövet életképessége nagyobb (>) mint 50 %, a tagállami szabályozási kerettől függően a vizsgálati vegyi anyag az ENSZ GHS/CLP-rendelet „Kategória nélküli” besorolása szerint bőrirritációt nem okozónak tekinthető.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

37. Mindegyik vizsgálatmenetre vonatkozóan táblázatos jelentést kell készíteni az egyes szövetreplikátumok adatairól (például OD-értékek és számított százalékos sejt-életképességi adatok az egyes vizsgálati vegyi anyagok esetében, a besorolást is beleértve), amelyben szerepelnie kell a megismételt kísérletek adatainak is, ha voltak ilyenek. Továbbá mindegyik vizsgálatmenet esetében meg kell adni az átlagot ± szórást. Az MTT reagenssel és a színes vizsgálati vegyi anyagokkal megfigyelt kölcsönhatásokat a jelentésben minden vizsgálati vegyi anyag esetében fel kell tüntetni.

Vizsgálati jelentés

38. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag és kontrollként szolgáló vegyi anyagok:

— Egy összetevőből álló anyag: kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján;

— több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek: amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai jellemzik;

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— eredet, gyártási szám, ha ismert;

— a vizsgálati vegyi anyag/kontrollként szolgáló vegyi anyagok vizsgálatot megelőző kezelése, ha történt ilyen (például melegítés, porítás);

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, felhasználási határideje vagy ismételt elemzésének napja, ha ismert;

— tárolási feltételek.

Az alkalmazott RhE-modell és protokoll (valamint használatuk indokolása, amennyiben szükséges)

Vizsgálati körülmények:

— az alkalmazott RhE-modell (és gyártási szám);

— az MTT-formazán mennyiségi meghatározására használt mérőeszköz (*pl.* spektrofotométer) kalibrálási adatai, a hullámhossz és (adott esetben) a sávszélesség, valamint a mérőeszköz linearitási tartománya; az MTT-formazán számszerű mérésére alkalmazott módszer leírása;

— a HPLC/UPLC-spektrofotometriás rendszer minősítésének leírása, ha releváns; az alkalmazott specifikus RhE-modellre vonatkozó teljes körű alátámasztó adatok, köztük a modell teljesítménye. Ennek többek között az alábbiakat kell magában foglalnia:

  i. életképesség;

  ii. barrierfunkció;

  iii. morfológia;

  iv. reprodukálhatóság és előre jelezhetőség;

  v. a modell minőség-ellenőrzése;

— hivatkozás a modellel kapott korábbi adatokra. Ennek többek között magában kell foglalnia a minőség-ellenőrzési adatok elfogadhatóságát tekintettel a korábbi tételadatokra;

— a vizsgálati módszer végrehajtásában való jártasság bizonyítása a módszer rutinszerű használata előtt, a jártassági tesztanyagok vizsgálata révén.

Vizsgálati eljárás:

— az alkalmazott vizsgálati eljárás részletes leírása (ideértve az expozíciós időszak utáni öblítési eljárásokat); a vizsgálati vegyi anyag és a kontrollanyagok dózisa;

— az expozíciós és az expozíció utáni inkubációs időszak hossza és az alkalmazott hőmérséklet;

— a közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező és/vagy színváltozást okozó vizsgálati vegyi anyagokhoz alkalmazott kontrollok feltüntetése, amennyiben releváns;

— vizsgálati vegyi anyagonként és kontrollonként (pozitív kontroll, negatív kontroll, NSMTT, $NSC_{élő}$ és NSC_{elhalt}, ha releváns) használt szövetreplikátumok;

— a használt RhE-modell alapján alkalmazott döntési kritériumok/előrejelzési modell leírása;

— a vizsgálati eljárás (többek között a mosási eljárások) bármilyen változtatásának leírása.

A vizsgálatmenet és a vizsgálat elfogadásának kritériumai:

— a pozitív és negatív kontrollok átlagértéke és elfogadhatósági tartománya a korábbi adatokon alapul; a pozitív és negatív kontrollokban használt szövetreplikátumok közötti elfogadható mértékű variabilitás;

— a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt szövetreplikátumok közötti elfogadható mértékű variabilitás.

Eredmények:

— az egyes vizsgálati vegyi anyagokra, vizsgálatmenetekre és szövetmérésekre vonatkozó adatok, többek között az OD-érték vagy az MTT-formazán csúcsterület, a szövetek százalékos életképessége, a szövetek átlagos százalékos életképessége és a szórások táblázatba foglalása;

— amennyiben alkalmazandó, a közvetlen MTT-redukáló hatású és/vagy elszíneződést okozó vizsgálati vegyi anyagokhoz használt kontrollok eredményei, ideértve az OD-értéket vagy az MTT-formazán csúcsterületet, az NSMTT, az $NSC_{élő}$ és az NSC_{elhalt} arányát, a szórást és a szövetek helyes végső százalékos életképességét;

— a meghatározott vizsgálatmenet és a vizsgálat elfogadhatósági kritériumai tekintetében a vizsgálati vegyi anyaggal/anyagokkal és a kontrollanyagokkal kapott eredmények;

— a megfigyelt egyéb hatások leírása.

— az alkalmazott előrejelzési modellel/döntési kritériumokkal összhangban kialakított osztályozás.

Az eredmények értékelése

Következtetések

SZAKIRODALOM

(1) Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Elérhető a következő címen:http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) EURL-ECVAM (2009). Statement on the „Performance Under UN GHS of Three *In vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards", Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 9 April 2009. Elérhető a következő címen:https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf

(3) OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(4) E melléklet B.4., Akut bőrirritáció/bőrkorrózió fejezete.

(5) E melléklet B.40., *In vitro* bőrkorrózió: transzkután elektromos rezisztencia (TER) vizsgálat című fejezete;

(6) E melléklet B.40bis., *In vitro* bőrkorrózió: rekonstruált emberi felhámmodellen végzett vizsgálati módszer című fejezet.

(7) E melléklet B.65., *In vitro* Membrán barrier vizsgálati módszer fejezete.

(8) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34) Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on *In vitro* Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, *Toxicol. in vitro* 15, 57-93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, *Toxicol. in vitro* 16, 765–770.

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In vitro* Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351-367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinsteen, G. (2005). The *In vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, 329-349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109-129.

(16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559-601.

(17) Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1-α.

(18) Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, 603-619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. and Leclaire, J. (2007). *In vitro* Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, *ALTEX*, 14, 351-358.

(20) EURL-ECVAM (2007). Statement on the Validity of *In vitro* Tests for Skin Irritation, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Elérhető a következő címen:https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf

(21) EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In vitro* Skin Irritation Testing. *Megjegyzés Ezek a két vizsgálati módszer validálásához használt, eredeti teljesítményszabványok. Ezek a teljesítményszabványok már használhatók, mert rendelkezésre áll frissített változatuk (8).*

(22) EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In vitro* Tests for Skin Irritation Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008.https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf

(23) OECD (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No 137), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. and Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol* Sci, 34, 327-334

(25) Katoh, M. and Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, 16, 111-122

(26) OECD (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 159), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(27) OECD (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 155), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. (2012). Validation Study of the *In vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.

(29) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004). *In vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In vitro* 18, 231-243.

(30) Eskes, C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol*.Pharmacol. 62, 393-403).

(31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(32) EpiSkin™ (February 2009). SOP, Version 1.8ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals

(33) EpiDerm™ (Revised March 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).

(34) SkinEthic™ RHE (February 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.

(35) LabCyte (June 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model „LabCyte EPI-MODEL24"

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., and McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Manuscript in preparation.

(37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. 2001. május. Elérhető a következő címen:[http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

(38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, in: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(39) EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *Megjegyzés Ez az ECVAM teljesítményszabványainak aktuális változata, amelyet az ENSZ GHS végrehajtására való tekintettel 2009-ben frissítettek. Ezek a teljesítményszabványok már nem használhatók, mert rendelkezésre áll az e vizsgálati iránymutatáshoz kapcsolódó, frissített változatuk (8).*

(40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009.

(41) EC (2001). Commission Directive 2001/59/EC of 6 August 2001 Adapting to Technical Progress for the 28th Time Council Directive 67/548/EEC on the Approximation of Laws, Regulations and Administrative Provisions Relating to the Classification, Packaging and Labelling of Dangerous Substances, Official Journal of the European Union L225, 1-333.

1. Függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: a vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. E kifejezést gyakran használják az »egyezés« megfelelőjeként, amely egy adott vizsgálati módszer alkalmazásakor az azonos eredmények arányát fejezi ki (9).

Sejtek életképessége: A sejtpopulációk teljes aktivitását mérő paraméter (például a celluláris mitokondriális dehidrogenázoknak az MTT ([3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid, tiazolil kék] vitális festéket redukáló képessége), amely – a mért végponttól és az alkalmazott vizsgálati tervtől függően – korrelációt mutat az élő sejtek teljes számával és/vagy életképességével.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Egyezés: a kategorikus eredményt adó vizsgálati modellek teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. A kifejezést esetenként használják a pontosság megfelelőjeként, és úgy határozzák meg, mint a helyesen pozitívként vagy negatívként besorolt összes vizsgálati vegyi anyag aránya. Az egyezés nagy mértékben függ a vizsgálat tárgyát képező vizsgálati vegyi anyag típusaiban előforduló pozitív eredmények gyakoriságától (9).

ET_{50}: a referencia-vegyianyag meghatározott, állandó koncentrációban történő alkalmazása esetén a sejt életképességének 50 %-kal való csökkentéséhez szükséges expozíciós idő meghatározásával becsülhető meg, lásd még az IC_{50}-et.

GHS (a vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az ENSZ által globálisan harmonizált rendszere): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (1).

HPLC: nagy teljesítményű folyadékkromatográfia.

IATA: integrált vizsgálati és értékelési megközelítés.

IC_{50}: annak a koncentrációnak a meghatározásával becsülhető meg, amelynél egy adott referencia-vegyianyag egy meghatározott expozíciós idő elteltével 50 %-kal (IC_{50}) csökkenti a szövetek életképességét; lásd még az ET_{50}-et.

Végtelen dózis: az epidermiszen alkalmazott vizsgálati vegyi anyag azon mennyisége, amely meghaladja az epidermisz felszínének teljes és egyenletes befedéséhez szükséges mennyiséget.

Keverék: két vagy több anyagot tartalmazó elegy vagy oldat.

Egy összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben az egyik fő összetevő legalább 80 tömegszázalékban van jelen.

MTT: 3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid; tiazolil kék tetrazólium-bromid.

Több összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben egynél több fő összetevő legalább 10 tömegszázalékban, de 80 tömegszázalékot nem meghaladó koncentrációban van jelen. A több összetevőből álló anyag gyártási folyamat eredménye. A keverék és a több összetevőből álló anyag között az a különbség, hogy a keverék két vagy több anyag összekeverésével, kémiai reakció nélkül jön létre. A több összetevőből álló anyag kémiai reakció eredménye.

NSC_{elhalt}: elhalt szöveteken megfigyelt, nem specifikus elszíneződés.

$NSC_{élő}$: élő szöveteken megfigyelt, nem specifikus elszíneződés.

NSMTT: nem specifikus MTT-redukció.

Teljesítményszabványok: hitelesített referenciamódszeren alapuló szabványok, amelyek a javasolt, végrehajtás és funkcionalitás szempontjából hasonló vizsgálati módszer összehasonlíthatósági értékelésének alapjául szolgálnak. Ide tartoznak: i. a vizsgálati módszer alapvető összetevői; ii. a referencia-vegyianyagok minimális jegyzéke, amely a validált vizsgálati módszer által nyújtott teljesítmény elfogadhatóságának igazolására használt vegyi anyagokból került összeállításra; és iii. a validált vizsgálati módszer eredményei alapján meghatározott, hasonló megbízhatósági és pontossági szintek, amelyeket a javasolt vizsgálati módszernek teljesítenie kell a minimális jegyzék referencia-vegyianyagainak felhasználásával történő értékelése során (9).

Pozitív kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó vegyi anyaggal kezelt replikátum. Annak biztosítása érdekében, hogy a pozitív kontrollban jelentkező hatás időbeli változását fel lehessen mérni, a pozitív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Relevancia: a vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálati módszer pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (9).

Megbízhatóság: a vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. A laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság kiszámításával állapítják meg (9).

Helyettesítő vizsgálat: olyan vizsgálat, amelynek célja, hogy a veszélyek azonosítására és/vagy kockázatértékelésre rutinszerűen alkalmazott és elfogadott vizsgálatot helyettesítse, és amelyről megállapították, hogy az elfogadott vizsgálattal összehasonlítva, az összes lehetséges vizsgálati helyzetben és vegyi anyag esetében a humán vagy állati egészség egyenértékű vagy jobb védelmét biztosítja (9).

Vizsgálatmenet: egy vizsgálatmenet során egy vagy több vizsgálati vegyi anyagot vizsgálnak egy párhuzamos negatív kontrollal és egy pozitív kontrollal.

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vizsgálati vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálat helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (9).

In vivo bőrirritáció: a vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően 4 órán belül megjelenő, visszafordítható bőrkárosodás. A bőrirritáció az érintett bőrszöveg helyileg jelentkező reakció, amely röviddel a stimuláció után megjelenik (38). Kiváltó oka a bőrszövet természetes (nem specifikus) immunrendszerét érintő, helyi gyulladásos reakció. Fő jellemzője, hogy gyulladásos reakciókkal járó visszafordítható folyamat a gyulladásos folyamatokra jellemző legtöbb klinikai tünettel együtt (bőrpír, ödéma, viszketés és fájdalom).

Specificitás: a vizsgálat elvégzésével helyesen besorolt összes negatív/inaktív vizsgálati vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (9).

Anyag: olyan természetes állapotban előforduló vagy gyártási eljárásból származó kémiai elem és vegyületei, amely a stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagot és az alkalmazott eljárásból származó szennyező anyagokat is tartalmazhat, de nem tartalmaz olyan oldószert, amely az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltoztatása nélkül elkülöníthető.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

UPLC: ultranagy teljesítményű folyadékkromatográfia.

UVCB: ismeretlen vagy változó összetételű anyagok, valamint komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok.

2. Függelék

A VIZSGÁLATI MÓDSZER ALÁ TARTOZÓ VIZSGÁLATI MODELLEK

Szám	A vizsgálati modell neve	Validálási vizsgálat típusa	Hivatkozások
1	EpiSkin™	Teljes körű prospektív validálási vizsgálat (2003–2007). E modell alkotóelemeit felhasználták arra, hogy meghatározzák a vizsgálati módszernek az ECVAM eredeti és frissített teljesítményszabványaiba felvett alapvető összetevőit (39) (40) (21) (*). Ezenfelül nagyrészt a módszer nem kategorizált és kategorizált anyagok megkülönböztetésével kapcsolatos adatai szolgáltatták az alapot az eredeti teljesítményszabvány specificitási és érzékenységi értékeinek meghatározásához (*).	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (*eredeti*): Az 1. számú modellel együtt ez a modell is részt vett a 2003 és 2007 között végzett teljes körű előretekintő validálásban. E modell alkotóelemeit felhasználták arra, hogy meghatározzák a vizsgálati módszernek az ECVAM eredeti és frissített teljesítményszabványaiba felvett alapvető összetevőit (39) (40) (21) (*). **EpiDerm™ SIT (EPI-200):** Az eredeti EpiDerm™ módosított változatát az ECVAM eredeti teljesítményszabványai (21) alapján validálták 2008-ban (*)	(2) (10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Validálási vizsgálatát az ECVAM eredeti teljesítményszabványai (21) alapján végezték el 2008-ban (*)	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	A validálási vizsgálatot (2011–2012) az OECD 439. vizsgálati iránymutatásában (8) szereplő teljesítményszabványok szerint végezték el, amelyek az ECVAM frissített teljesítményszabványain (*) alapulnak (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) és e vizsgálati iránymutatás teljesítményszabványai (8) (*)

(*) Az ECVAM eredeti teljesítményszabványait (21) 2007-ben dolgozták ki. az előretekintő validálási vizsgálat (16) lezárását követően, amely az 1. és 2. számú vizsgálati modell teljesítményét értékelte az EU veszélyes anyagokról szóló irányelvének (41) 28. módosításában ismertetett osztályozási rendszer szerint. 2008-ban megjelent az ENSZ által készített GHS (1) és az EU CLP-rendelete, amelyek a nem kategorizált anyagokat a kategorizált anyagoktól megkülönböztető határértéket az *in vivo* 2,0-ás pontszámról 2,3-ra módosították. Annak érdekében, hogy az ECVAM teljesítményszabványait e megváltozott szabályozási követelményhez igazítsák, 2009-ben frissítették pontossági értékeit és a referencia-vegyianyagok jegyzékét (2) (39) (40). Az eredeti teljesítményszabványokhoz hasonlóan frissített változatuk is többnyire az 1. és 2. számú modell adataira támaszkodik (16), ugyanakkor kiegészítette azokat a 3. számú modell referencia-vegyianyagokra vonatkozó adataival. 2010-ben az ECVAM frissített teljesítményszabványait írták elő az e vizsgálati iránymutatás keretében használandó teljesítményszabványoknak (8). E vizsgálati módszer alkalmazásában az EpiSkin™ számít validált referenciamódszernek, mivel ezt a modellt használták a teljesítményszabványok összes kritériumának kidolgozásához. A validálási vizsgálatok részletes adatait, a vizsgálatok során nyert adatok gyűjteményét, valamint a teljesítményszabványok ENSZ GHS/CLP-rendelet elfogadásából fakadóan szükségessé vált módosításának hátterét az OECD megfelelő, 439. vizsgálati iránymutatásához mellékelt, ECVAM/BfR által kiadott magyarázó háttérdokumentum (23) tartalmazza.

SIT: Skin Irritation Test (bőrirritációs vizsgálat)

RHE: Reconstructed Human Epidermis (rekonstruált emberi felhám)

3. Függelék

A VIZSGÁLATI MÓDSZERHEZ TARTOZÓ VIZSGÁLATI MODELLEKRE JELLEMZŐ PROTOKOLLPARAMÉTEREK

A rekonstruált emberi felhámmodellek protokollja sok hasonlóságot mutat, például az expozíció utáni inkubációs időszak hossza mindegyiknél 42 óra (32) (33) (34) (35). Az eltérések jórészt a vizsgálati modellek különböző barrierfunkcióihoz kapcsolódó három paraméternél jelentkeznek, ezek a paraméterek a következők: A) preinkubációs idő és a közeg mennyisége, B) a vizsgálati vegyi anyagok alkalmazása és C) a közeg posztinkubációs mennyisége.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Preinkubáció				
Inkubációs idő	18–24 óra	18–24 óra	< 2 óra	15-30 óra
Közeg mennyisége	2 ml	0,9 ml	0,3 vagy 1 ml	0,5 ml
B) A vizsgálati vegyi anyag alkalmazása				
Folyadékok esetén	10 µl (26 µl/cm^2)	30 µl (47 µl/cm^2)	16 µl (32 µl/cm^2)	25 µl (83 µl/cm^2)
Szilárd anyagok esetén	10 mg (26 mg/cm^2) + DV (5 µl)	25 mg (39 mg/cm^2) + DPBS (25 µl)	16mg (32 mg/cm^2) + DV (10 µl)	25 mg (83 mg/cm^2) + DV (25 µl)
Nejlonháló használata	Nem használt	Szükség esetén	Használt	Nem használt
Teljes alkalmazási idő	15 perc	60 perc	42 perc	15 perc
Alkalmazási hőmérséklet	Szobahőm.	a) Szobahőm. 25 percig b) 37 °C-on 35 percig	Szobahőm.	Szobahőm.
C) A közeg posztinkubációs mennyisége				
Közeg mennyisége	2 ml	0,9 ml × 2	2 ml	1 ml
D) Maximális elfogadható eltérés				
A szövetpéldányok közötti szórás	Szórás≤18	Szórás≤18	Szórás≤18	Szórás≤18

SzH: szobahőmérséklet
DV: desztillált víz
DPBS: Dulbecco-féle foszfátpuffert tartalmazó sóoldat

4. Függelék

A REKONSTRUÁLT EMBERI FELHÁMSZÖVETBŐL KIVONT MTT-FORMAZÁN MÉRÉSÉRE HASZNÁLT HPLC/UPLC SPETROFOTOMETRIÁS RENDSZER MINŐSÍTÉSÉNEK FŐBB PARAMÉTEREI ÉS ELFOGADHATÓSÁGI KRITÉRIUMAI

Paraméter	Az FDA-iránymutatás szerinti protokoll (36) (37)	Elfogadhatósági kritériumok
Szelektivitás	Izopropanol elemzése, élő vakpróba (nem kezelt élő RhE-szövetekből kivont izopropanol), elhalt vakpróba (nem kezelt elhalt RhE-szövetekből kivont izopropanol)	$Terület_{interferencia} \leq Terület_{AMHÉ}$ (1) 20 %-a
Precizitás	Minőség-ellenőrzések (vagyis MTT-formazán 1,6 µg/ml, 16 µg/ml és 160 µg/ml mellett) izopropanolban (n=5)	Variációs koefficiens ≤ 15 % vagy ≤ az AMHÉ 20 %-a
Pontosság	Minőség-ellenőrzés izopropanolban (n=5)	Eltérési arány ≤ 15 % vagy ≤ az AMHÉ 20 %-a
Mátrixhatás	Minőség-ellenőrzés élő vakpróbán (n=5)	85 % ≤ Mátrixhatás % ≤ 115 %
Átvitel	Izopropanol elemzése egy FMHÉ (2) szabvány után	$Terület_{interferencia} \leq Terület_{AMHÉ}$ 20 %-a
Megismételhetőség (napon belüli)	3 független kalibrációs görbe (izopropanolba helyezett MTT-formazán 6 egymás utáni 1/3-os hígítása kezdve a FMHÉ-nél, vagyis 200 µg/ml-nél); Minőség-ellenőrzés izopropanolban (n=5)	Kalibrációs görbék: Eltérési arány ≤ 15 % vagy ≤ az AMHÉ 20 %-a
Megismételhetőség (napok közötti)	1. nap:: 1 kalibrációs görbe és minőség-ellenőrzések izopropanolban (n=3) 2. nap:: 1 kalibrációs görbe és minőség-ellenőrzések izopropanolban (n=3) 3. nap:: 1 kalibrációs görbe és minőség-ellenőrzések izopropanolban (n=3)	Minőség-ellenőrzések: Eltérési arány ≤ 15 % és variációs koefficiens ≤ 15 %
Az MTT-formazán rövid távú stabilitása az RhE szövetkivonatban	Minőség-ellenőrzések élő vakpróbán (n=3) a készítés napján és 24 órás szobahőmérsékleten való tárolás után	Eltérési arány ≤ 15 %
Az MTT-formazán hosszú távú stabilitása az RhE szövetkivonatban, ha szükséges	Minőség-ellenőrzések élő vakpróbán (n=3) a készítés napján és több napi, meghatározott hőmérsékleten (pl. 4 °C, -20 °C, -80 °C) történő tárolás után	Eltérési arány ≤ 15 %

(1) AMHÉ: Alsó meghatározási határérték, amely 1–2 %-os szöveti életképességet takar, vagyis 0,8 µg/ml.
(2) FMHÉ: Felső meghatározási határérték, amely legalább kétszer akkora mint a negatív kontroll izopropanolban várható legmagasabb MTT-formazán koncentrációja, vagyis 200 µg/ml. ”

8. A B. rész a következő fejezetekkel egészül ki:

„B.63 **REPRODUKCIÓS/FEJLŐDÉSI TOXICITÁSI SZŰRŐVIZSGÁLAT**

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 421. vizsgálati iránymutatásában (2016) leírt módszerrel. A vegyi anyagok vizsgálatának OECD-iránymutatásait időszakonként felülvizsgálják a tudományos fejlődés fényében. A szűrővizsgálatról szóló eredeti 421. irányelvet 1995-ben fogadták el egy „előzetes reprodukciós toxicitási szűrővizsgálat" protokollja alapján, amelyet két, 1990-ben Londonban (1) és 1992-ben Tokióban (2) megrendezett szakértői találkozón vitattak meg.

2. Az OECD által 1998-ban indított, a meglévő vizsgálati iránymutatások felülvizsgálatára, valamint az endokrin rendszert esetlegesen károsító anyagok kiszűrésére és vizsgálatára vonatkozó új vizsgálati iránymutatások kidolgozására irányuló, kiemelt fontosságú tevékenység (3) folyományaként e vizsgálati módszert frissítették az endokrin rendszert károsító anyagok tekintetében releváns végpontokkal. Az OECD 407. iránymutatását (Rágcsálókon végzett 28 napos, ismételt dózisú orális toxicitási vizsgálat, e melléklet B.7. fejezete) például 2008-ban továbbfejlesztették olyan paraméterek bevezetésével, amelyek alkalmasak a vizsgálati vegyi anyagok endokrin rendszerre gyakorolt hatásának kimutatására. A 421. vizsgálati iránymutatást abból a célból frissítették, hogy azokba a szűrővizsgálatokat érintő vizsgálati iránymutatásokba, amelyek expozíciós időszakai lefedik a fejlődés egyes érzékeny szakaszait (prenatális vagy korai posztnatális időszakokat), bekerüljenek bizonyos, az endokrin rendszert károsító anyagok tekintetében releváns végpontok.

3. Az endokrin rendszert károsító anyagok kiválasztott további releváns végpontjait, amelyek részét képezik a 443. vizsgálati iránymutatásnak is (Kibővített egygenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat, e melléklet B.56. fejezete), belefoglalták a 421. vizsgálati iránymutatásba azon megvalósíthatósági tanulmány alapján, amely a belefoglalásukkal kapcsolatos tudományos és szakmai kérdésekkel, valamint a vizsgálati terv belefoglalásukhoz szükséges lehetséges módosításaival foglalkozott (4).

4. E vizsgálati módszer célja, hogy korlátozott információkat szolgáltasson a vizsgálati vegyi anyagoknak a hím és női szaporodási teljesítményre, azon belül az ivarmirigyek működésére, a párzási viselkedésre, a fogantatásra, a konceptus fejlődésére és az ellésre gyakorolt hatásairól. A módszer nem képezi a meglévő B.31., B.34., B.35. és B.56. vizsgálati módszer alternatíváját, és nem helyettesíti azokat.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK

5. Ez a szűrővizsgálati módszer arra használható, hogy kiindulási pontként szolgáló információkat nyújtson a szaporodásra és/vagy a fejlődésre gyakorolt hatásokról, akár a vegyi anyagokra jellemző toxikológiai tulajdonságok felmérésének korai szakaszában, akár az aggodalomra okot adó vegyi anyagok esetében. Használható emellett olyan létező vegyi anyagok kezdeti szűrővizsgálatainak részeként, amelyekről nem vagy csak csekély mértékben állnak rendelkezésre toxikológiai adatok, továbbá szélesebb körű reprodukciós/fejlődési vizsgálatok dózistartomány-kereső vizsgálataként és egyéb releváns esetekben. A vizsgálatok elvégzése során a klinikai tüneteknek, mint a biztonsági értékeléshez használt kísérleti állatok humánus végpontjainak felismeréséről, értékeléséről és használatáról szóló 19. OECD-iránymutatásban (5) ismertetett vezérelveket és szempontokat kell követni.

6. Ez a vizsgálati módszer nem nyújt teljes körű tájékoztatást a szaporodás és a fejlődés minden vonatkozásáról. Alkalmazhatósága különösen a prenatális expozíció posztnatális tüneteinek, valamint a posztnatális expozíció során előidézett hatások kimutatása tekintetében korlátozott. A dóziscsoportokat alkotó állatok viszonylag csekély száma, a végpontok szelektivitása, valamint a vizsgálat rövid időtartama (és egyéb okok) miatt ez a módszer nem szolgáltat bizonyítékot annak végleges megállapítására, hogy az adott vegyi anyag nem gyakorol hatást. Ezen túlmenően, más reprodukciós/fejlődési toxicitási vizsgálatokból nyert adatok hiányában a pozitív eredmények a veszély kezdeti értékelésére használhatók, illetve hozzájárulnak a további vizsgálatok szükségességére és időzítésére vonatkozó döntésekhez.

7. Az endokrin rendszerrel kapcsolatos paraméterek alkalmazásával kapott eredményeket az OECD endokrin rendszert károsító anyagok vizsgálatára és értékelésére vonatkozó fogalmi keretének összefüggésében kell értelmezni (6). Ebben a fogalmi keretben az OECD továbbfejlesztett 421. vizsgálati iránymutatása a 4. szinten helyezkedik el, mint olyan *in vivo* vizsgálat, amely az endokrin rendszer releváns végpontjaira gyakorolt káros hatásokról szolgáltat adatokat. Egy endokrin jel önmagában azonban még nem tekinthető elegendő bizonyítéknak arra, hogy a vizsgálati vegyi anyag az endokrin rendszert károsító anyag lenne.

8. Ez a vizsgálati módszer a vizsgálati vegyi anyag orális adagolását feltételezi. Más beadási mód alkalmazása esetén szükség lehet a módszer kiigazítására.

9. A vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény.

10. A használt fogalmak meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE

11. A vizsgálati vegyi anyagot fokozatosan növekvő dózisokban kell adagolni hím és nőstény állatok több csoportjának. A hímeket legalább négy hétig kell kezelni, egészen a tervezett elpusztításukat megelőző napig (ez az időtartam magában foglalja a párosztatást megelőző minimum két hetet, a párzási időszakot, valamint a párosztatást követő mintegy két hetes időszakot). Tekintettel a hímek párosztatást megelőző rövid kezelési időszakára, előfordulhat, hogy a termékenység nem kifejezetten érzékeny mutatója a heretoxicitásnak. Ezért a heréken mindenképpen részletes szövettani vizsgálatot kell végezni. A párosztatást megelőző kéthetes kezelési időszak és az azt követően a párzással/termékenységgel kapcsolatban tett megfigyelések, az összesen legalább négy hétig tartó kezelés, majd a hím ivarmirigyek részletes kórszövettani vizsgálata összességében elegendőnek bizonyulnak ahhoz, hogy kimutatható legyen a hím termékenységre és spermatogenezisre gyakorolt hatások többsége.

12. A nőstényeket a vizsgálat teljes időszaka alatt kezelni kell. Ez magában foglalja a párzást megelőző két hetes időszakot (amelynek célja, hogy lefedjen legalább két teljes ivari ciklust), a fogantatáshoz szükséges változó időtartamot, a vemhesség időszakát, az ellést követő legalább tizenhárom napot és a tervezett elpusztítást megelőző napig tartó további kezelést.

13. Az akklimatizációt és az ivari ciklus kezelés előtti felmérését követően megkezdett vizsgálat időtartama a nőstények teljesítményétől függően megközelítőleg 63 nap [legalább 14 napos párosztatás előtti időszak, (legfeljebb) 14 napos párzási időszak, 22 napos vemhesség és 13 napos szoptatás].

14. Az adagolási időszakban az állatokat a toxicitás jeleinek észlelése érdekében minden nap gondosan megfigyelik. A vizsgálati időszak során elpusztult vagy elpusztított állatokat felboncolják, továbbá a vizsgálat befejezése után az életben maradt állatokat is elpusztítják és felboncolják.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Az állatfaj kiválasztása

15. Ezt a vizsgálati módszert patkányok használatára tervezték. Ha az e vizsgálati módszerben meghatározott paramétereket más rágcsálófajon vizsgálják, a döntést részletesen indokolni kell. Az OECD (e melléklet B.7. fejezetének megfelelő) 407. vizsgálati iránymutatása alapján végzett nemzetközi validációs programban a patkány volt az endokrin rendszert károsító anyagok kimutatására használt egyetlen faj. Nem szabad olyan törzseket alkalmazni, amelyek kevéssé termékenyek, vagy amelyekben magas a fejlődési defektusok előfordulási gyakorisága. Korábban vizsgálatban még részt nem vett, egészséges szűz állatokat kell használni. A kísérleti állatokat faj, törzs, nem, súly és kor szerint kell jellemezni. A vizsgálat kezdetén az állatok tömege közötti eltérésnek minimálisnak kell lennie és nem haladhatja meg az ivaronkénti átlag ± 20 %-át. Ha a vizsgálatot egy hosszú távú vagy teljes generáción ál tartó vizsgálat előzetes kísérleteként végzik, ajánlatos mindkét vizsgálathoz ugyanabból a törzsből való, azonos eredetű állatokat használni.

Az állatok tartása és etetése

16. Minden eljárásnak meg kell felelnie a laboratóriumi állatgondozásra vonatkozó helyi szabványoknak. A kísérleti állatok tartására szolgáló helyiség hőmérsékletének 22°C-nak (±3°C) kell lennie. Noha a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, és az – a takarítás időtartamától eltekintve – lehetőség szerint nem haladhatja meg a 70 %-ot, a célértéknek 50–60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmány megválasztását a vizsgálati vegyi anyaggal való megfelelő keveredés igénye is befolyásolhatja, ha a vizsgálati vegyi anyagot a takarmánnyal adják be.

17. Az állatok azonos nemű egyedekből álló kisebb csoportokban tartandók; ha tudományos szempontból indokolt, az állatok egyedileg is elhelyezhetők. Ketrecben való csoportos elhelyezés esetén egy ketrecben legfeljebb öt állat tartható. A pároztatást erre a célra alkalmas ketrecekben kell végezni. A vemhes nőstényeket egyedileg kell elhelyezni, és el kell látni az alom kialakításához használt (fészeképítő) anyaggal. A szoptató nőstények és utódaik számára külön ketrecet kell biztosítani.

18. Rendszeresen ellenőrizni kell, hogy a takarmány nem tartalmaz-e szennyező anyagokat. A takarmányból egy mintát a jelentés véglegesítéséig meg kell őrizni.

Az állatok előkészítése

19. Egészséges, fiatal, ivarérett állatokat osztunk véletlenszerűen a kontroll- és kezelt csoportokba. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisak legyenek a ketrec elhelyezéséből adódó esetleges hatások. Az állatokat az egyedi azonosíthatóság céljából megjelölik, és a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napig a ketrecükben tartják a laboratóriumi körülményekhez való szoktatás céljából.

A dózisok előkészítése

20. A vizsgálati vegyi anyagot ajánlatos orálisan adagolni, kivéve ha más beadási módot tartanak megfelelőbbnek. Orális adagolás esetén a vizsgálati vegyi anyag beadása általában gyomorszondával történik; a vizsgálati vegyi anyagok azonban beadhatók a takarmánnyal vagy az ivóvízzel is.

21. A vizsgálati vegyi anyagot szükség esetén alkalmas vivőanyagban feloldják vagy szuszpendálják. Lehetőség szerint elsősorban vizes oldatot/szuszpenziót ajánlatos alkalmazni, másodsorban olajos (például kukoricacsíra-olajban elkészített) oldatot vagy emulziót, és csak harmadsorban más vivőanyagokban elkészített oldatot. A víztől eltérő vivőanyagok esetében ismerni kell a vivőanyag toxikológiai tulajdonságait. Meg kell határozni továbbá azt is, hogy a vizsgálati vegyi anyag mennyire stabil és homogén az adott vivőanyagban.

ELJÁRÁS

Az állatok száma és neme

22. Az egyes csoportok kiindulási létszámát ajánlatos 10 hím és 12–13 nőstény egyedben meghatározni. Az expozíciót megelőzően felmérik a nőstények ivari ciklusát, és a szokásos 4–5 naptól eltérő időtartamú ciklussal rendelkező állatokat nem használják a vizsgálatban; ezért célszerű néhány plusz nőstényről gondoskodni, hogy végül maradjon csoportonként 10 nőstény. Ha nem mutatkoznak jelentős toxikus tünetek, ezzel a létszámmal várhatóan csoportonként legalább 8 vemhes nőstény biztosítható, ami a vemhes nőstények csoportonkénti elfogadható számának alsó határértéke. A cél az, hogy megfelelő mennyiségű vemhesség és utód jöjjön létre ahhoz, hogy érdemileg fel lehessen mérni a vizsgálati vegyi anyag hatását a termékenységre, a vemhességre, az anyai és a szopási viselkedésre, valamint az F_1 utódnemzedék növekedésére és fejlődésére a fogantatástól az ellést követő 13. napig.

Adagolás

23. Általánosan 3 kezelt csoportot és egy kontrollcsoportot alkalmaznak. A dózisok alapulhatnak az akut toxicitási vizsgálatok adatain vagy az ismételt dózisú vizsgálatok eredményein. A kontrollcsoportba tartozó állatokat a vizsgálati vegyi anyag beadásától eltekintve ugyanolyan módon kell kezelni, mint a vizsgálati csoportokban lévőket. Ha a vizsgálati vegyi anyag beadásához vivőanyagot alkalmaznak, a kontrollcsoportnak a vivőanyagból a felhasznált legnagyobb mennyiséget kell kapnia.

24. A dózisok kiválasztásánál figyelembe veszik a toxicitásra és (toxiko)kinetikára vonatkozóan rendelkezésre álló adatokat. Emellett ügyelni kell arra is, hogy érzékenység tekintetében különbségek lehetnek a vemhes és nem vemhes állatok között. A legmagasabb dózist úgy kell kiválasztani, hogy az toxikus tüneteket keltsen, de ne okozzon halált vagy súlyos szenvedést a kísérleti állatoknak. Ezt követően úgy kell csökkenő sorrendben kiválasztani a kisebb dózisokat, hogy meg lehessen határozni a dózissal összefüggő válaszokat, illetve a legkisebb dózisnál a nem észlelhető káros hatások szintjét (NOAEL). A csökkenő dózisok beállításához gyakran optimális a 2–4-szeres intervallumok alkalmazása, a dózisok közötti nagyon nagy intervallumok (például 10-nél magasabb szorzófaktor) alkalmazásával szemben pedig gyakran előnyben részesítendő egy negyedik vizsgálati csoport beiktatása.

25. Ha általános toxicitást (például testsúlycsökkenést, a májra, a szívre, a tüdőre vagy a vesére kifejtett hatásokat stb.) vagy egyéb, nem feltétlenül toxikus reakcióra utaló változásokat (például csökkent táplálékfogyasztást, májmegnagyobbodást) figyelnek meg, az endokrin rendszer szempontjából érzékeny végpontok tekintetében megfigyelt hatások értelmezésekor óvatosan kell eljárni.

Határérték-vizsgálat

26. Ha egy egyetlen, legalább 1 000 mg/testtömeg-kg/nap orális dózis felhasználásával végzett, vagy táplálékkal vagy ivóvízzel történő beadás esetén a táplálékban vagy ivóvízben ezzel egyenértékű százalékos arány alkalmazásával történő és az itt ismertetett eljárások szerint lefolytatott vizsgálat nem idéz elő észlelhető toxikus hatást, és ha a szerkezet tekintetében rokon anyagokra vonatkozó adatok alapján nem is várható a toxicitás bekövetkezése, a teljes, több dózist átfogó tanulmány elvégzése szükségtelennek tekinthető. Határérték-vizsgálatot kell minden esetben alkalmazni, kivéve, ha a humán expozíció magasabb orális dózis alkalmazását teszi szükségessé. Más típusú beadási módok, így például inhalálás vagy dermális alkalmazás esetén a vizsgálati vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságai gyakran előre jelezhetik a lehetséges koncentráció maximumát.

A dózisok beadása

27. Az állatoknak a vizsgálati vegyi anyagot heti hét napon át, naponta adagolják. Ha a vizsgálati vegyi anyagot szondán át adagolják, lehetőleg egyetlen adagban kell gyomorszondán vagy megfelelő intubációs kanülön át beadni. Az egy alkalommal beadható folyadék maximális mennyisége a kísérleti állat méretétől függ. A térfogat nem haladhatja meg az 1 ml/100 g testtömegarányt, kivéve vizes oldatok esetében, amikor 2 ml/100 g testtömeg-arány is alkalmazható. A magasabb koncentrációértékek esetén rendszerint fokozottabb hatást kiváltó irritatív vagy korrozív vizsgálati vegyi anyagok kivételével a koncentráció megfelelő beállításával a minimálisra kell csökkenteni a vizsgálati vegyi anyag mennyiségének változásait, hogy a mennyiség valamennyi dózisnál konstans legyen.

28. A takarmánnyal vagy ivóvízzel adagolt vizsgálati vegyi anyagok esetében fontos annak biztosítása, hogy a vizsgálati vegyi anyag beadott mennyisége ne zavarja meg a szokásos táplálékfelvételt vagy a vízháztartás egyensúlyát. Ha a vizsgálati vegyi anyagot a táplálékkal együtt adják be, vagy állandó koncentrációban (ppm) keverik be, vagy az állat testsúlyától függő, állandó nagyságú dózisban adagolják; a kiválasztott alternatívát meg kell nevezni. A gyomorszondával bejuttatott vizsgálati vegyi anyagok esetében a dózist mindig a nap hasonló időszakában kell beadni, és legalább hetente újra be kell állítani ahhoz, hogy az állat testtömegéhez viszonyítva állandó értéken lehessen tartani.

A kísérleti program

29. Az adagolást mindkét nem esetében legalább 2 héttel a pároztatás előtt el kell kezdeni, miután az állatok legalább öt napon keresztül akklimatizálódtak, és (egy kéthetes kezelés előtti időszak során) ellenőrizték, hogy a nőstények ivari ciklusa megfelel-e a normál ciklusidőnek. A vizsgálatot úgy kell időzíteni, hogy az ivari ciklus értékelése röviddel a teljes ivarérettség elérését követően megkezdődjön. Ez az egyes laboratóriumokban használt különféle patkánytörzsek függvényében némileg változó, a Sprague-Dawley törzsbe tartozó patkányok esetében például 10 hetes korukban, a Wistar-törzsbe tartozók esetében pedig 12 hetes korukban következik be. Az utódokkal rendelkező anyaállatokat az ellést követő 13. napon vagy röviddel azután el kell pusztítani. A születés napja (vagyis amikor lezárul az ellés) a post-partum 0. napja. Azokat a nőstényeket, amelyek semmi jelét nem mutatják annak, hogy párosodtak volna, a párzási időszak utolsó napját követő 24–26 nappal el kell pusztítani. Az adagolást a párzási időszakban sem szabad abbahagyni egyik nem esetében sem. A hímeket a párzási időszakot követően továbbra is kezelni kell, legalább a minimális, 28 napos adagolási időszak végéig. Ezt követően leölik, vagy ha úgy ítélik megfelelőnek, megtartják azokat, és egy esetleges második pároztatás céljából tovább folytatják kezelésüket.

30. Az anyaállatok napi szintű kezelését folytatni kell a vemhesség teljes időszakán át egészen a post-partum 13. napjáig vagy az elpusztításukat megelőző napig. Azon vizsgálatoknál, amelyek keretében a vizsgálati vegyi anyagot inhalálás vagy dermális alkalmazás útján adják be, a kezelést folytatni kell legalább a vemhesség 19. napjáig, majd a lehető leghamarabb, de legkésőbb a 4. posztnatális napon újra kell kezdeni.

31. A kísérleti ütemterv ábráját a 2. függelék tartalmazza.

A pároztatási eljárás

32. Rendes esetben e vizsgálat során 1:1 (egy hím-egy nőstény) pároztatást kell alkalmazni. Ettől abban az esetben lehet eltekinteni, ha a hímek közül elpusztul valamelyik. A nőstényt egy adott hímmel kell összerakni, és addig kell együtt hagyni azokat, amíg meg nem győződtek a párzás megtörténtéről, vagy 2 hét el nem telik. Minden reggel meg kell vizsgálni, hogy a nőstényben észlelhető-e sperma vagy a hüvelydugó. A vemhesség 0. napja definíció szerint az a nap, amikor a párosodás tényét megerősítették (hüvelydugó vagy sperma figyelhető meg a nőstényben). Ha a pároztatás sikertelen volt, fontolóra lehet venni a nőstények újrapároztatását egy azonos csoportbeli és már sikeresen pároztatott hímmel.

Az alom mérete

33. Az ellés utáni negyedik napon az egyes almok egyedszáma a létszám fölötti kölykök véletlenszerű eltávolításával módosítható, hogy almonként az eredmény – amennyire lehetséges – a használt patkánytörzsre jellemző ivaronkénti négy vagy öt utód legyen. Két létszám feletti kölyöktől vérmintát kell venni, egybe kell gyűjteni és fel kell használni a T4 szérumszintek meghatározásához. A kölykök szelektív, például a testtömeg vagy az anogenitális távolság (AGD) alapján történő eltávolítása nem elfogadható. Ha a hím és nőstény utódok száma nem teszi lehetővé a nemenként négy vagy öt azonos nemű utódot tartalmazó almok kialakítását, részleges kiegyenlítés is elfogadható (például hat hím és négy nőstény). Amennyiben az alom egyedszáma a selejtezési célérték (almonként 8 vagy 10 utód) alá csökkenne, nem kell eltávolítani kölyköket. Ha az alom mérete csupán eggyel haladja meg a selejtezési célértéket, csak egy kölyköt távolítanak el, és attól vesznek vért a T4 szérumszintek esetleges értékelésekhez.

34. Ha nem igazítják ki az alom egyedszámát, az ellést követő 4. napon almonként két kölyköt elpusztítanak, és vérmintát vesznek tőlük a pajzsmirigyhormonok szérumkoncentrációjának méréséhez. Lehetőség szerint az almonkénti két kölyök nőstény legyen, hogy maradjanak hímek az emlőbimbó-visszamaradás megállapításához, kivéve abban az esetben, ha a nőstény utódok eltávolítása miatt nem maradna nőstény a vizsgálat végi értékeléshez. Amennyiben az egyedszám az almonkénti 8 vagy 10 utód alá esne (a használt patkánytörzsre jellemző szokásos alommérettől függően), nem kell eltávolítani kölyköket. Ha az alom egyedszáma csupán eggyel haladja meg az alom szokásos méretét, csak egy kölyköt távolítanak el, és attól vesznek vért a T4 szérumszintek esetleges értékelésekhez.

Megfigyelések élő állatban

Klinikai megfigyelések

35. A vizsgálat teljes időtartama alatt általános klinikai megfigyeléseket legalább naponta kell végezni, vagy gyakrabban, ha toxicitás jelei figyelhetők meg. A megfigyeléseket lehetőleg mindig a nap azonos időszakában/időszakaiban kell végezni, figyelembe véve azt is, hogy a várt hatások a dózis beadása után mikor érik el a maximumukat. Feljegyzést kell készíteni a lényeges magatartászavarokról, az elhúzódó vagy nehéz ellés jeleiről, valamint a toxikus hatásra utaló minden egyéb tünetről, beleértve a mortalitást is. A feljegyzéseknek tartalmazniuk kell a toxicitási tünetek fellépésének időpontját, mértékét és időtartamát.

Testtömeg és táplálék-/vízfogyasztás

36. A hímek és nőstények testsúlyát meg kell mérni az adagolás első napján, majd ezt követően legalább hetente és a vizsgálat végén meg kell ismételni a mérést. A nőstényeket a vemhesség alatt a 0., 7., 14. és 20. napon kell megmérni, továbbá az ellést követő 24 órán belül (a post-partum 0. vagy 1. napján) és legalább a post-partum 4. és 13. napján. A megfigyeléseket minden egyes felnőtt állat esetében külön-külön kell rögzíteni.

37. A pároztatás előtt, valamint a vemhesség és a szoptatás ideje alatt a takarmányfogyasztást legalább hetente kell mérni. A párzási időszak során nem kell feltétlenül mérni a takarmányfogyasztást. Ha a vizsgálati vegyi anyagot az ivóvízzel adagolják, ezen időszakok során a vízfogyasztást is mérni kell.

Ivari ciklus

38. A kezelés megkezdése előtt ellenőrizni kell az ivari ciklust, hogy szabályos ciklussal rendelkező nőstények kerüljenek kiválasztásra a vizsgálathoz (lásd a 22. pontot). Emellett napi szinten kell vizsgálni a hüvelyi kenetet is, a kezelési időszak kezdetétől mindaddig, amíg be nem bizonyosodik, hogy megtörtént a párzás. Ha felmerül a lehetősége annak, hogy az adagolás megkezdése olyan akut stresszhatást idéz elő, amely módosíthatja az ivari ciklust, a laboratóriumok eljárhatnak úgy is, hogy két hétig kezelik a vizsgált állatokat, majd a pároztatás előtti időszakban legalább két hétig naponta hüvelyi kenetet vesznek az ivari ciklus ellenőrzéséhez, amelyet a párzási időszak során is folyamatosan figyelemmel kísérnek egészen a párzás megtörténtéig. A hüvelyi/méhnyaki sejtvétel során Ügyelni kell arra, hogy meg ne sérüljön a nyálkahártya, mert az álvemhességet idézhet elő (7) (8).

Az utódok paraméterei

39. A vemhesség nulladik napjától számítandó terhességi (gesztációs) időszakról feljegyzést kell készíteni. Az ellés után minden almot a lehető leghamarabb meg kell vizsgálni a kölykök számának és ivarának, a halvaszületések, élveszületések és fejletlen egyedek (a megfelelő kontrollcsoportba tartozó kölyköknél jelentősen kisebb utódok) számának, valamint a súlyos rendellenességek jelenlétének megállapításához.

40. Az élő kölyköket meg kell számolni, nemüket meg kell állapítani, és az almok egyedeinek súlyát meg kell mérni a születést követő 24 órán belül (a post-partum 0. vagy 1. napján) és legalább a post-partum 4. és 13. napján. A 35. pontban említett megfigyelések mellett az utódok minden rendellenes viselkedéséről be kell számolni.

41. Az anogenitális távolságot (AGD) minden utódon legalább egy alkalommal meg kell mérni a 0. és 4. posztnatális nap között. A kölykök testtömegét azon a napon kell megmérni, amikor az AGD-t is mérik, és az AGD-t normálni kell a kölykök méretére, ami lehetőleg a testtömeg köbgyöke (9). Az OECD 151. vizsgálati iránymutatásának (10) ajánlása szerint a hím utódok emlőbimbóinak/emlőbimbóudvarainak számát meg kell számolni a 12. vagy 13. posztnatális napon.

Klinikai biokémiai vizsgálatok

42. Vérmintákat egy meghatározott helyről kell venni, az alábbi ütemezés szerint:

— almonként legalább két kölyöktől a születést követő 4. napon, amennyiben azt az utódok száma lehetővé teszi (lásd a 33–34. pontot),

— az összes anyaállattól és almonként legalább két kölyöktől a vizsgálat végét jelentő 13. napon, és

— az összes felnőtt hímtől a vizsgálat végén,

A vérmintákat megfelelő körülmények között tárolják. A 13 napos utódoktól és a felnőtt hímektől vett vérminták alapján értékelik a pajzsmirigyhormon (T4) szérumszinteket. Szükség esetén a T4 további értékeléséhez felhasználhatók az anyaállatoktól és a 4 napos utódoktól vett vérminták. Ha a vizsgálat szempontjából lényeges, más hormonok is mérhetők. A pajzsmirigyhormon analízisekhez almonként egyesíteni lehet a kölyköktől vett vérmintákat. A pajzsmirigyhormonokra (T4 és TSH) vonatkozó mérésekhez lehetőleg a teljes vérmintát kell használni.

43. A hormonok meghatározásának variabilitását és az azzal kapott abszolút koncentrációt az alábbi tényezők befolyásolhatják:

— az elpusztítás időpontja, tekintettel a hormonkoncentrációk nap folyamán tapasztalható ingadozására,

— az állatot érő indokolatlan stressz elkerülése érdekében alkalmazott elpusztítási mód, amely hatással lehet a hormonkoncentrációkra,

— a hormonmeghatározásokhoz alkalmazott, standard görbéjük tekintetében esetlegesen eltérő vizsgálati készletek.

44. A kifejezetten hormon-meghatározási célra szánt plazmamintákat a nap hasonló időpontjában kell gyűjteni. A kereskedelmi fogalomban kapható különböző vizsgálati készletek eltérő számszerű értékeket adnak a hormonkoncentrációk elemzése során.

Patológia

Makroszkópos boncolás

45. A vizsgálat során bekövetkező elpusztítás vagy elhullás időpontjában makroszkóposan meg kell vizsgálni a felnőtt állatokban az esetleges rendellenességeket vagy patológiás elváltozásokat. Külön figyelmet kell szentelni a szaporítószerveknek. A beágyazódási helyek számát fel kell jegyezni. A boncolás napjának reggelén meg kell vizsgálni a hüvelyi kenetet az ivari ciklus aktuális szakaszának meghatározásához, hogy lehetővé váljon a korreláció felállítása a petefészkek kórszövettanával.

46. Az összes hím felnőtt állat heréit és mellékheréit, prosztatáját és ondóhólyagjait a koaguláló mirigyekkel egy egységként meg kell tisztítani minden rátapadt szövettől, és a kiszáradás megelőzése érdekében a boncolást követően a lehető legrövidebb időn belül meg kell mérni nedves tömegüket. Ezen túlmenően további szervtömegmérések végezhetők hímeknél a végbélemelő és a bulbocavernosus izomra, a Cowper-mirigyekre és a glans penisre, nőstényeknél a páros petefészekre (nedves tömeg) és a méhre (valamint a méhnyakra) kiterjedőleg; ha ezeket a szerveket is bevonják a mérésbe, tömegüket a boncolás után lehető leghamarabb meg kell határozni.

47. Az elhullott és a post-partum 13. napján vagy röviddel azután elpusztított utódokat legalább külsőleg alaposan meg kell vizsgálni, hogy láthatók-e rajtuk súlyos rendellenességek. Különös figyelmet kell szentelni a külső ivarszervek vizsgálatának, és ezen belül a rendellenes fejlődés jeleinek. A 13. napon almonként 1 hím és 1 nőstény utód pajzsmirigyét meg kell őrizni.

48. Ezenfelül meg kell őrizni az összes felnőtt állat petefészkeit, heréit, a járulékos ivarszerveket (a méhet és a méhnyakat, a mellékheréket, a prosztatát és az ondóhólyagokat a koaguláló mirigyekkel), a pajzsmirigyet, valamint a makroszkópos vizsgálat során léziókat mutató szerveket. A herék és mellékherék rutinvizsgálatához a formalinos fixálás használata nem ajánlott. E szövetek elfogadható vizsgálati módszere a Bouin-féle vagy a módosított Davidson-féle fixáló használata (11). A tunica albugineán a fixálószer gyors bejutása érdekében tűvel óvatosan sekély szúrást lehet ejteni a szerv mindkét végén.

Kórszövettan

49. Részletes szövettani vizsgálatot kell végrehajtani a legmagasabb dózissal kezelt csoportba és a kontrollcsoportba tartozó állatok petefészkein, heréin és mellékheréin (különös figyelmet fordítva a spermatogenezis szakaszaira és a here intersticiális sejtjeinek felépítésére). Amennyiben szükséges, vizsgálni lehet az utódoktól és a felnőtt állatoktól származó egyéb megőrzött szerveket, például a pajzsmirigyet. A pajzsmirigy súlya a fixálást követően is meghatározható. A megtisztítás a szövetkárosodás elkerülése érdekében ez esetben is igen óvatosan, kizárólag a fixálást követően végzendő el. A szövetkárosodás veszélyeztetheti a kórszövettani elemzést. Ha a legmagasabb dózissal kezelt csoport egyedei esetében elváltozások figyelhetők meg, a vizsgálatokat a többi, más dózissal kezelt csoport egyedeire is ki kell terjeszteni. A kórszövettani iránymutatás (11) további információkat tartalmaz az endokrin szövetek boncolásával, fixálásával, metszeteinek elkészítésével és kórszövettani vizsgálatával kapcsolatban.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

50. Az állatokra vonatkozóan egyedi adatsorokat kell felvenni. Emellett minden adatot táblázatos formában is össze kell foglalni, amelyben minden egyes vizsgálati csoport esetében fel kell tüntetni az állatok számát a vizsgálat kezdetén, a vizsgálat során elpusztult vagy humánus okok miatt exterminált állatok számát, az elhullások és a humánus okok miatti elpusztítások időpontját, a termékeny állatok számát, a vemhes nőstények számát, a toxicitás jeleit mutató állatok számát, a megfigyelt toxicitási tünetek leírását, ezen belül bármely toxikus tünet megjelenésének időpontját, valamint ezek időtartamát és súlyosságát, a kórszövettani elváltozások típusait és az almokra vonatkozó minden idevágó adatot. A 3. mellékletben közzéteszünk egy, a reprodukciós/fejlődési hatások értékelése során nagyon hasznosnak bizonyult táblázatos formájú, összefoglaló jelentést.

51. A vizsgálat korlátozott terjedelme miatt a „szignifikancia” felmérésére szolgáló vizsgálatok formájában végzett statisztikai elemzések számos végpont, különösen a reprodukciós végpontok szempontjából csekély jelentőséggel bírnak. Amennyiben statisztikai elemzésekre támaszkodnak, még a vizsgálat megkezdése előtt olyan módszert kell választani, amelyik megfelel a vizsgált változók eloszlásának. Az anogenitális távolság és az emlőbimbó-visszamaradás statisztikai elemzésének az utódokra vonatkozó egyedi adatokon kell alapulnia, ugyanakkor figyelembe kell vinni az alom által gyakorolt hatásokat. Ahol megfelelő, az elemzés egysége az alom. A kölykök testsúlyára vonatkozó statisztikai elemzésnek a kölykök egyedi adatain kell alapulnia, ugyanakkor figyelembe kell vinni az alom által gyakorolt hatásokat. A csoportok alacsony egyedszáma miatt az esetleg rendelkezésre álló (pl. az alomméretre vonatkozó) korábbi kontrolladatok szintén hasznos segítséget nyújthatnak a vizsgálat értelmezéséhez.

Az eredmények értékelése

52. E toxicitási vizsgálat eredményeit a megfigyelt hatások, valamint a boncolási és mikroszkópos eredmények szempontjából kell értékelni. Az értékelés során ki kell térni a vizsgálati vegyi anyag dózisa és a rendellenességek, ezen belül a súlyos léziók, az azonosított célszervek, a terméketlenség, a klinikai rendellenességek, a csökkent reproduktív teljesítmény és egyedszám, a testtömegváltozások, a mortalitásra gyakorolt hatások és egyéb toxikus hatások megléte vagy hiánya, illetve gyakorisága és súlyossága közötti összefüggésekre.

53. A hímek rövid kezelési időszaka miatt a hímekre gyakorolt reprodukciós hatások felmérése során figyelembe kell venni a herék és mellékherék kórszövettanát, valamint a termékenységre vonatkozó adatokat. A szaporodásra/fejlődésre (pl. alomméretre, anogenitális távolságra, emlőbimbó-visszamaradásra, T4 szérumszintekre) vonatkozólag rendelkezésre álló történeti kontrolladatok szintén hasznos segítséget nyújthatnak a vizsgálat értelmezéséhez.

54. A minőség-ellenőrzéshez javasolt történeti kontrolladatokat gyűjteni, a számszerű adatokhoz pedig kiszámítani a variációs együtthatót, különösen az endokrin rendszert károsító anyagok kimutatásával összefüggő paraméterek tekintetében. Ezek az adatok felhasználhatók összehasonlítási célokra a tényleges vizsgálatok kiértékelése során.

Vizsgálati jelentés

55. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag:

— eredet, gyártási szám, felhasználási határidő, ha rendelkezésre áll;

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, ha ismert;

Egy összetevőből álló anyag:

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai révén jellemezve.

Vivőanyag (ha van):

— a vivőanyag megválasztásának indokolása, ha az nem víz.

Kísérleti állatok:

— használt faj/törzs;

— az állatok száma, kora és neme;

— az állatok származása, tartási körülmények, takarmány stb.;

— az egyes állatok testtömege a vizsgálat kezdetekor;

— patkánytól eltérő faj alkalmazásának indokolása.

Vizsgálati körülmények:

— a dózisok kiválasztásának indokolása;

— a vizsgálati vegyi anyag formulázásával/a takarmány előkészítésével, az elért koncentrációval, a készítmény stabilitásával és homogenitásával kapcsolatos adatok;

— a vizsgálati vegyi anyag beadására vonatkozó részletek;

— átszámítás a vizsgálati vegyi anyagnak a takarmányban/ivóvízben meglévő koncentrációjáról (ppm) a tényleges dózisra (mg/kg testsúly/nap), ha ez alkalmazható;

— a táplálék és víz minőségére vonatkozó részletek;

— a selejtezés során a kölykök kiválasztására használat randomizálási eljárás részletes leírása, ha sor került selejtezésre.

Eredmények:

— testsúly és annak változásai;

— táplálék- és vízfogyasztásra vonatkozó adatok, ha rendelkezésre állnak;

— a toxikus reakciók adatai nemenként és dózisonként, beleértve a termékenységet, a gesztációs időt és a toxicitás egyéb tüneteit is;

— a vemhesség időtartama;

— a szaporodásra, az utódokra, a posztnatális növekedésre stb. gyakorolt toxikus vagy egyéb hatások;

— a klinikai megfigyelések jellege, súlyossága és időtartama (a változások visszafordíthatók-e vagy sem);

— normális vagy abnormális ivari ciklust mutató felnőtt nőstények száma és a ciklus időtartama;

— az élveszületések száma és a beágyazódás utáni veszteség;

— utódok testsúlyadatai;

— az összes utód anogenitális távolsága (és az AGD-mérés napján rögzített testsúlyuk);

— emlőbimbó-visszamaradás a hím utódoknál;

— pajzsmirigyhormonok szintje 13 napos kölyköknél és felnőtt hímeknél (és ha mérték, az anyaállatoknál és 4 napos kölyköknél);

— a szemmel jól látható rendellenességeket mutató utódok száma, a külső nemi szervek makroszkopikus értékelése, a fejletlen utódok száma;

— a vizsgálat során bekövetkezett elhullás ideje, illetve hogy az állatok megélték-e a vizsgálat végét;

— a beágyazódások száma, az alomméret és az almokban lévő egyedek méréskor rögzített testsúlya;

— a testtömeg az elpusztításkor, valamint a szülők szervtömegadatai;

— boncolási eredmények;

— a kórszövettani leletek részletes ismertetése;

— felszívódási adatok (ha vannak);

— adott esetben az eredmények statisztikai feldolgozása.

Az eredmények értékelése.

Következtetések

Az eredmények értelmezése

56. Ez a vizsgálat az ismételt dózisok útján történő kezeléssel összefüggésben kimutatható reprodukciós/fejlődési toxicitás értékelésére szolgál (lásd az 5. és a 6. pontot). Jelezheti a további vizsgálatok szükségességét, és iránymutatást nyújt a későbbi vizsgálatok kialakításához. A szaporodási és fejlődési eredmények értelmezésével kapcsolatban az OECD 43. iránymutatását kell alkalmazni (12). A rágcsálókon végzett endokrin és reprodukciós vizsgálatok szövettani értékeléséről szóló 106. OECD-iránymutatás (11) olyan információkkal szolgál az (endokrin) szervek és a hüvelyi kenet előkészítéséről és értékeléséről, amelyek segítséget nyújthatnak e vizsgálati iránymutatáshoz.

SZAKIRODALOM

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Available upon request at Organisation for Economic and Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Kérésre elérhető a Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezetnél, Párizs.

(3) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Kérésre elérhető a Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezetnél, Párizs.

(4) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(5) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(6) OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment(No 150), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.

(8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(9) Gallavan R.H. Jr, Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. and Reynolds V.L. (1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(10) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(11) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No106), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK (LÁSD MÉG: OECD 150. IRÁNYMUTATÁSA (6))

Androgenitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében természetes androgén hormonokhoz (például a tesztoszteronhoz) hasonló hatást fejtsen ki.

Antiandrogenitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes androgén hormonok (például a tesztoszteron) hatását gátolja.

Antiösztrogenitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes ösztrogén hormonok (például a 17ß-ösztradiol) hatását gátolja.

Antitiroid hatás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes pajzsmirigyhormon (például a $T_{3)}$ hatását gátolja.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Fejlődési toxicitás: reprodukciós toxicitás kifejeződése az utódokban pre-, peri-, posztnatális, szerkezeti vagy funkcionális rendellenességek formájában.

Adagolás: általános fogalom, amely a dózist, valamint az adagolás gyakoriságát és időtartamát foglalja magában.

Dózis: a vizsgálati vegyi anyag beadott mennyisége. A dózist a vizsgálati vegyi anyag súlyának és a kísérleti állat egységnyi testsúlyának napi hányadosaként (például mg/testsúlykilogramm/nap), vagy a takarmányban lévő állandó koncentrációként fejezik ki.

Nyilvánvaló toxicitás: általános fogalom, amely a toxicitás vizsgálati vegyi anyag beadását követően kialakuló egyértelmű tüneteire vonatkozik. E tüneteknek elegendőnek kell lenniük a veszély értékeléséhez, továbbá olyan szintet kell képviselniük, amelynél a beadott dózis növelése várhatóan a toxicitás súlyos jeleinek kialakulásához és valószínű mortalitáshoz vezet.

Termékenységkárosodás: a hím vagy női szaporodási funkciók vagy képesség terén jelentkező rendellenességeket jelenti.

Anyai toxicitás: a vemhes nőstényeket érő káros hatások, amelyek történhetnek specifikusan (közvetlen hatás) vagy nem specifikusan (közvetett hatás).

NOAEL: a „no-observed-adverse-effect level” (nem észlelhető káros hatásszint) rövidítése. Ez a legmagasabb dózis, amelynél még nem figyelhetők meg a kezelés okozta káros hatások.

Ösztrogenitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes ösztrogén hormonokhoz (például a 17ß-ösztradiolhoz) hasonló hatást fejtsen ki.

Reprodukciós toxicitás: az utódoknál jelentkező káros hatásokat és/vagy a hím vagy női szaporodási funkciók vagy képesség csökkenését jelenti.

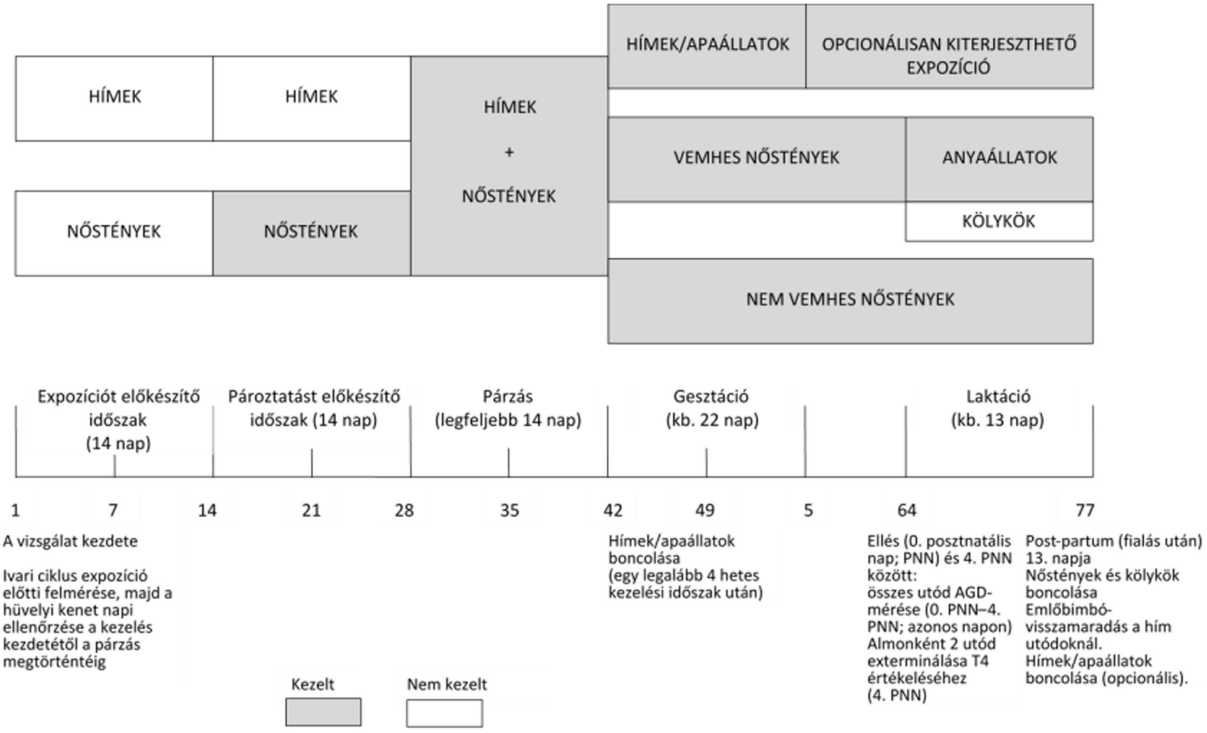
Vizsgálati vegyi anyag: az e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Tiroid hatás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes pajzsmirigyhormonhoz (például a T_3-hoz) hasonló hatást gyakoroljon.

Validáció: tudományos folyamat, amelynek célja egy adott vizsgálati módszer működési követelményeinek és korlátjainak jellemzése, valamint megbízhatóságának és egy adott célhoz kapcsolódó relevanciájának igazolása.

2. függelék

A KÍSÉRLETI ÜTEMTERV ÁBRÁJA, AMELY JELZI A VIZSGÁLAT TELJES 14 NAPOS PÁRZÁSI IDŐSZAKON ALAPULÓ MAXIMÁLIS IDŐTARTAMÁT



3. függelék

TÁBLÁZATOS ÖSSZEFOGLALÓ JELENTÉS A SZAPORODÁSRA/FEJLŐDÉSRE GYAKOROLT HATÁSOKRÓL

MEGFIGYELÉSEK	ÉRTÉKEK				
Adagolás (egységek)	0 (kontroll)	...	...	...	...
Kezdő párok (Sz)					
Ivari ciklus (legalább az átlagos időtartam és az irreguláris ciklusok gyakorisága)					
Bizonyítottan párosított nőstények (Sz)					
Vemhességet elért nőstények (Sz)					
Fogantatás napja 1–5. (Sz)					
Fogantatás napja 6–...([1]) (Sz)					
Vemhesség ≤ 21 nap (Sz)					
Vemhesség = 22 nap (Sz)					
Vemhesség ≥ 23 nap (Sz)					
Élve született utódokkal rendelkező anyaállatok (Sz)					
Post-partum 4. napján élő utódokkal rendelkező anyaállatok (Sz)					
Beágyazódások/anyaállat (átlag)					
Élő utódok/anyaállat az ellésnél (átlag)					
Élő utódok/anyaállat a 4. napon (átlag)					
Ivararány (h/n) az ellésénél (átlag)					
Ivararány (h/n) a 4. napon (átlag)					
Alom egyedsúlya az ellésnél (átlag)					
Alom egyedsúlya a 4. napon (átlag)					
Utódok súlya születéskor (átlag)					
Utódok súlya az AGD-mérés időpontjában (hímek átlaga, nőstények átlaga)					

MEGFIGYELÉSEK	ÉRTÉKEK				
Adagolás (egységek)	0 (kontroll)	...	...	...	...
Utódok AGD-értéke ugyanazon a posztnatális napon, születés – 4. nap (hímek átlaga, nőstények átlaga, posztnatális nap feljegyzése)					
Utódok súlya a 4. napon (átlag)					
Hím utódok emlőbimbó-visszamaradása a 13. napon (átlag)					
Utódok súlya a 13. napon (átlag)					
RENDELLENES UTÓDOK					
Anyaállatok 0-val					
Anyaállatok 1-gyel					
Anyaállatok ≥ 2-vel					
UTÓDOK ELVESZTÉSE					
Prenatális/poszt-implantációs időszak (beágyazódások mínusz élveszületések száma)					
Anyaállatok 0-vel					
Anyaállatok 1-gyel					
Anyaállatok 2-vel					
Anyaállatok ≥ 3-mal					
Posztnatális időszak (élveszületések mínusz a 13. posztnatális napon élők száma)					
Anyaállatok 0-vel					
Anyaállatok 1-gyel					
Anyaállatok 2-vel					
Anyaállatok ≥ 3-mal					

([1]) a párzási időszak utolsó napja

B.64. KOMBINÁLT ISMÉTELT DÓZISÚ TOXICITÁSI VIZSGÁLAT ÉS REPRODUKCIÓS/FEJLŐDÉSI TOXICITÁSI SZŰRŐVIZSGÁLAT

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 422. vizsgálati iránymutatásában (2016) leírt módszerrel. A vegyi anyagok vizsgálatának OECD-iránymutatásait időszakonként felülvizsgálják a tudományos fejlődés fényében. A szűrővizsgálatról szóló eredeti 422. vizsgálati iránymutatást 1996-ban fogadták el a „kombinált ismételt dózisú és reprodukciós/fejlődési szűrővizsgálat" protokollja alapján, amelyet két, 1990-ben Londonban (1) és 1992-ben Tokióban (2) megrendezett szakértői találkozón vitattak meg.

2. Ez a vizsgálati módszer két vizsgálatot ötvöz, egyfelől egy reprodukciós/fejlődési toxicitási szűrővizsgálatot, amely részben a már létező és nagy mennyiségben előállított vegyi anyagokra vonatkozó eredeti módszer alkalmazása során a tagállamokban szerzett tapasztalatokon, részben a pozitív kontrollanyagokkal végzett kísérletekben szerzett ismereteken alapul (3) (4), másfelől egy ismételt dózisú toxicitási vizsgálatot, amely összhangban áll az OECD 407. vizsgálati iránymutatásával (Rágcsálókon végzett 28 napos, ismételt dózisú orális toxicitási tanulmány, e melléklet B.7. fejezete).

3. Az OECD által 1998-ban indított, a meglévő vizsgálati iránymutatások felülvizsgálatára, valamint az endokrin rendszert esetlegesen károsító anyagok kiszűrésére és vizsgálatára vonatkozó új vizsgálati iránymutatások kidolgozására irányuló, kiemelt fontosságú tevékenység (5) folyományaként e vizsgálati módszert frissítették az endokrin rendszert károsító anyagok tekintetében releváns végpontokkal. Ebben az összefüggésben az (e melléklet B.7. fejezetének megfelelő) 407. vizsgálati iránymutatást 2008-ban továbbfejlesztették olyan paraméterekkel, amelyek alkalmasak a vizsgálati vegyi anyagok endokrin rendszerre gyakorolt hatásának kimutatására. A 422. vizsgálati iránymutatást abból a célból frissítették, hogy azokba a szűrővizsgálatokat érintő vizsgálati iránymutatásokba, amelyek expozíciós időszakai lefedik a fejlődés egyes érzékeny szakaszait (prenatális vagy korai posztnatális időszakokat), bekerüljenek bizonyos, az endokrin rendszert károsító anyagok tekintetében releváns végpontok.

4. Az endokrin rendszert károsító anyagok tekintetében releváns kiválasztott végpontokat, amelyek részét képezik a 443. vizsgálati iránymutatásnak is (Kibővített egygenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat, amely e melléklet B.56. fejezetének felel meg), belefoglalták a 422. vizsgálati iránymutatásba azon megvalósíthatósági tanulmány alapján, amely a belefoglalásukkal kapcsolatos tudományos és szakmai kérdésekkel, valamint a vizsgálati terv belefoglalásukhoz szükséges lehetséges módosításaival foglalkozott (6).

5. E vizsgálati módszer célja, hogy korlátozott információkat szolgáltasson a vizsgálati vegyi anyagoknak a hím és női szaporodási teljesítményre, azon belül az ivarmirigyek működésére, a párzási viselkedésre, a fogantatásra, a konceptus fejlődésére és az ellésre gyakorolt hatásairól. A módszer nem képezi a meglévő B.31., B.34., B.35. és B.56. vizsgálati módszer alternatíváját, és nem helyettesíti azokat.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK

6. Egy vizsgálati vegyi anyag toxikus jellemzőinek értékelése és felmérése során az ismételt dózisú orális toxicitást azután lehet meghatározni, hogy az akut vizsgálatok kezdeti eredményei már rendelkezésre állnak. Ez a vizsgálat ismereteket szolgáltat azokról a lehetséges egészségügyi veszélyekről, amelyek egy viszonylag korlátozott időszakon keresztül ismétlődő expozíció következtében alakulhatnak ki. A módszer egy alapvető, ismételt dózisú toxicitási vizsgálatot foglal magában, amely a 90 napos vizsgálatot nem igénylő vegyi anyagok esetén (például abban az esetben, ha az előállított mennyiség nem halad meg bizonyos határértékeket), vagy egy hosszú távú vizsgálat előzetes vizsgálataként alkalmazható. A vizsgálatok elvégzése során a klinikai tüneteknek, mint a biztonsági értékeléshez használt kísérleti állatok humánus végpontjainak felismeréséről, értékeléséről és használatáról szóló 19. OECD-iránymutatásban (7) ismertetett vezérelveket és szempontokat kell követni.

7. A módszer magában foglal továbbá egy reprodukciós/fejlődési toxicitási vizsgálatot, ezért használható arra is, hogy kiindulási pontként szolgáló információkat nyújtson a hím és női szaporodási teljesítményre, azon belül az ivarmirigyek működésére, a párzási viselkedésre, a fogantatásra, a konceptus fejlődésére és az ellésre gyakorolt lehetséges hatásokról, akár a vegyi anyagokra jellemző toxikológiai tulajdonságok felmérésének korai szakaszában, akár az érintett vegyi anyagok esetében. Ez a vizsgálati módszer nem nyújt teljes körű tájékoztatást a szaporodás és a fejlődés minden vonatkozásáról. Alkalmazhatósága különösen a prenatális expozíció posztnatális tüneteinek, valamint a posztnatális expozíció során esetlegesen előidézett hatásoknak a kimutatása tekintetében korlátozott. A végpontok szelektivitása, a vizsgálat rövid időtartama (és egyéb okok) miatt ez a módszer nem szolgáltat bizonyítékot annak végleges megállapítására, hogy az adott vegyi anyag nem gyakorol hatást a szaporodásra/fejlődésre. Ezen túlmenően, más reprodukciós/fejlődési toxicitási vizsgálatokból nyert adatok hiányában a pozitív eredmények a veszély kezdeti értékelésére használhatók, illetve hozzájárulnak a további vizsgálatok szükségességére és időzítésére vonatkozó döntésekhez.

8. Az endokrin rendszerrel kapcsolatos paraméterek alkalmazásával kapott eredményeket az OECD endokrin rendszert károsító anyagok vizsgálatára és értékelésére vonatkozó fogalmi keretének összefüggésében kell értelmezni (8). Ebben a fogalmi keretben az OECD továbbfejlesztett 422. vizsgálati iránymutatása a 4. szinten helyezkedik el, mint olyan *in vivo* vizsgálat, amely az endokrin rendszer releváns végpontjaira gyakorolt káros hatásokról szolgáltat adatokat. Egy endokrin jel önmagában azonban még nem tekinthető elegendő bizonyítéknak arra, hogy a vizsgálati vegyi anyag az endokrin rendszert károsító anyag lenne.

9. A vizsgálati módszer emellett hangsúlyt fektet a neurológiai hatásokra mint különleges végpontra, valamint az állatok gondos klinikai megfigyelésének jelentőségére a lehető legtöbb információ megszerzése érdekében. A módszer segítségével azonosíthatók a neurotoxikus hatással rendelkező vegyi anyagok, ami aztán további alaposabb, ilyen irányú kutatást indokolhat. Mindezek mellett a módszer alapinformációkkal szolgálhat az immunológiai hatásokkal kapcsolatban is.

10. Más szisztémás toxicitási, reprodukciós/fejlődési toxicitási, neurotoxicitási és/vagy immunotoxicitási vizsgálatokból nyert adatok hiányában a pozitív eredmények a veszély kezdeti értékelésére használhatók, illetve hozzájárulnak a további vizsgálatok szükségességére és időzítésére vonatkozó döntésekhez. A vizsgálat különösen hasznosnak bizonyulhat, ha az OECD szűrővizsgálati információs adatkészletének (SIDS) részeként alkalmazzák olyan létező vegyi anyagok értékelésére, amelyekről nem vagy csak csekély mértékben állnak rendelkezésre toxikológiai adatok, továbbá helyettesíthet két különálló vizsgálatot: az OECD 407. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű (e melléklet B.7. fejezetében ismertetett) ismételt dózisú toxicitási vizsgálatot és az OECD 421. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű (e melléklet B.63. fejezetében ismertetett) reprodukciós/fejlődési toxicitási vizsgálatot. Használható ezenkívül szélesebb körű reprodukciós/fejlődési vizsgálatok dózistartomány-kereső vizsgálataként és egyéb releváns esetekben.

11. Általában feltételezhető, hogy érzékenység tekintetében különbségek vannak a vemhes és nem vemhes állatok között. Következésképpen a két vizsgálat külön-külön történő elvégzéséhez képest e kombinált vizsgálat keretében bonyolultabb lehet meghatározni olyan dózisokat, amelyek egyaránt alkalmasak az általános szisztémás toxicitás és a specifikus reprodukciós/fejlődési toxicitás felmérésére. Emellett előfordulhat, hogy az önállóan végzett ismételt dózisú vizsgálathoz viszonyítva a vizsgálati eredmények nehezebben értelmezhetők az általános szisztémás toxicitás szempontjából, különösen akkor, ha a vizsgálat során nem egy időben értékelik a szérumra és a kórszövettanra vonatkozó paramétereket. A kombinált szűrővizsgálat összetettebb jellege miatt annak végrehajtása jelentős tapasztalatot kíván a toxicitási vizsgálatok terén. xxxMásfelől viszont – amellett, hogy kevesebb számú kísérleti állat részvételét igényli – a kombinált vizsgálat hatékonyabb eszközt nyújthat a szaporodásra/fejlődésre gyakorolt közvetlen hatásoknak a másodlagos, egyéb (szisztémás) hatásoktól való elkülönítéséhez.

12. Ebben a vizsgálatban az adagolási időszak hosszabb az ismételt dózisú vizsgálat szokásos 28 napos időtartamánál. Ugyanakkor csoportonként mindkét nemből kevesebb állat szükséges a vizsgálathoz ahhoz képest, mint amikor a reprodukciós/fejlődési toxicitási vizsgálat mellett végezik el a hagyományos 28 napos, ismételt dózisú vizsgálatot.

13. Ez a vizsgálati módszer a vizsgálati vegyi anyag orális adagolását feltételezi. Más beadási mód alkalmazása esetén szükség lehet a módszer kiigazítására.

14. A vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény.

15. A használt fogalmak meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE

16. A vizsgálati vegyi anyagot fokozatosan növekvő dózisokban kell adagolni hím és nőstény állatok több csoportjának. A hímeket legalább négy hétig kell kezelni, egészen a tervezett leölésüket megelőző napig (ez az időtartam magában foglalja a pároztatást megelőző minimum két hetet, a párzási időszakot, valamint a pároztatást követő mintegy két hetes időszakot). Tekintettel a hímek pároztatást megelőző rövid kezelési időszakára, előfordulhat, hogy a termékenység nem kifejezetten érzékeny mutatója a heretoxicitásnak. Ezért a heréken mindenképpen részletes szövettani vizsgálatot kell végezni. A pároztatást megelőző kéthetes kezelési időszak és az azt követően a párzással/termékenységgel kapcsolatban tett megfigyelések, az összesen legalább négy hétig tartó kezelés, majd a hím ivarmirigyek részletes kórszövettani vizsgálata összességében elegendőnek bizonyulnak ahhoz, hogy kimutatható legyen a hím termékenységre és spermatogenezisre gyakorolt hatások többsége.

17. A nőstényeket a vizsgálat teljes időszaka alatt kezelni kell. Ez magában foglalja a párzást megelőző két hetes időszakot (amelynek célja, hogy lefedjen legalább két teljes ivari ciklust), a fogantatáshoz szükséges változó időtartamot, a vemhesség időszakát, az ellést követő legalább tizenhárom napot és a tervezett elpusztítást megelőző napig tartó további kezelést.

18. Az akklimatizációt és az ivari ciklus kezelés előtti felmérését követően megkezdett vizsgálat időtartama a nőstények teljesítményétől függően megközelítőleg 63 nap [legalább 14 napos pároztatás előtti időszak, (legfeljebb) 14 napos párzási időszak, 22 napos vemhesség és 13 napos szoptatás].

19. Az adagolási időszakban az állatokat a toxicitás jeleinek észlelése érdekében minden nap gondosan megfigyelik. A vizsgálat során elpusztult, illetve leölt állatokat felboncolják, illetőleg a vizsgálat befejezése után a túlélő állatokat is leölik és felboncolják.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Az állatfaj kiválasztása

20. Ezt a vizsgálati módszert patkányok használatára tervezték. Ha ebben a 422. vizsgálati iránymutatásban meghatározott paramétereket más rágcsálófajon vizsgálják, a döntést részletesen indokolni kell. A 407. vizsgálati iránymutatás alapján végzett nemzetközi validációs programban a patkány volt az endokrin rendszert károsító anyagok kimutatására használt egyedüli faj. Nem szabad olyan törzseket alkalmazni, amelyek kevéssé termékenyek vagy amelyekben magas a fejlődési defektusok előfordulási gyakorisága. Korábban vizsgálatban még részt nem vett, egészséges szűz állatokat kell használni. A kísérleti állatokat faj, törzs, nem, súly és kor szerint kell jellemezni. A vizsgálat kezdetén az állatok tömege közötti eltérésnek minimálisnak kell lennie és nem haladhatja meg az ivaronkénti átlag ± 20 %-át. Ha a vizsgálatot egy hosszú távú vagy teljes generáción ál tartó vizsgálat előzetes kísérleteként végzik, ajánlatos mindkét vizsgálathoz ugyanabból a törzsből való, azonos eredetű állatokat használni.

Az állatok tartása és etetése

21. Minden eljárásnak meg kell felelnie a laboratóriumi állatgondozásra vonatkozó helyi szabványoknak. A kísérleti állatok tartására szolgáló helyiség hőmérsékletének 22°C-nak (±3 °) kell lennie. A relatív páratartalomnak legalább 30 %-nak kell lennie, és a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmány megválasztását a vizsgálati vegyi anyaggal való megfelelő keveredés igénye is befolyásolhatja, ha a vizsgálati vegyi anyagot a takarmánnyal adják be.

22. Az állatok azonos nemű egyedekből álló kisebb csoportokban tartandók; ha tudományos szempontból indokolt, az állatok egyedileg is elhelyezhetők. Ketrecben való csoportos elhelyezés esetén egy ketrecben legfeljebb öt állat tartható. A pároztatást erre a célra alkalmas ketrecekben kell végezni. A vemhes nőstényeket egyedileg kell elhelyezni, és el kell látni az alom kialakításához használt (fészeképítő) anyaggal. A szoptató nőstények és utódaik számára külön ketrecet kell biztosítani.

23. Rendszeresen ellenőrizni kell, hogy a takarmány nem tartalmaz-e szennyező anyagokat. A takarmányból egy mintát a jelentés véglegesítéséig meg kell őrizni.

Az állatok előkészítése

24. Az egészséges, fiatal, ivarérett állatokat véletlenszerű kiválasztás útján kell a kezelési csoportokba és ketrecekbe osztani. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisak legyenek a ketrec elhelyezéséből adódó esetleges hatások. Az állatokat az egyedi azonosíthatóság céljából megjelölik, és a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napig a ketrecükben tartják a laboratóriumi körülményekhez való szoktatás céljából.

A dózisok előkészítése

25. A vizsgálati vegyi anyagot ajánlatos orálisan adagolni, kivéve ha más beadási módot tartanak megfelelőbbnek. Orális adagolás esetén a vizsgálati vegyi anyag beadása általában gyomorszondával történik; a vizsgálati vegyi anyagok azonban beadhatók a takarmánnyal vagy az ivóvízzel is.

26. A vizsgálati vegyi anyagot szükség esetén alkalmas vivőanyagban feloldják vagy szuszpendálják. Lehetőség szerint elsősorban vizes oldatot/emulziót ajánlatos alkalmazni, másodsorban olajos (például kukoricacsíra-olajban elkészített) oldatot vagy emulziót, és csak harmadsorban más vivőanyagokban elkészített oldatot. A víztől eltérő vivőanyagok esetében ismerni kell a vivőanyag toxikológiai tulajdonságait. Meg kell határozni továbbá azt is, hogy a vizsgálati vegyi anyag mennyire stabil és homogén az adott vivőanyagban.

ELJÁRÁS

Az állatok száma és neme

27. Az egyes csoportok kiindulási létszámát ajánlatos 10 hím és 12–13 nőstény egyedben meghatározni. Az expozíciót megelőzően felmérik a nőstények ivari ciklusát, és a szokásos 4–5 naptól eltérő időtartamú ciklussal rendelkező állatokat nem használják a vizsgálatban; ezért célszerű néhány plusz nőstényről gondoskodni, hogy végül maradjon csoportonként 10 nőstény. Ha nem mutatkoznak jelentős toxikus tünetek, ezzel a létszámmal várhatóan csoportonként legalább 8 vemhes nőstény biztosítható, ami a vemhes nőstények csoportonkénti elfogadható számának alsó határértéke. A cél az, hogy megfelelő mennyiségű vemhesség és utód jöjjön létre ahhoz, hogy érdemileg fel lehessen mérni a vizsgálati vegyi anyag hatását a termékenységre, a vemhességre, az anyai és a szopási viselkedésre, valamint az F_1 utódnemzedék növekedésére és fejlődésére a fogantatástól az ellést követő 13. napig. Ha időközi leölést terveznek, a csoport létszámát a kísérlet során leölni szándékozott állatok számával meg kell növelni. Meg kell fontolni egy további, ivaronként öt állatból álló kísérő csoport alkalmazását a kontrollcsoportban és a legnagyobb adaggal kezelt csoportban, amelyen a kezelés időszakát követően legalább 14 napig megfigyelhető a szisztémás toxikus hatás visszafordíthatósága, tartóssága vagy késleltetett kialakulása. A kísérő csoportba tartozó állatok nem vesznek részt a pároztatásban, ezért nem használhatók a reprodukciós/fejlődési toxicitás értékelésére.

Adagolás

28. Általánosan 3 kezelt csoportot és egy kontrollcsoportot alkalmaznak. Ha nem állnak rendelkezésre megfelelő általános toxikológiai adatok, az alkalmazandó dózisok meghatározása céljából tartománybehatároló vizsgálat végezhető (azonos törzsből való, azonos eredetű állatokon). A kontrollcsoportba tartozó állatokat a vizsgálati vegyi anyag beadásától eltekintve ugyanolyan módon kell kezelni, mint a vizsgálati csoportokban lévőket. Ha a vizsgálati vegyi anyag beadásához vivőanyagot alkalmaznak, a kontrollcsoportnak a vivőanyagból a felhasznált legnagyobb mennyiséget kell kapnia.

29. A dózisok kiválasztásánál figyelembe veszik a toxicitásra és (toxiko)kinetikára vonatkozóan rendelkezésre álló adatokat. Emellett ügyelni kell arra is, hogy érzékenység tekintetében különbségek lehetnek a vemhes és nem vemhes állatok között. A legmagasabb dózist úgy kell kiválasztani, hogy az toxikus tüneteket keltsen, de ne okozzon halált vagy nyilvánvaló szenvedést a kísérleti állatoknak. Ezután az adagokat fokozatosan csökkentik, azzal a céllal, hogy kimutassák az adagolási szinttől függő hatásokat, illetve a legalacsonyabb adagolási szinten a káros hatások hiányát. Sokszor bizonyul optimálisnak a kettő–négyszeres intervallum alkalmazása, a nagyon nagy intervallumok (pl. több mint 10-szeres szorzófaktor) alkalmazása helyett pedig gyakran célszerű egy negyedik vizsgálati csoportot beiktatni.

30. Ha általános toxicitást (például testsúlycsökkenést, a májra, a szívre, a tüdőre vagy a vesére kifejtett hatásokat stb.) vagy egyéb, nem feltétlenül toxikus reakcióra utaló változásokat (például csökkent táplálékfogyasztást, májmegnagyobbodást) figyelnek meg, az endokrin rendszer szempontjából érzékeny végpontok tekintetében megfigyelt hatások értelmezésekor óvatosan kell eljárni.

Határérték-vizsgálat

31. Ha egy egyetlen, legalább 1 000 mg/testtömeg-kg/nap orális dózis felhasználásával végzett, vagy táplálékkal vagy ivóvízzel történő beadás esetén a táplálékban vagy ivóvízben ezzel egyenértékű (a testsúly alapján végzett számításokon alapuló) százalékos arány alkalmazásával történő és az itt ismertetett eljárások szerint lefolytatott vizsgálat nem idéz elő észlelhető toxikus hatást, és ha a szerkezet tekintetében rokon anyagokra vonatkozó adatok alapján nem is várható a toxicitás bekövetkezése, a teljes, több dózist átfogó tanulmány elvégzése szükségtelennek tekinthető. A határérték-vizsgálat alkalmazandó, kivéve, ha az emberi expozíció ennél nagyobb adagolási szint használatát indokolja. Más típusú beadási módok, így például inhalálás vagy dermális alkalmazás esetén a vizsgálati vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságai gyakran előre jelezhetik az expozíció lehetséges maximumát.

A dózisok beadása

32. Az állatoknak a vizsgálati vegyi anyagot heti hét napon át, naponta adagolják. Ha a vizsgálati vegyi anyagot szondán át adagolják, lehetőleg egyetlen adagban kell gyomorszondán vagy megfelelő intubációs kanülön át beadni. Az egy alkalommal beadható folyadék maximális mennyisége a kísérleti állat méretétől függ. A térfogat nem haladhatja meg

az 1 ml/100 g testtömegarányt, kivéve vizes oldatok esetében, amikor 2 ml/100 g testtömegarány is alkalmazható. A magasabb koncentrációértékek esetén rendszerint fokozottabb hatást kiváltó irritatív vagy korrozív vizsgálati vegyi anyagok kivételével a koncentráció megfelelő beállításával a minimálisra kell csökkenteni a vizsgálati vegyi anyag mennyiségének változásait, hogy a mennyiség valamennyi dózisnál konstans legyen.

33. A takarmánnyal vagy ivóvízzel adagolt vizsgálati vegyi anyagok esetében fontos annak biztosítása, hogy a vizsgálati vegyi anyag beadott mennyisége ne zavarja meg a szokásos táplálékfelvételt vagy a vízháztartás egyensúlyát. Ha a vizsgálati vegyi anyagot a táplálékkal együtt adják be, vagy állandó koncentrációban (ppm) keverik be, vagy az állat testsúlyától függő, állandó nagyságú dózisban adagolják; a kiválasztott alternatívát meg kell nevezni. A gyomorszondával bejuttatott vizsgálati vegyi anyagok esetében a dózist mindig a nap hasonló időszakában kell beadni, és legalább hetente újra be kell állítani ahhoz, hogy az állat testtömegéhez viszonyítva állandó értéken lehessen tartani. Ha a kombinált vizsgálatot egy hosszan tartó vagy teljes generáción át tartó toxicitási vizsgálat előkísérleteként végzik, a két vizsgálatban azonos étrendet alkalmaznak.

A kísérleti program

34. Az adagolást mindkét ivar esetében 2 héttel a pároztatás előtt el kell kezdeni, miután az állatok legalább öt napon keresztül akklimatizálódtak, és (egy kéthetes kezelés előtti időszak során) ellenőrizték, hogy a nőstények ivari ciklusa megfelel-e a normál ciklusidőnek. A vizsgálatot úgy kell időzíteni, hogy az ivari ciklus értékelése röviddel a teljes ivarérettség elérését követően megkezdődjön. Ez az egyes laboratóriumokban használt különféle patkánytörzsek függvényében némileg változó, a Sprague-Dawley törzsbe tartozó patkányok esetében például 10 hetes korukban, a Wistar-törzsbe tartozók esetében pedig 12 hetes korukban következik be. Az utódokkal rendelkező anyaállatokat az ellést követő 13. napon vagy röviddel azután el kell pusztítani. Annak érdekében, hogy a vérvétel előtti éjszaka koplaljanak az anyaállatok (ha ez a kiválasztott módszer), nem feltétlenül szükséges ugyanazon a napon elpusztítani az anyaállatot és utódait. A születés napja (vagyis amikor lezárul az ellés) a post-partum 0. napja. Azokat a nőstényeket, amelyek semmi jelét nem mutatják annak, hogy párosodtak volna, a párzási időszak utolsó napját követő 24–26 nappal el kell pusztítani. Az adagolást a párzási időszakban sem szabad abbahagyni egyik nem esetében sem. A hímeket a párzási időszakot követően továbbra is kezelni kell, legalább a minimális, 28 napos adagolási időszak végéig. Ezt követően leölik, vagy ha úgy ítélik megfelelőnek, megtartják azokat, és egy esetleges második pároztatás céljából tovább folytatják kezelésüket.

35. Az anyaállatok napi szintű kezelését folytatni kell a vemhesség teljes időszakán át egészen a post-partum 13. napjáig vagy az elpusztításukat megelőző napig. Azon vizsgálatoknál, amelyek keretében a vizsgálati vegyi anyagot inhalálás vagy dermális alkalmazás útján adják be, a kezelést folytatni kell legalább a vemhesség 19. napjáig, majd a lehető leghamarabb, de legkésőbb a 4. posztnatális napon (PNN) újra kell kezdeni.

36. Amennyiben vizsgálatot követő megfigyelés céljából létrehoztak kísérő csoportot, a csoportba tartozó állatok nem vesznek részt a pároztatásban. Ezeket az állatokat az anyaállatok első tervezett leölését követően még legalább 14 napig tartják kezelés nélkül, hogy megfigyeljék a toxikus hatások késleltetett előfordulását, fennmaradását vagy visszafordíthatóságát.

37. A kísérleti ütemterv ábráját a 2. függelék tartalmazza.

Ivari ciklus

38. A kezelés megkezdése előtt ellenőrizni kell az ivari ciklust, hogy szabályos ciklussal rendelkező nőstények kerüljenek kiválasztásra a vizsgálathoz (lásd a 27. pontot). Emellett napi szinten kell vizsgálni a hüvelyi kenetet is, a kezelési időszak kezdetétől mindaddig, amíg be nem bizonyosodik, hogy megtörtént a párzás. Ha felmerül a lehetősége annak, hogy az adagolás megkezdése olyan akut stresszhatást idéz elő, amely módosíthatja az ivari ciklust, a laboratóriumok eljárhatnak úgy is, hogy két hétig kezelik a vizsgálati állatokat, majd a pároztatás előtti időszakban legalább két hétig naponta hüvelyi kenetet vesznek az ivari ciklus ellenőrzéséhez, amelyet a párzási időszak során is folyamatosan figyelemmel kísérnek egészen a párzás megtörténtéig. A hüvelyi/méhnyaki sejtvétel során ügyelni kell arra, hogy meg ne sérüljön a nyálkahártya, mert az álvemhességet idézhet elő (8) (9).

A pároztatási eljárás

39. Rendes esetben e vizsgálat során 1:1 (egy hím-egy nőstény) pároztatást kell alkalmazni. Ettől abban az esetben lehet eltekinteni, ha a hímek közül elpusztul valamelyik. A nőstényt egy adott hímmel kell összerakni, és addig kell együtt hagyni azokat, amíg meg nem győződtek a párzás megtörténtéről, vagy 2 hét el nem telik. Minden reggel meg kell vizsgálni, hogy a nőstényben észlelhető-e sperma vagy a hüvelydugó. A vemhesség 0. napja definíció szerint az a nap, amikor a párosodás tényét megerősítették (hüvelydugó vagy sperma figyelhető meg a nőstényben). Ha a pároztatás sikertelen volt, fontolóra lehet venni a nőstények újrapároztatását egy azonos csoportbeli és már sikeresen pároztatott hímmel.

Az alom mérete

40. Az ellés utáni negyedik napon az egyes almok egyedszáma a létszám fölötti kölykök véletlenszerű eltávolításával módosítható, hogy almonként az eredmény – amennyire lehetséges – a használt patkánytörzsre jellemző ivaronkénti négy vagy öt utód legyen. Két létszám feletti kölyöktől vérmintát kell venni, egybe kell gyűjteni és fel kell használni a T4 szérumszintek meghatározásához. A kölykök szelektív, például a testtömeg vagy az anogenitális távolság (AGD) alapján történő eltávolítása nem elfogadható. Ha a hím és nőstény utódok száma nem teszi lehetővé a nemenként négy vagy öt azonos nemű utódot tartalmazó almok kialakítását, részleges kiegyenlítés is elfogadható (például hat hím és négy nőstény). Amennyiben az alom egyedszáma a selejtezési célérték (almonként 8 vagy 10 utód) alá csökkenne, nem kell eltávolítani kölyköket. Ha az alom mérete csupán eggyel haladja meg a selejtezési célértéket, csak egy kölyköt távolítanak el, és attól vesznek vért a T4 szérumszintek esetleges értékelésekhez.

41. Ha nem igazítják ki az alom egyedszámát, az ellést követő 4. napon almonként két kölyköt elpusztítanak, és vérmintát vesznek tőlük a pajzsmirigyhormonok szérumkoncentrációjának méréséhez. Lehetőség szerint az almonkénti két kölyök nőstény legyen, hogy maradjanak hímek az emlőbimbó-visszamaradás megállapításához, kivéve abban az esetben, ha a nőstény utódok eltávolítása miatt nem maradna nőstény a vizsgálat végi értékeléshez. Amennyiben az egyedszám az almonkénti 8 vagy 10 utód alá esne (a használt patkánytörzsre jellemző szokásos alommérettől függően), nem kell eltávolítani kölyköket. Ha az alom egyedszáma csupán eggyel haladja meg az alom szokásos méretét, csak egy kölyköt távolítanak el, és attól vesznek vért a T4 szérumszintek esetleges értékelésekhez.

Megfigyelések

42. Naponta legalább egyszer, lehetőleg minden nap ugyanazon időpont(ok)ban általános klinikai megfigyelést kell végezni, figyelembe véve az adagolást követően várható hatások érvényesülésének csúcsidőszakát. Fel kell jegyezni a kísérleti állatok klinikai állapotát. Naponta legalább kétszer meg kell vizsgálni az összes állatot morbiditás és mortalitás szempontjából.

43. Az első expozíció előtt egyszer (az egyedek közötti összehasonlítás érdekében), azt követően pedig legalább hetente egyszer az összes szülőt részletes klinikai vizsgálatoknak kell alávetni. E megfigyeléseket azokon a ketreceken kívül, ahol egyébként tartják őket, lehetőleg egy szabványos karámban, minden alkalommal a nap hasonló időszakában végzik el. A megfigyeléseket gondosan feljegyzik; lehetőleg a vizsgálatot végző laboratórium által meghatározott pontozásos rendszer segítségével. Törekedni kell arra, hogy minimálisak legyenek a kísérleti körülmények közötti eltérések, és hogy a megfigyeléseket lehetőleg olyan megfigyelők végezzék, akik nem tudnak a kezelésről. A feljegyzett észleléseknek ki kell terjedniük többek között a bőr, a szőrzet, a szemek és a nyálkahártyák állapota, a váladékok és kiválasztott anyagok előfordulása, valamint az autonóm aktivitás (például könnyezés, szőrzet felborzolódása, pupillaméret, szokatlan légzési ritmusok) tekintetében megfigyelhető változásokra. A járás, a testtartás és a kézbevételre adott reakció megváltozását, valamint a klónusos vagy tónusos görcsök, sztereotip viselkedés (például túlzott mosdás, megkergülés), az elhúzódó vagy nehéz ellés, illetve bármilyen bizarr viselkedésmód (például öncsonkítás, hátrafelé járás) megfigyelt eseteit is fel kell jegyezni (10).

44. A vizsgálat során egy alkalommal minden csoportból véletlenszerűen kiválasztott öt hímen és öt nőstényen meg kell figyelni a különféle (pl. hallószervi, vizuális, proprioceptív) ingerekre adott szenzoros reaktivitást (8) (9) (11), meg kell mérni a fogóerőt (12) és értékelni kell a motoros aktivitást (13). A követendő eljárásokkal kapcsolatban további részletek a vonatkozó szakirodalomban találhatók. Ettől függetlenül a hivatkozottaktól eltérő alternatív eljárások is alkalmazhatók. A hímek esetében ezeket a funkcionalitási megfigyeléseket az adagolási időszak vége felé, röviddel tervezett leölésük előtt, de még a hematológiai és klinikai kémiai célú vérvételt megelőzően kell elvégezni (lásd az 53–56. pontot és az 1. lábjegyzetet). A nőstényeknek fiziológiai szempontból hasonló állapotban kell lenniük a funkcionalitási vizsgálatok során, ezért célszerű vizsgálatukat röviddel tervezett leölésük előtt, a szoptatás utolsó hetében elvégezni (pl. a 6–13. szoptatási napon). Törekedni kell arra, hogy az anyaállatok és kölykeik a lehető legrövidebb ideig legyenek elválasztva egymástól.

45. A vizsgálat vége felé esedékes, egyszeri funkcionalitási megfigyelések elhagyhatók, ha a vizsgálatot egy azt követő (90 napos) szubkrónikus vagy hosszú távú vizsgálat előzetes tanulmányaként végzik. Ebben az esetben a funkcionalitási megfigyeléseket az utóbbi vizsgálat részeként kell elvégezni. Másrészt az ismételt dózisú vizsgálat során végzett funkcionalitási megfigyelések adatainak megléte segítheti az azt követő szubkrónikus vagy hosszú távú vizsgálat során a dózisok kiválasztását.

46. Kivételes esetekben a funkcionalitási megfigyelések elhagyhatók azon csoportoknál is, amelyek egyébként olyan mértékű toxicitási tüneteket mutatnak, hogy az jelentős mértékben megzavarná a funkcionalitási vizsgálat eredményeit.

47. A vemhesség nulladik napjától számítandó terhességi (gesztációs) időszakról feljegyzést kell készíteni. Az ellés után minden almot a lehető leghamarabb meg kell vizsgálni a kölykök számának és ivarának, a halvaszületések, élveszületések és fejletlen egyedek (a megfelelő kontrollcsoportba tartozó kölyköknél jelentősen kisebb utódok) számának, valamint a súlyos rendellenességek jelenlétének megállapításához.

48. Az élő kölyköket meg kell számolni, nemüket meg kell állapítani, és az almok egyedeinek súlyát meg kell mérni a születést követő 24 órán belül (a post-partum 0. vagy 1. napján) és legalább a post-partum 4. és 13. napján. A szülőkön végzett (43. és 44. pontban említett) megfigyelések mellett az utódok minden rendellenes viselkedéséről be kell számolni.

49. Az anogenitális távolságot (AGD) minden utódon legalább egy alkalommal meg kell mérni a 0. és 4. posztnatális nap között. A kölykök testtömegét azon a napon kell megmérni, amikor az AGD-t is mérik, és az AGD-t normálni kell a kölykök méretére, ami lehetőleg a testtömeg köbgyöke (14). Az OECD 151. vizsgálati iránymutatásának (15) ajánlása szerint a hím utódok emlőbimbóinak/emlőbimbóudvarainak számát meg kell számolni a 12. vagy 13. posztnatális napon.

Testtömeg és táplálék-/vízfogyasztás

50. A hímek és nőstények testsúlyát meg kell mérni az adagolás első napján, majd ezt követően legalább hetente és a vizsgálat végén meg kell ismételni a mérést. A nőstényeket a vemhesség alatt a 0., 7., 14. és 20. napon kell megmérni, továbbá az ellést követő 24 órán belül (a post-partum 0. vagy 1. napján) és legalább a post-partum 4. és 13. napján. A megfigyeléseket minden egyes felnőtt állat esetében külön-külön kell rögzíteni.

51. A párosztatás előtt, valamint a vemhesség és a szoptatás ideje alatt a takarmányfogyasztást legalább hetente kell mérni. A párzási időszak során nem kell feltétlenül mérni a takarmányfogyasztást. Ha a vizsgálati vegyi anyagot az ivóvízzel adagolják, ezen időszakok során a vízfogyasztást is mérni kell.

Hematológia

52. A vizsgálat során egy alkalommal minden csoportból véletlenszerűen kiválasztott öt hímen és öt nőstényen el kell végezni az alábbi hematológiai vizsgálatokat: hematokrit, hemoglobin koncentrációk, vörösvértestszám, retikulocitaszám, leukocitaszám (teljes és differenciált vérkép), trombocitaszám és a véralvadási idő/képesség mérése. Ha a vizsgálati vegyi anyagról vagy annak vélt metabolitjairól ismert vagy feltételezhető, hogy oxidáló tulajdonságokkal rendelkeznek, az említett vizsgálatokon kívül többek között a methemoglobin-koncentrációt és a Heinz-testek előfordulását is meg kell határozni.

53. A vérmintákat egy megnevezett helyről kell levenni. A nőstényeknek fiziológiai szempontból hasonló állapotban kell lenniük a vérvétel során. A vemhesség kialakulásának eltérő időpontjából adódó gyakorlati nehézségek elkerülése érdekében a nőstényektől a párosztatás előtti időszak végén is vehető vérminta ahelyett, hogy közvetlenül az állatok elaltatása előtt vagy az elaltatási folyamat részeként vennék le a mintát. A hímektől viszont célszerű közvetlenül az állatok végleges elaltatása előtt vagy az elaltatási folyamat részeként vérmintát venni. Alternatív megoldásként a hímektől is vehető vér a párosztatás előtti időszak végén, amennyiben a nőstények esetén is ez az időpont került kiválasztásra.

54. A vérmintákat megfelelő feltételek mellett kell tárolni.

Klinikai biokémiai vizsgálatok

55. A szövetekben jelentkező fontosabb toxikus hatások és különösen a vesékre és a májra gyakorolt hatás vizsgálata érdekében a klinikai biokémiai értékek meghatározását az egyes csoportokból kiválasztott öt hím és öt nőstény vérmintáján végzik el. A vérvétel előtti éjszaka ajánlatos az állatokat koplaltatni [1]. A vérplazma- és vérszérum-meghatározások során vizsgálandó elemek: nátrium, kálium, vércukor, összkoleszterin, karbamid, kreatinin, összprotein és albumin, továbbá legalább két, a májsejti hatásokat jelző enzim (pl. alanin-aminotranszferáz, aszpartát-aminotranszferáz és szorbitol dehidrogenáz) és epesavak. Bizonyos körülmények között hasznos információk nyerhetők további (májból vagy máshonnan származó) enzimek, valamint a bilirubin méréséből.

56. Vérmintákat egy meghatározott helyről kell venni, az alábbi ütemezés szerint:

— almonként legalább két kölyöktől a születést követő 4. napon, amennyiben azt az utódok száma lehetővé teszi (lásd a 40–41. pontot),

— az összes anyaállattól és almonként legalább két kölyöktől a vizsgálat végét jelentő 13. napon, és

— az összes felnőtt hímtől a vizsgálat végén.

A vérmintákat megfelelő körülmények között tárolják. A 13 napos utódoktól és a felnőtt hímektől vett vérminták alapján értékelik a pajzsmirigyhormon (T4) szérumszinteket. Szükség esetén a T4 további értékeléséhez felhasználhatók az anyaállatoktól és a 4 napos utódoktól vett vérminták. Ha a vizsgálat szempontjából lényeges, más hormonok is mérhetők. A pajzsmirigyhormon analízisekhez almonként egyesíteni lehet a kölyköktől vett vérmintákat. A pajzsmirigyhormonokra (T4 és TSH) vonatkozó mérésekhez lehetőleg a teljes vérmintát kell használni.

[1] Bizonyos szérum- és a plazmavizsgálatok, főleg a glükóz meghatározása esetén ajánlatos a vizsgálat előtti éjszaka koplaltatni az állatokat. Ennek fő indoka az, hogy a vizsgálatokat megelőző koplaltatás mellőzése szükségszerűen növelné a kapott eredmények variabilitását, ami így megnehezítené a kevésbé jellegzetes hatások felismerését és értelmezését. Más oldalról megközelítve a kérdést, azt is el kell ismerni, hogy az éjszakai koplaltatás befolyásolja a (vemhes) állatok rendes anyagcseréjét, zavarólag hat a szoptatási és gondozási viselkedésre, és különösen azon vizsgálatok esetében, ahol a vizsgálati vegyi anyagot a táplálékkal adagolják, és zavarhatja a vizsgálati vegyi anyaggal való napi kezelést. Ha az éjszakai koplaltatás mellett döntenek, a klinikai biokémiai paramétereket a hímekkel végzett vizsgálat negyedik hetében, a funkcionális megfigyeléseket követően kell meghatározni. Az anyaállatokat a kölykök például 13. posztnatális napon történő eltávolítását követően még egy további napig meg kell tartani. Az anyaállatokat a szoptatás 13–14. napjától koplaltatni kell éjszakánként, és a leöléskor levett vérmintájukat kell felhasználni a klinikai kémiai paraméterek meghatározásához.

57. Kiegészítésként, a vizsgálat utolsó hetében, amikor a vizeletet előre meghatározott időpontokban gyűjtik, az alábbi vizeletminta-vizsgálatokat lehet elvégezni az egyes csoportokból véletlenszerűen kiválasztott öt hím tekintetében: megjelenés, mennyiség, ozmolalitás vagy fajsúly, pH-érték, fehérjék, glukóz és vér/vérsejtek.

58. Ezeken túlmenően megfontolható az általános szöveti roncsolódás szérummarkereinek vizsgálata. Más vizsgálatokat is elvégeznek, ha a vizsgálati vegyi anyagnak ismert vagy feltételezhető hatása van a kapcsolódó anyagcsere-folyamatokra; ilyen pl. a kalcium, a foszfát, éhgyomorra mért triglicerid és glukóz, egyes hormonok, a methemoglobin és a kolinészteráz mérése. Ezeket eseti alapon kell meghatározni.

59. A hormonok meghatározásának variabilitását és az azzal kapott abszolút koncentrációt az alábbi tényezők befolyásolhatják:

— az elpusztítás időpontja, tekintettel a hormonkoncentrációk nap folyamán tapasztalható ingadozására,

— az állatot érő indokolatlan stressz elkerülése érdekében alkalmazott elpusztítási mód, amely hatással lehet a hormonkoncentrációkra,

— a hormonmeghatározásokhoz alkalmazott, standard görbéjük tekintetében esetlegesen eltérő vizsgálati készletek.

60. A kifejezetten hormon-meghatározási célra szánt plazmamintákat a nap hasonló időpontjában kell gyűjteni. A kereskedelmi fogalomban kapható különböző vizsgálati készletek eltérő számszerű értékeket adnak a hormonkoncentrációk elemzése során.

61. Ha a rendelkezésre álló kiinduló adatok nem bizonyulnak elegendőnek, megfontolandó a hematológiai és klinikai biokémiai változók meghatározása az adagolás kezdete előtt, lehetőség szerint az állatok egy, a kísérleti csoportokba nem tartozó csoportjánál. Nőstények esetében az adatok szoptató anyaállatokról kell származzanak.

PATOLÓGIA

Makroszkópos boncolás

62. A vizsgálatokba bevont összes ivarérett állatot teljes körű, beható autopsziának kell alávetni, ideértve a következők alapos vizsgálatát: a test külső felszíne, az összes testnyílás, a koponya, a mellüreg, a hasüreg és ezek tartalma. Külön figyelmet kell szentelni a szaporítószerveknek. A beágyazódási helyek számát fel kell jegyezni. A boncolás napján meg kell vizsgálni a hüvelyi kenetet az ivari ciklus aktuális szakaszának meghatározásához, hogy lehetővé váljon a korreláció felállítása a női szaporítószervek kórszövettanával.

63. Az összes hím felnőtt állat heréit és mellékheréit, prosztatáját és ondóhólyagjait a koaguláló mirigyekkel egy egységként meg kell tisztítani minden rátapadt szövettől, és a kiszáradás megelőzése érdekében a boncolást követően a lehető legrövidebb időn belül meg kell mérni nedves tömegüket. Ezen túlmenően további szervtömegmérések végezhetők hímeknél a végbélemelő és a bulbocavernosus izomra, a Cowper-mirigyekre és a glans penisre, nőstényeknél a páros petefészekre (nedves tömeg) és a méhre (valamint a méhnyakra) kiterjedőleg; ha ezeket a szerveket is bevonják a mérésbe, tömegüket a boncolás után lehető leghamarabb meg kell határozni. Meg kell őrizni az összes felnőtt állat petefészkeit, heréit, mellékheréit, a járulékos ivarszerveket, valamint a makroszkópikus léziókat mutató szerveket.

64. Ezenfelül a későbbi tervezett kórszövettani vizsgálatok szempontjából leginkább megfelelő fixálószerben meg kell őrizni valamennyi felnőtt hím és nőstény, továbbá minden alomból egy hím és egy nőstény 13 napos kölyök pajzsmirigyét. A pajzsmirigy súlya a fixálást követően is meghatározható. A megtisztítás a szövetkárosodás elkerülése érdekében ez esetben is igen óvatosan, kizárólag a fixálást követően végzendő el. A szövetkárosodás veszélyeztetheti a kórszövettani elemzést. A vérmintákat egy megnevezett helyről kell venni, közvetlenül az állatok végleges elaltatása előtt vagy aközben, és azokat megfelelő körülmények között kell tárolni (lásd a 56. pontot).

65. Ezen túlmenően (a haldokló és/vagy a vizsgálat vége előtt elaltatott egyedeken kívül) minden csoportból véletlenszerűen kiválasztott legalább öt felnőtt hím és nőstény máját, veséit, mellékveséit, csecsemőmirigyét, lépét, agyát és szívét megtisztítják minden rátapadt szövettől, és a kiszáradás megelőzése érdekében a boncolást követő lehető legrövidebb időn belül megmérik nedves tömegüket. Az alábbi testszöveteket konzerválni kell a szövetek típusa és a szándékolt későbbi kórszövettani vizsgálatok szempontjából legmegfelelőbb fixálószerben: szövetet, amelyen van makroszkopikus lézió, az agyat (jellemző részeket, mint pl. a nagyagy, a kisagy, a nyúltagyi híd), a gerincvelőt, a szemet, a gyomrot, a vékony- és vastagbelet (beleértve a Payer-plakkot), a májat, a veséket, a mellékveséket, a lépet, a szívet, a csecsemőmirigyet, a légcsövet és a tüdőket (utóbbit először megtöltik fixálószerrel, és úgy merítik alá), az

ivarmirigyeket (heréket és petefészkeket), a járulékos nemi szerveket (a méhet és a méhnyakat, a mellékheréket, a prosztatát és az ondóhólyagokat a koaguláló mirigyekkel), a hüvelyt, a húgyhólyagot, a nyirokcsomókat (a legközelebbi elvezető nyirokcsomó mellett a laboratórium tapasztalata alapján másik nyirokcsomót is vételezni kell (16)), a perifériás idegeket (csípő vagy sípcsont környéki), lehetőleg az izomzathoz közeli helyről véve, a vázizomzatot és csontot a csontvelővel együtt (metszetet és/vagy egy, friss csontvelőből felszívott mintát). A herék fixálását javasolt Bouin- vagy módosított Davidson-féle fixálószerbe merítéssel végezni (16) (17) (18); e szövetek esetében formalinos fixálás használata nem ajánlott. A tunica albugineán a fixálószer gyors bejutása érdekében tűvel óvatosan sekély szúrást lehet ejteni a szerv mindkét végén. A klinikai és más jellegű megfigyelések alapján további testszövetek vizsgálata is szükséges lehet. A fentieken túl meg kell őrizni minden olyan más szervet is, amely a vizsgálati vegyi anyag ismert tulajdonságai alapján valószínűleg célszervnek tekinthető.

66. Az alábbi szövetek értékes információkat nyújthatnak az endokrin rendszerre gyakorolt hatásokról: ivarmirigyek (petefészkek és herék), járulékos ivarszervek (méh és méhnyak, mellékherék, ondóhólyagok a koaguláló mirigyekkel, a prosztata dorzolaterális és ventrális része), hüvely, agyalapi mirigy, hím emlőmirigy és mellékvese. A hím emlőmirigyek elváltozásairól nem áll rendelkezésre kellő dokumentáció, azonban ez a paraméter igen érzékeny lehet az ösztrogénhatású anyagokra. A 65. pontban nem szereplő szervek/szövetek megfigyelése nem kötelező.

67. Az elhullott és a post-partum 13. napján vagy röviddel azután elpusztított utódokat legalább külsőleg alaposan meg kell vizsgálni, hogy láthatók-e rajtuk súlyos rendellenességek. Különös figyelmet kell szentelni a külső ivarszervek vizsgálatának, és ezen belül a rendellenes fejlődés jeleinek.

Kórszövettan

68. A kontrollcsoport és a magas dózissal kezelt csoport kiválasztott egyedeinek tartósított szerveit és szöveteit teljes kórszövettani vizsgálatnak vetik alá (különös figyelmet fordítva a hím ivarmirigyek spermatogenezisének szakaszaira és a here intersticiális sejtfelépítésének kórszövettanára). Szükség esetén vizsgálni lehet az utódoktól és a fennmaradó felnőtt állatoktól származó pajzsmirigyet. Ha a magas dózissal kezelt csoport egyedei esetében a kezelésnek tulajdonítható elváltozások figyelhetők meg, e vizsgálatokat ki kell terjeszteni más dózissal kezelt csoportok egyedeire is. A kórszövettani iránymutatás (10) további információkat tartalmaz az endokrin szövetek boncolásával, fixálásával, metszeteinek elkészítésével és kórszövettani vizsgálatával kapcsolatban.

69. Minden makroszkopikus léziót meg kell vizsgálni. A NOAEL értelmezéséhez segítséget nyújthat más dózissal kezelt csoportokból származó célszervek vizsgálata, különösen azokból, amelyekben a kezelés állítólag nem járt káros hatással.

70. Kísérő csoport használata esetén azon szerveken és szöveteken kell kórszövettani vizsgálatot végezni, amelyeknél a kezelt csoportok egyedei esetében elváltozásokat lehetett kimutatni.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

71. Az állatokra vonatkozóan egyedi adatsorokat kell felvenni. Emellett minden adatot táblázatos formában is össze kell foglalni, amelyben minden egyes vizsgálati csoport esetében fel kell tüntetni az állatok számát a vizsgálat kezdetén, a vizsgálat során elpusztult vagy humánus okok miatt elaltatott állatok számát, az elhullások és az eutanáziák időpontját, a termékeny állatok számát, a vemhes nőstények számát, a toxicitás jeleit mutató állatok számát, a megfigyelt toxicitási tünetek leírását, ezen belül bármely toxikus tünet megjelenésének időpontját, valamint ezek időtartamát és súlyosságát, a kórszövettani elváltozások típusait és az almokra vonatkozó minden idevágó adatot. A 3. mellékletben közzéteszünk egy, a reprodukciós/fejlődési hatások értékelése során nagyon hasznosnak bizonyult, táblázatos formájú összefoglaló jelentést.

72. A számszerű eredményeket lehetőség szerint megfelelő és általánosan elfogadott statisztikai módszer alkalmazásával kell kiértékelni. A hatás dózistartomány mentén történő összehasonlításaival kiküszöbölhető a több t-próba alkalmazása. A statisztikai módszereket a vizsgálat tervezésekor kell megválasztani. Az anogenitális távolság és az emlőbimbó-visszamaradás statisztikai elemzésének az utódokra vonatkozó egyedi adatokon kell alapulnia, ugyanakkor figyelembe kell vinni az alom által gyakorolt hatásokat. Ahol megfelelő, az elemzés egysége az alom. A kölykök testsúlyára vonatkozó statisztikai elemzésnek a kölykök egyedi adatain kell alapulnia, ugyanakkor figyelembe kell vinni az alom által gyakorolt hatásokat. A vizsgálat korlátozott terjedelme miatt a „szignifikancia” felmérésére szolgáló vizsgálatok formájában végzett statisztikai elemzések számos végpont, különösen a reprodukciós végpontok szempontjából csekély jelentőséggel bírnak. A legelterjedtebb módszerek némelyike – különösen a központi érték mérésére szolgáló paraméteres próbák – nem megfelelők. Amennyiben statisztikai elemzésekre támaszkodnak, még a vizsgálat megkezdése előtt olyan módszert kell választani, amelyik megfelel a vizsgált változók eloszlásának.

Az eredmények értékelése

73. E toxicitási vizsgálat eredményeit a megfigyelt hatások, valamint a boncolási és mikroszkópos eredmények szempontjából kell értékelni. Az értékelés során ki kell térni a vizsgálati vegyi anyag dózisa és a rendellenességek, ezen belül a súlyos léziók, az azonosított célszervek, a terméketlenség, a klinikai rendellenességek, a csökkent reproduktív teljesítmény és egyedszám, a testtömegváltozások, a mortalitásra gyakorolt hatások és egyéb toxikus hatások megléte vagy hiánya, illetve gyakorisága és súlyossága közötti összefüggésekre.

74. A hímek rövid kezelési időszaka miatt a hímekre gyakorolt reprodukciós hatások felmérése során figyelembe kell venni a herék és mellékherék kórszövettanát, valamint a termékenységre vonatkozó adatokat. A szaporodásra/fejlődésre (pl. alomméretre, anogenitális távolságra, emlőbimbó-visszamaradásra, T4 szérumszintekre) vonatkozólag rendelkezésre álló korábbi kontrolladatok szintén hasznos segítséget nyújthatnak a vizsgálat értelmezéséhez.

75. A minőség-ellenőrzéshez javasolt történeti kontrolladatokat gyűjteni, a számszerű adatokhoz pedig kiszámítani a variációs együtthatót, különösen az endokrin rendszert károsító anyagok kimutatásával összefüggő paraméterek tekintetében. Ezek az adatok felhasználhatók összehasonlítási célokra a tényleges vizsgálatok kiértékelése során.

Vizsgálati jelentés

76. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag:

— eredet, gyártási szám, felhasználási határidő, ha rendelkezésre áll;

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, ha ismert;

Egy összetevőből álló anyag:

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai révén jellemezve.

Vivőanyag (ha van):

— a vivőanyag kiválasztásának indokolása, ha az nem víz.

Kísérleti állatok:

— használt faj/törzs;

— az állatok száma, kora és neme;

— az állatok származása, tartási körülmények, takarmány stb.;

— az egyes állatok testtömege a vizsgálat kezdetekor;

— patkánytól eltérő faj alkalmazásának indokolása.

Vizsgálati körülmények:

— a dózisok kiválasztásának indokolása;

— a vizsgálati vegyi anyag formulázásával/a takarmány előkészítésével, az elért koncentrációval, a készítmény stabilitásával és homogenitásával kapcsolatos adatok;

— a vizsgálati vegyi anyag beadására vonatkozó részletek;

— átszámítás a vizsgálati vegyi anyagnak a takarmányban/ivóvízben meglévő koncentrációjáról (ppm) a tényleges dózisra (mg/kg testsúly/nap), ha ez alkalmazható;

— a táplálék és víz minőségére vonatkozó részletek;

— a selejtezés során a kölykök kiválasztására használat randomizálási eljárás részletes leírása, ha sor került selejtezésre.

Eredmények:

— testsúly és annak változásai;

— táplálék- és vízfogyasztásra vonatkozó adatok, ha alkalmazható;

— a toxikus reakciók adatai nemenként és dózisonként, beleértve a termékenységet, a gesztációs időt és a toxicitás egyéb

— tüneteit is;

— a vemhesség időtartama; a szaporodásra, az utódokra, a posztnatális növekedésre stb. gyakorolt toxikus vagy egyéb hatások;

— a klinikai megfigyelések jellege, súlyossága és időtartama (a változások visszafordíthatók-e vagy sem);

— az érzékszervi aktivitás, a szorítási erősség és a motoros aktivitás értékelése;

— hematológiai vizsgálatok eredményei, a megfelelő viszonyítási értékekkel;

— a klinikai biokémiai vizsgálatok eredményei, a megfelelő viszonyítási értékekkel;

— normális vagy abnormális ivari ciklust mutató felnőtt nőstények száma és a ciklus időtartama;

— az élveszületések száma és a beágyazódás utáni veszteség;

— a szemmel látható rendellenességeket mutató kölykök száma; a külső nemi szervek makroszkopikus értékelése, a fejletlen utódok száma;

— a vizsgálat során bekövetkezett elhullás ideje, illetve hogy az állatok megélték-e a vizsgálat végét;

— a beágyazódások száma, az alomméret és az almokban lévő egyedek méréskor rögzített testsúlya;

— utódok testsúlyadatai;

— az összes utód anogenitális távolsága (és az AGD-mérés napján rögzített testsúlyuk);

— emlőbimbó-visszamaradás a hím utódoknál;

— pajzsmirigyhormonok szintje 13 napos kölyköknél és felnőtt hímeknél (az anyaállatoknál és 4 napos kölyköknél, ha mérték);

— a testtömeg az elpusztításkor, valamint a szülők szervtömegadatai;

— boncolási eredmények;

— a kórszövettani leletek részletes ismertetése;

— felszívódási adatok (ha vannak);

— adott esetben az eredmények statisztikai feldolgozása.

Az eredmények értékelése.

Következtetések

Az eredmények értelmezése

77. Ez a vizsgálat az ismételt dózisok útján történő kezeléssel összefüggésben kimutatható reprodukciós/fejlődési toxicitás értékelésére szolgál. Különösen mivel mind az általános toxicitási, mind a reprodukciós/fejlődési végpontokra hangsúlyt fektetnek, a vizsgálat eredményei lehetővé teszik az általános toxicitás hiányában is fellépő reprodukciós/fejlődési hatások megkülönböztetését azoktól, amelyek csak a szülőkre is toxikus szintek mellett fejeződnek ki (lásd a 7–11. pontot). Jelezheti a további vizsgálatok szükségességét, és iránymutatást nyújthat a későbbi vizsgálatok kialakításához. A szaporodási és fejlődési eredmények értelmezésével kapcsolatban az OECD 43. iránymutatását kell alkalmazni (19). A rágcsálókon végzett endokrin és reprodukciós vizsgálatok szövettani értékeléséről szóló 106. OECD-iránymutatás (16) olyan információkkal szolgál az (endokrin) szervek és a hüvelyi kenet előkészítéséről és értékeléséről, amelyek segítséget nyújthatnak e vizsgálati módszerhez.

SZAKIRODALOM

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Kérésre elérhető a Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezetnél, Párizs

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Kérésre elérhető a Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezetnél, Párizs

(3) Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M. Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami, M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. and Hayashi Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). J. *Toxicol,* Sci., 19, 141-149.

(4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. and Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. Fundam. Appl. *Toxicol.*, 18, 89-95.

(5) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, kérésre elérhető a Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezetnél, Párizs

(6) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M.and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84-97.

(9) Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (Eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(10) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document (No 60).

(11) Moser V.C., McDaniel K.M. and Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol*. Appl. *Pharmacol*., 108, 267-283.

(12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. and Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. *Toxicol*., 1, 233-236.

(13) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13, 599-609.

(14) Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds. (1999). „Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights", Reproductive Toxicology, 13: 383–390.

(15) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151). Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(16) OECD (2009).Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 106) Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(17) Hess RA and Moore BJ. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (Eds.). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

(18) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol*. 30, 524-533.

(19) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(20) OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK (LÁSD MÉG AZ OECD 150. IRÁNYMUTATÁSÁT (20))

Androgenitás egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében természetes androgén hormonokhoz (például a tesztoszteronhoz) hasonló hatást fejtsen ki.

Antiandrogenitás egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes androgén hormonok (például a tesztoszteron) hatását gátolja.

Antiösztrogenitás egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes ösztrogén hormonok (például a 17ß-ösztradiol) hatását gátolja.

Antitiroid hatás egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes pajzsmirigyhormon (például a T_3) hatását gátolja.

Vegyi anyag anyag vagy keverék.

Fejlődési toxicitás reprodukciós toxicitás kifejeződése az utódokban pre-, peri-, posztnatális, szerkezeti vagy funkcionális rendellenességek formájában.

Dózis a vizsgálati vegyi anyag beadott mennyisége. A dózist a vizsgálati vegyi anyag súlyának és a kísérleti állat egységnyi testsúlyának napi hányadosaként (például mg/testsúlykilogramm/nap), vagy a takarmányban lévő állandó koncentrációként fejezik ki.

Adagolás általános fogalom, amely a dózist, valamint az adagolás gyakoriságát és időtartamát foglalja magában.

Nyilvánvaló toxicitás általános fogalom, amely a toxicitás vizsgálati vegyi anyag beadását követően kialakuló egyértelmű tüneteire vonatkozik. E tüneteknek elegendőnek kell lenniük a veszély értékeléséhez, továbbá olyan szintet kell képviselniük, amelynél a beadott dózis növelése várhatóan a toxicitás súlyos jeleinek kialakulásához és valószínű mortalitáshoz vezet.

Termékenységkárosodás a hím vagy női szaporodási funkciók vagy képesség terén jelentkező rendellenességeket jelenti.

Anyai toxicitás a vemhes nőstényeket érő, a vemhességhez kapcsolható káros hatások, amelyek történhetnek specifikusan (közvetlen hatás) vagy nem specifikusan (közvetett hatás).

NOAEL a „no-observed-adverse-effect level” (nem észlelhető káros hatásszint) rövidítése. Ez a legmagasabb dózis, amelynél még nem figyelhetők meg a kezelés okozta káros hatások.

Ösztrogenitás egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes ösztrogén hormonokhoz (például a 17ß-ösztradiolhoz) hasonló hatást fejtsen ki.

Reprodukciós toxicitás az utódoknál jelentkező káros hatásokat és/vagy a hím vagy női szaporodási funkciók vagy képesség csökkenését jelenti.

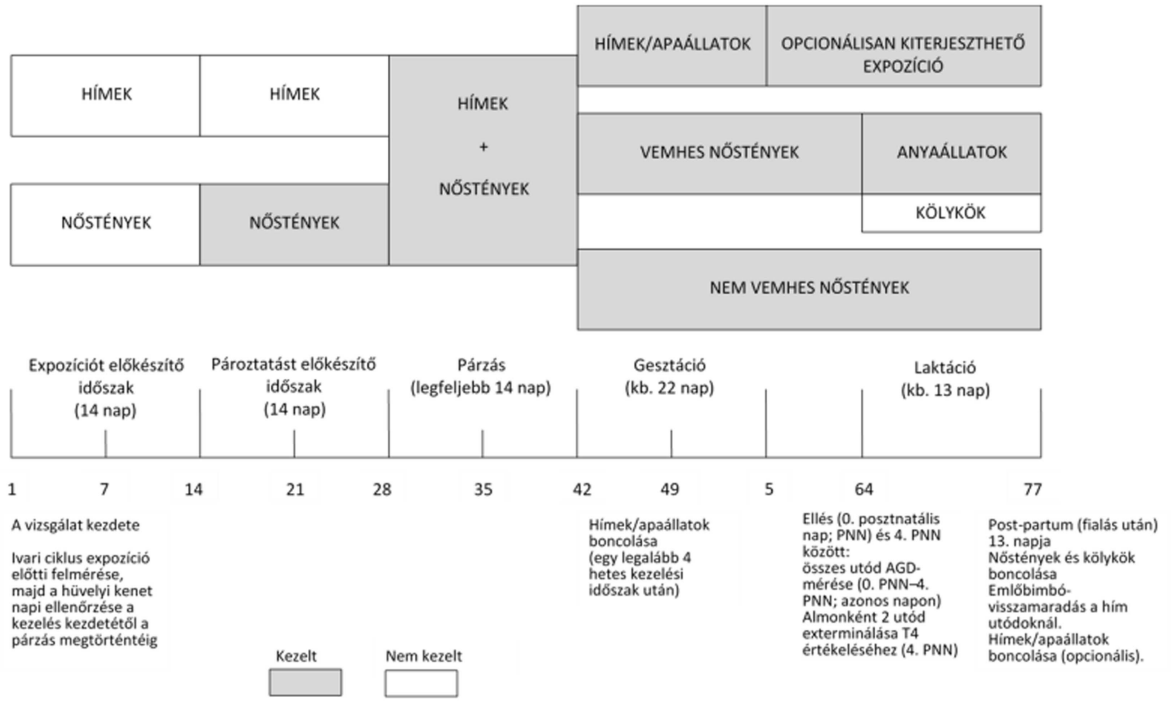
Vizsgálati vegyi anyag: az e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

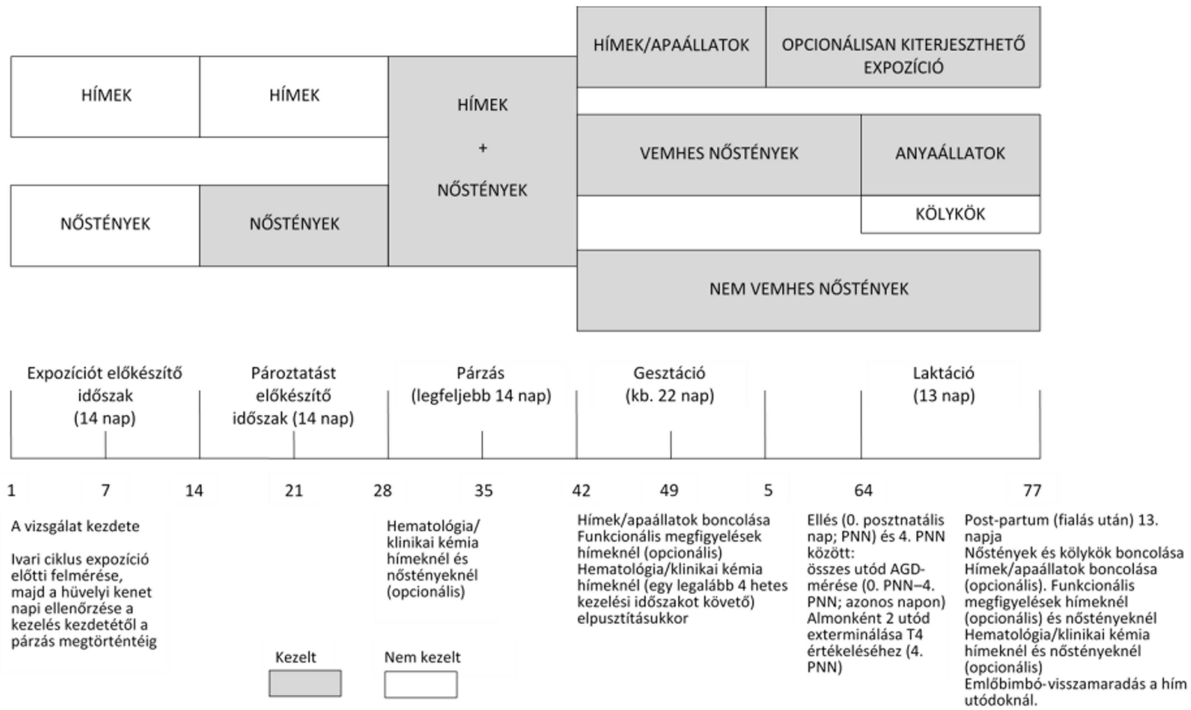
Tiroid hatás egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes pajzsmirigyhormonhoz (például a T_3-hoz) hasonló hatást gyakoroljon.

Validáció tudományos folyamat, amelynek célja egy adott vizsgálati módszer működési követelményeinek és korlátjainak jellemzése, valamint megbízhatóságának és egy adott célhoz kapcsolódó relevanciájának igazolása.

2. függelék

A KÍSÉRLETI ÜTEMTERV ÁBRÁJA, AMELY JELZI A VIZSGÁLAT TELJES 14 NAPOS PÁRZÁSI IDŐSZAKON ALAPULÓ MAXIMÁLIS IDŐTARTAMÁT





3. függelék

TÁBLÁZATOS ÖSSZEFOGLALÓ JELENTÉS A SZAPORODÁSRA/FEJLŐDÉSRE GYAKOROLT HATÁSOKRÓL

MEGFIGYELÉSEK	ÉRTÉKEK				
Adagolás (egységek).....	0 (kontroll)	...	...	...	...
Kezdő párok (Sz)					
Ivari ciklus (legalább az átlagos időtartam és az irreguláris ciklusok gyakorisága)					
Bizonyítottan párosított nőstények (Sz)					
Vemhességet elért nőstények (Sz)					
Fogantatás napja 1–5. (Sz)					
Fogantatás napja 6–... ([1]) (Sz)					
Vemhesség ≤ 21 nap (Sz)					
Vemhesség = 22 nap (Sz)					
Vemhesség ≥ 23 nap (Sz)					
Élve született utódokkal rendelkező anyaállatok (Sz)					
Post-partum 4. napján élő utódokkal rendelkező anyaállatok (Sz)					
Beágyazódások/anyaállat (átlag)					
Élő utódok/anyaállat az ellésnél (átlag)					
Élő utódok/anyaállat a 4. napon (átlag)					
Ivararány (h/n) az ellésénél (átlag)					
Ivararány (h/n) a 4. napon (átlag)					
Alom egyedsúlya az ellésnél (átlag)					
Alom egyedsúlya a 4. napon (átlag)					
Utódok súlya születéskor (átlag)					
Utódok súlya az AGD-mérés időpontjában (hímek átlaga, nőstények átlaga)					
Utódok AGD-értéke ugyanazon a posztnatális napon, születés utáni 4. napon (hímek átlaga, nőstények átlaga, posztnatális nap feljegyzése)					

MEGFIGYELÉSEK	ÉRTÉKEK				
Utódok súlya a 4. napon (átlag)					
Utódok súlya a 13. napon (átlag)					
Hím utódok emlőbimbó-visszamaradása a 13. napon (átlag)					
RENDELLENES UTÓDOK					
Anyaállatok 0-val					
Anyaállatok 1-gyel					
Anyaállatok ≥ 2-vel					
UTÓDOK ELVESZTÉSE					
Prenatális időszak (beágyazódások mínusz élveszületések száma)					
Anyaállatok 0-vel					
Anyaállatok 1-gyel					
Anyaállatok 2-vel					
Anyaállatok ≥ 3-mal					
Posztnatális időszak (élveszületések mínusz a 13. posztnatális napon élők száma)					
Anyaállatok 0-vel					
Anyaállatok 1-gyel					
Anyaállatok 2-vel					
Anyaállatok ≥ 3-mal					

([1]) a párzási időszak utolsó napja

B.65. *IN VITRO* BŐRKORRÓZIÓS MEMBRÁNBARRIER-VIZSGÁLATI MÓDSZER

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 435. vizsgálati iránymutatásában (2015) leírt módszerrel. A bőrkorrózió – az Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) által kidolgozott, vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszerében (GHS) (1), valamint az Európai Unió (EU) anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendeletében (CLP-rendelet) ([1]) meghatározottak szerint – valamely vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően megjelenő, visszafordíthatatlan bőrkárosodás, amely a felhámon át az irhára is átterjedő látható szövetelhalást okoz. Ez a vizsgálati módszer, amely egyenértékű az OECD 435. átdolgozott vizsgálati iránymutatásával, egy olyan *in vitro* membránbarrier-vizsgálatot foglal magában, amellyel azonosíthatók a korrozív vegyi anyagok. A vizsgálati módszer egy olyan mesterséges membránt alkalmaz, amely az állatbőrhöz hasonló módon reagál a korrozív vegyi anyagokra in situ.

2. A hagyományos bőrkorróziós vizsgálatoknál a vizsgálati vegyi anyagot élő állatok bőrére viszik fel, majd egy meghatározott idő elteltével felmérik a szövetkárosodás mértékét (2). E vizsgálati módszeren túl elfogadtak néhány más *in vitro* vizsgálati módszert is a korrozív vegyi anyagok azonosítására használt (az OECD 404. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű és e melléklet B.4. fejezetében ismertetett), standardnak számító, nyulakon végzett *in vivo* bőrkorróziós eljárás (2) alternatívájaként (3) (4). Az ENSZ GHS többszintes vizsgálati és értékelési stratégiát határoz meg a bőrkorrózió felméréséhez és osztályozásához, a bőrirritáció/bőrkorrózió vonatkozásában végzett vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről (IATA) szóló OECD-iránymutatás 3. és 4. modulja (1) (5) pedig validált és elfogadott *in vitro* vizsgálati módszerek használatát ajánlja. Az integrált vizsgálati és értékelési megközelítés (IATA) információforrásokat és adatelemző eszközöket csoportosító több modult ismertet, továbbá i. iránymutatást nyújt arra nézve, hogy miként integrálhatók és használhatók az ismert vizsgálati és nem vizsgálati adatok a vegyi anyagok potenciális bőrirritációs és bőrkorróziós hatásainak felmérésére, és ii. javaslatot tesz egy, a további vizsgálatok szükségessége esetén alkalmazható megközelítésre, amely kiterjed a negatív vizsgálati eredmények esetére is (5). E moduláris megközelítés révén az *in vitro* vizsgálati módszerek pozitív eredményei alapján megállapítható a vegyi anyagok korrozivitása anélkül, hogy állatkísérletekre lenne szükség, ezáltal visszaszorul és finomodik az állatok kísérleti felhasználása, és elkerülhető mindaz a fájdalom és szorongás, amely előfordulhatott volna, ha állatokkal végzik a kísérletet.

3. A kereskedelmi forgalomban Corrositex® (6) (7) (8) néven kapható *in vitro* membránbarrier-modellen végzett validálási vizsgálatok kimutatták, hogy a modell egy 163 anyagból és keverékből álló adatbázis (7) tekintetében összességében 79 %-os (128/163) pontossággal, 85 %-os (76/89) érzékenységgel és 70 %-os (52/74) specificitással jelezi előre a bőrkorróziót. A modellt – elismert hitelessége alapján – validált referenciamódszerként arra ajánlják, hogy egy többszintű vizsgálati stratégia részeként alkalmazzák a vegyi anyagok által esetlegesen okozott bőrkorróziós veszély felmérésére (5)(7). Mielőtt egy *in vitro* bőrkorróziós membránbarrier-modell szabályozási célú alkalmazásra kerülne, a validált referenciamódszerhez (9) való hasonlóságának biztosítása érdekében az előre meghatározott teljesítményszabványok (10) követelményeinek megfelelően meg kell állapítani a javasolt felhasználása tekintetében fennálló megbízhatóságát, relevanciáját (pontosságát) és korlátait. Az adatok OECD-megállapodás szerinti kölcsönös elfogadása csak azután garantált, hogy a javasolt új vagy átdolgozott módszert a teljesítményszabványok szerint felülvizsgálták és belefoglalták az OECD megfelelő vizsgálati iránymutatásába. Jelenleg egyetlen *in vitro* módszer tartozik az OECD 435. vizsgálati iránymutatása alá, és ez a vizsgálati módszer a kereskedelmi forgalomban beszerezhető Corrositex® modell.

4. A bőrkorrózió felmérésére szolgáló egyéb vizsgálati módszerek a rekonstruált humán bőr (az OECD 431. vizsgálati iránymutatása) (3) és az izolált patkánybőr (az OECD 430. vizsgálati iránymutatása) (4) használatán alapulnak. Emellett e vizsgálati iránymutatás lehetővé teszi azt, hogy a korrozív vegyi anyagokat alkategóriába sorolják az ENSZ GHS három korrozivitási alkategóriája és az ENSZ korróziós veszélyt jelentő anyagok szállítására vonatkozó három csomagolási csoportja szerint. Az eredetileg 2006-ben elfogadott vizsgálati iránymutatást 2015-ben átdolgozták, hogy figyelembe vegyék az IATA-iránymutatást és frissítsék a jártassági tesztanyagok jegyzékét.

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

5. Az alkalmazott fogalmak meghatározása a függelékben található.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

6. Az e vizsgálati módszer keretében leírt vizsgálat lehetővé teszi a korrozív vizsgálati vegyi anyagok azonosítását és ezen anyagok ENSZ GHS/CLP-rendelet szerinti alkategorizálását (1. táblázat). Emellett a vizsgálati módszer alkalmas arra, hogy a szállításukkal összefüggő vizsgálati célokból kifolyólag bizonyos kémiai anyagosztályok, pl. szerves és szervetlen savak, savszármazékok ([2]) és lúgok tekintetében megállapítsák a korrozivitást, illetve annak hiányát (7) (11)

([1]) Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról (HL L 353/1., 2008.12.31.).

([2]) A „savszármazék" egy általános megnevezés, amely tág értelemben véve a valamely savból közvetlenül, vagy módosítás vagy részleges szubsztitúció útján előállított vegyi anyagot jelenti. Ebbe az osztályba tartoznak az anhidridek, a halosavak, a sók és más vegyi anyag típusok.

(12). Ez a vizsgálati módszer a validált vizsgálati referenciamódszerhez hasonló általános eljárást ír le (7). Ez a vizsgálati módszer ugyan nem biztosít elegendő információt a bőrirritáció felméréséhez, de (az OECD 439. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű) B.46. vizsgálati módszer célja kifejezetten az, hogy a bőrirritációs egészségügyi hatásokat *in vitro* határozza meg (13). Egyetlen bőrexpozíció után a bőrt ért helyi hatások teljes kiértékeléséhez a vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről szóló OECD-iránymutatást kell tanulmányozni (5).

1. táblázat

Az ENSZ GHS szerinti bőrkorróziós kategóriák és alkategóriák ([1])

Korrozív kategória (1. kategória) (alkategóriákat nem használó hatóságoknak)	Alkalmazható korrozív alkategóriák ([1]) (alkategóriákat, pl. a CLP-rendeletet használó hatóságoknak)	Korrozív 3 állat közül legalább 1 esetében	
		Expozíció	Megfigyelés
Korrozív	1A korrozivitási alkategória	≤ 3 perc	≤ 1 óra
	1B korrozivitási alkategória	> 3 perc / ≤ 1 óra	≤ 14 nap
	1C korrozivitási alkategória	> 1 óra / ≤ 4 óra	≤ 14 nap

([1]) A CLP-rendelet az EU-ra vonatkozólag három bőrkorróziós alkategóriát alkalmaz: 1A, 1B és 1C.

7. A validált referenciamódszer (7) korlátja, hogy az előzetes kompatibilitási vizsgálat (lásd a 13. pontot) eredményei alapján számos nem korrozív vegyi anyagra és néhány korrozív vegyi anyagra nem alkalmazható a vizsgálat. A 4,5 és 8,5 közötti pH-értékkel rendelkező vízbázisú vegyi anyagok gyakran nem alkalmasak a vizsgálatra; ugyanakkor az e pH-tartományban vizsgált vegyi anyagok 85 %-a nem bizonyult korrozívnak az állatkísérletek során (7). Az *in vitro* membránbarrier módszer alkalmazható (vízben oldható és oldhatatlan) szilárd anyagok, (vizes és nem vízbázisú) folyadékok, valamint emulziók vizsgálatára. Azonban azokat a vizsgálati vegyi anyagokat, amelyek a kompatibilitási vizsgálat során nem idéznek elő kimutatható változást (vagyis színváltozást a validált vizsgálati referenciamódszer vegyi anyagok észlelésére szolgáló rendszerében (Chemical Detection System, CDS)), a membránbarrier módszertől eltérő vizsgálati módszerekkel kell vizsgálni.

A VIZSGÁLAT ELVE

8. A vizsgálati rendszer két összetevőből áll: egy szintetikus makromolekuláris biobarrierből és egy kémiai érzékelő rendszerből (CDS); ez a vizsgálati módszer a kémiai érzékelő rendszeren keresztül – feltételezhetően az élő bőrre ható korróziós mechanizmussal/mechanizmusokkal megegyező módon – detektálja a membránbarrier korrozív vizsgálati vegyi anyagok okozta károsodását, miután a vizsgálati vegyi anyagot a szintetikus makromolekuláris membránbarrier felszínén alkalmazták (7).

9. A membránbarrieren való áthatolás (vagy áttörés) számos eljárással vagy a kémiai érzékelő rendszerrel mérhető, többek között azáltal, hogy a pH-indikátor festék színe vagy az indikátoroldat bizonyos más tulajdonságai megváltoznak a barrier alatt.

10. Meg kell állapítani a membránbarrier hitelességét, vagyis azt, hogy tervezett használata szempontjából releváns és megbízható. Ez magában foglalja annak biztosítását, hogy a különböző preparátumok barriertulajdonságai állandók, például képesek barrierként működni a nem korrozív vegyi anyagokkal szemben, valamint képesek a vegyi anyagok korrozív tulajdonságainak osztályozására az ENSZ GHS különböző korrozivitási alkategóriái szerint (1). A besorolás alapja az az idő, amely alatt egy adott vegyi anyag a membránbarrieren áthatolva az indikátoroldatba jut.

A JÁRTASSÁG BIZONYÍTÁSA

11. Az e vizsgálati módszer alá tartozó *in vitro* membránbarrier módszer rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak a 2. táblázatban felsorolt tizenkét jártassági tesztanyag megfelelő besorolásával igazolniuk kell szakmai jártasságukat. Ha a jegyzékben szereplő valamely anyag nem áll rendelkezésre, illetve ha indokolható, megfelelő *in vivo* és *in vitro* referenciaadatokkal rendelkező más – például a referencia-vegyianyagok jegyzékében feltüntetett (10) – anyag is használható, amennyiben a kiválasztási kritériumok megegyeznek az 1. táblázatban foglaltakkal.

2. táblázat

Jártassági tesztanyagok [1]

Anyag [2]	CAS-szám	Kémiai osztály	*In vivo* ENSZ GHS alkategória [3]	*In vitro* ENSZ GHS alkategória [3]
Bór-trifluorid-dihidrát	13319-75-0	Szervetlen savak	1A	1A
Salétromsav	7697-37-2	Szervetlen savak	1A	1A
Foszfor-pentaklorid	10026-13-8	Szervetlen savak prekurzorai	1A	1A
Valeril-klorid	638-29-9	Savkloridok	1B	1B
Nátrium-hidroxid	1310-73-2	Szervetlen lúgok	1B	1B
1-(2-aminoetil) piperazin	140-31-8	Alifás aminok	1B	1B
Benzolszulfonil-klorid	98-09-9	Savkloridok	1C	1C
N,N-dimetil-benzilamin	103-83-3	Anilinok	1C	1C
Tetraetilén-pentamin	112-57-2	Alifás aminok	1C	1C
Eugenol	97-53-0	Fenolok	NK	NK
Nonil-akrilát	2664-55-3	Akrilátok/metakrilátok	NK	NK
Nátrium-bikarbonát	144-55-8	Szervetlen sók	NK	NK

(1) A fentiekben felsorolt tizenkét anyag közül három-három tartozik a korrozív anyagok ENSZ GHS szerinti egyes alkategóriáiba és három nem korrozív anyag, kereskedelmi forgalomban könnyen beszerezhetők, az ENSZ GHS szerinti alkategóriák pedig minőségi *in vivo* vizsgálatok eredményei alapján kerültek meghatározásra. Ezek az anyagok egy 40 referenciaanyagból álló jegyzékből származnak, részét képezik a validált vizsgálati referenciamódszerhez strukturálisan és funkcionálisan hasonló vizsgálati módszerek pontosságának és megbízhatóságának igazolására kijelölt vegyi anyagok minimális jegyzékének, és az eredetileg a vizsgálati referenciamódszer (Corrositex®) (7) (10) (14) validálásához használt 163 referencia-vegyianyagból kerültek kiválasztásra. A kiválasztási eljárás során a lehetőségekhez mérten olyan anyagokat igyekeztek kiválasztani, amelyek: a validált vizsgálati referenciamódszer által mérhető vagy megbecsülhető korrozivitási válaszreakciók tartománya tekintetében reprezentatívak (pl. nincs korrozív hatásuk; az ENSZ I., II. és III. csomagolási csoportja szerinti korróziós hatást váltanak ki); a validálási eljárás során használt kémiai osztályok tekintetében reprezentatívak; jól meghatározott kémiai szerkezettel rendelkeznek; megismételhető eredményeket hoznak a validált vizsgálati referenciamódszer alkalmazásakor; egyértelmű eredményeket hoznak az *in vivo* referenciavizsgálatban; kereskedelmi forgalomban kaphatók; és nem kapcsolódnak hozzájuk vállalhatatlanul magas ártalmatlanítási költségek (14).

(2) Az anyagokat tisztán vagy legalább 90 %-os tisztasággal vizsgálták.

(3) Az ENSZ GHS szerinti 1A, 1B és 1C alkategóriának az ENSZ I., II. és III. csomagolási csoportja felel meg. NK: Nem korrozív.

ELJÁRÁS

12. Az alábbi pontok egy, a korrózió felmérésére szolgáló mesterséges membránbarrier vizsgálati módszer (7) (15) összetevőit és eljárásait ismertetik, amelynek alapja a jelenlegi validált referenciamódszer, vagyis a kereskedelmi forgalomban kapható Corrositex®. A membránbarrier, valamint a kompatibilitást meghatározó/indikátor- és kategorizáló oldatok összeállíthatók, elkészíthetők vagy kereskedelmi forgalomban beszerezhetők, mint a Corrositex® validált referenciamódszer. A validált vizsgálati referenciamódszerhez rendelkezésre áll a vizsgálati módszer mintaprotokollja (7). A vizsgálatot szobahőmérsékleten (17–25 °C) kell elvégezni, az összetevőknek pedig meg kell felelniük az alábbi feltételeknek.

A vizsgálati vegyi anyag kompatibilitási tesztje

13. A membránbarrier-vizsgálat előtt egy kompatibilitási vizsgálat során meg kell határozni, hogy a kémiai érzékelő rendszer képes-e detektálni a vizsgálati vegyi anyagot. Amennyiben a kémiai érzékelő rendszer nem mutatja ki a vizsgálati vegyi anyagot, a membránbarrieres vizsgálati módszer nem alkalmas az adott vizsgálati vegyi anyag potenciális korróziós hatásának értékelésére, ezért mást vizsgálati módszert kell alkalmazni. A kompatibilitási vizsgálat során olyan kémiai érzékelő rendszert és expozíciós körülményeket kell alkalmazni, amelyek megegyeznek a későbbi membránbarrier-vizsgálat expozíciójával.

A vizsgálati vegyi anyag időskálán alapuló kategorizálási vizsgálata

14. Amennyiben az a vizsgálati módszer szempontjából releváns, a kompatibilitási vizsgálat során alkalmasnak nyilvánított vizsgálati vegyi anyagokon el kell végezni egy időskálán alapuló kategorizálási vizsgálatot, vagyis egy olyan szűrővizsgálatot, amely megkülönbözteti a gyenge és az erős savakat és a bázisokat. A validált vizsgálati referenciamódszerben például egy időskálán alapuló kategorizálási vizsgálat során határozzák meg, hogy a két időskála közül melyiket használják, annak alapján, hogy kimutattak-e jelentős sav- vagy lúgtartalékot. A bőrkorrozivitás és az ENSZ GHS szerinti korrozivitási alkategória meghatározásához az adott vizsgálati vegyi anyag sav- vagy lúgtartaléka szerint két különböző, áthatolási időn alapuló időskála áll rendelkezésre.

A MEMBRÁNBARRIERES VIZSGÁLATI MÓDSZER ÖSSZETEVŐI

Membránbarrier

15. A membránbarrier két összetevőből áll: egy fehérjetartalmú makromolekuláris vízbázisú gélből és egy áteresztő membránból. A fehérjetartalmú gél nem ereszti át a folyadékokat és a szilárd anyagokat, ugyanakkor korrózió útján áteresztővé tehető. A teljesen összeállított membránbarriert előre meghatározott körülmények között kell tárolni, amelyek bizonyítottan kizárják a gél minőségromlását, pl. kiszáradását, a mikrobák elszaporodását, elmozdulását, megrepedezését, ami csökkentené teljesítményét. Meg kell határozni az elfogadható tárolási időt, és annak lejártát követően nem szabad felhasználni a membránbarrier-preparátumokat.

16. Az áteresztő membrán fizikai alátámasztást biztosít a fehérjetartalmú gélnek a gélesedési folyamat és a vizsgálati vegyi anyaggal való kezelés során. A membránnak meg kell akadályoznia a gél beesését és elcsúszását, továbbá átjárhatónak kell lennie minden vizsgálati vegyi anyag számára.

17. A fehérjetartalmú gél, amely gélmátrixot képező fehérjékből, például keratinból, kollagénből vagy fehérjekeverékekből tevődik össze, a vizsgálati vegyi anyag célpreparátuma. A fehérjetartalmú anyagot felviszik a membrán felületére, és megvárják, amíg gélesedik, majd ezt követően a membránbarriert az indikátoroldat fölé helyezik. A fehérjetartalmú gél teljes felületének egyforma vastagságúnak és sűrűségűnek kell lennie, továbbá nem tartalmazhat légbuborékokat és egyéb olyan hibákat, amelyek károsíthatják funkciójának épségét.

A kémiai érzékelő rendszer

18. Az indikátoroldatnak, amely megegyezik a kompatibilitási vizsgálat során alkalmazott oldattal, reagálnia kell a vizsgálati vegyi anyag jelenlétére. Olyan pH-indikátor festéket vagy festékkombinációt (pl. krezolvörös és metilnarancs) kell használni, amely színváltozással reagál a vizsgálati vegyi anyag jelenlétére. A mérési rendszer lehet vizuális vagy elektronikus.

19. A vizsgálati vegyi anyagok barriermembránon keresztüli áthaladásának észlelésére kifejlesztett detektorrendszerek alkalmasságát és megbízhatóságát értékelni kell, hogy igazolni lehessen az általuk észlelhető vegyi anyagok körét és az észlelés mennyiségi korlátait.

A VIZSGÁLAT KIÉRTÉKELÉSE

A vizsgálati módszer alkotóelemeinek összeállítása

20. A membránbarriert az indikátoroldatot tartalmazó ampullába (vagy csőbe) helyezik oly módon, hogy a membrán teljes felületén érintkezzen az indikátoroldattal és ne alakuljanak ki légbuborékok. Ügyelni kell arra, hogy a barrier épsége fennmaradjon.

A vizsgálati vegyi anyag alkalmazása

21. A vizsgálati vegyi anyagot megfelelő, azaz például folyadék esetében 500 µl, finomra porított szilárd anyag esetében 500 mg (7) mennyiségben óvatosan fel kell vinni a membránbarrier felső felszínére, majd egyenletesen szét kell oszlatni a felületen. Minden vizsgálati vegyi anyag és az annak megfelelő kontrollok esetében megfelelő számú, például négy (7) replikátumot kell készíteni (lásd a 23–25. pontot). A vizsgálati vegyi anyag membránbarrierre történő felvitelének időpontját rögzíteni kell. Annak érdekében, hogy a rövid hatóidejű korróziót is pontosan lehessen rögzíteni, a vizsgálati vegyi anyagot szakaszosan kell a replikátum csövekbe felvinni.

A membránbarrieren való áthatolás mérése

22. Minden csövet gondosan megfigyelnek, és feljegyzik az indikátoroldat első elváltozásának, vagyis a barrieren történő áthatolásnak az időpontját, majd meghatározzák a felvitel és a membránbarrieren való áthatolás között eltelt időt.

Kontrollok

23. Azokban a vizsgálatokban, amelyekben a vizsgálati vegyi anyagot vivőanyaggal vagy oldószerrel együtt alkalmazzák, a vivőanyagnak vagy az oldószernek kompatibilisnek kell lennie a membránbarrier rendszerrel, azaz nem lehet hatással sem a membránbarrier rendszer épségére, sem a vizsgálati vegyi anyag korrozivitására. Adott esetben a vizsgálati vegyi anyaggal párhuzamosan kontrollvizsgálatot kell végezni az oldószerrel (vagy a vivőanyaggal) annak igazolására, hogy az kompatibilis a membránbarrier rendszerrel.

24. A vizsgálati vegyi anyaggal egyidejűleg egy közepesen korrozív anyaggal, például 110 ± 15 mg nátrium-hidroxiddal (amely az ENSZ GHS szerinti 1B alkategóriába tartozik) (7) pozitív (korrozív) kontrollt kell végezni a vizsgálati rendszer által nyújtott teljesítmény elfogadhatóságának értékelésre. A korrozív vizsgálati vegyi anyagok relatív korróziós potenciáljának felméréséhez hasznosnak bizonyulhat egy, a vizsgálati vegyi anyaggal azonos kémiai osztályba tartozó anyaggal végzett második pozitív kontroll. A pozitív kontrollanyagként közepesen korrozív (pl. az ENSZ GHS szerinti 1B alkategóriába tartozó) anyagot kell választani, hogy észlelni lehessen, ha az áthatolási idő elfogadhatatlanul hosszú vagy rövid a meghatározott referenciaértékhez képest, ami azt jelzi, hogy a vizsgálati rendszer nem működik megfelelően. E tekintetben a rendkívül korrozív (az ENSZ GHS szerinti 1A alkategóriába tartozó) vagy a nem korrozív hatású vegyi anyagok használhatósága korlátozott. Ugyanakkor az ENSZ GHS szerinti 1B alkategóriába tartozó korrozív vegyi anyagok lehetővé teszik a túl gyors vagy túl lassú áthatolási idő észlelését. Az enyhén korrozív (az ENSZ GHS szerinti 1C alkategóriába tartozó) anyagok használhatók pozitív kontrollként annak mérésére, hogy a vizsgálati módszer képes-e megbízhatóan különbséget tenni az enyhén korrozív és a nem korrozív hatású vegyi anyagok között. Az alkalmazott megközelítéstől függetlenül a használt pozitív kontrollanyag(ok) áthatolási idejének dokumentált tartománya alapján meg kell határozni a pozitív kontroll válaszreakciójának elfogadható tartományát, úgy mint az átlagérték ± 2–3 standard deviációt. Minden vizsgálat során meg kell állapítani a pozitív kontrollanyag pontos áthatolási idejét, hogy észlelni lehessen az elfogadható tartománytól való eltéréseket.

25. Negatív kontrollként egy negatív (nem korrozív) kontrollanyagot – például 10 % citromsav, 6 % propionsav (7) – is vizsgálni kell a vizsgálati vegyi anyaggal egyidejűleg, amely egy másik minőség-ellenőrzési mérésként igazolja a membránbarrier épségét.

A vizsgálat elfogadhatósági kritériumai

26. Az egyes ENSZ GHS szerinti korrozivitási alkategóriákra meghatározott időparaméterek alapján a vizsgálati vegyi anyag membránbarrierre történő felvitele és a barrieren való áthatolása között eltelt (percben mért) időt használják a vizsgálati vegyi anyag korrozivitásának előrejelzésére. Ahhoz, hogy egy vizsgálatot elfogadhatónak minősítsenek, a párhuzamos pozitív kontrollnak a várt áthatolási reakcióidőt kell biztosítania (ami például a nátrium-hidroxid pozitív kontrollként való alkalmazása esetén 8–16 perces áthatolási időt jelent), a párhuzamos negatív kontrollanyag nem lehet korrozív, és – amennyiben sor került rá – a párhuzamos oldószeres kontroll nem lehet korrozív és nem módosíthatja a vizsgálati vegyi anyag korróziós potenciálját. Az e vizsgálati módszer alá tartozó módszer rutinszerű alkalmazását megelőzően a laboratóriumoknak a 2. táblázatban javasolt tizenkét anyag felhasználásával igazolniuk kell szakmai jártasságukat. Az e vizsgálati módszer keretében kidolgozott, a validált referenciamódszerhez (14) strukturálisan és funkcionálisan hasonló, úgynevezett „me-too” vizsgálati módszerek szabályozási célú alkalmazása előtt az előre meghatározott teljesítményszabványok használatával igazolni kell az új módszer megbízhatóságát és pontosságát (10).

Az eredmények értelmezése és a vizsgálati vegyi anyagok korrozivitási osztályba sorolása

27. A vizsgálati vegyi anyag membránbarrierre történő felvitele és a barrieren való áthatolása között eltelt (percben mért) időt használják a vizsgálati vegyi anyag – ENSZ GHS szerinti korrozivitási alkategóriák (1) és adott esetben az ENSZ csomagolási csoportjai (16) szerinti – osztályozására. Az egyes javasolt vizsgálati módszerekre nézve meghatározzák a három korrozivitási alkategóriát elválasztó időértékeket. A kategóriákat elválasztó időértékekre vonatkozó végső döntés során törekedni kell arra, hogy minimalizálják a korrozív veszély alulkategorizálását (vagyis az álnegatív eredményeket). E vizsgálati iránymutatás keretén belül a Corrositex® 3. táblázatban feltüntetett időértékeit kell figyelembe venni, mivel jelenleg ez az egyetlen vizsgálati módszer tartozik a vizsgálati iránymutatáshoz (7).

3. táblázat

Corrositex® előrejelzési modell

Átlagos áthatolási idő (percben)		ENSZ GHS előrejelzés ([3])
1. kategóriába sorolt vizsgálati vegyi anyagok ([1]) (a módszer kategorizálási vizsgálata alapján)	2. kategóriába sorolt vizsgálati vegyi anyagok ([2]) (a módszer kategorizálási vizsgálata alapján)	
0–3 perc	0–3 perc	Korrozív opcionális 1A alkategória
> 3–60 perc	> 3–30 perc	Korrozív opcionális 1B alkategória
> 60–240 perc	> 30–60 perc	Korrozív opcionális 1C alkategória
> 240 perc	> 60 perc	Nem korrozív

([1]) Magas sav-/lúgtartalékkal rendelkező vizsgálati vegyi anyagok (6)
([2]) Alacsony sav-/lúgtartalékkal rendelkező vizsgálati vegyi anyagok (6)
([3]) Az ENSZ GHS szerinti 1A, 1B és 1C alkategóriának az ENSZ I., II. és III. csomagolási csoportja felel meg

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

28. Minden kísérlet esetében táblázatba kell foglalni a vizsgálati vegyi anyag és a pozitív kontrollanyag(ok) felvitele és a barrieren való áthatolás között eltelt (percben mért) időt az egyes ismétlések adataként, az átlagérték ± a szórás megadásával.

Vizsgálati jelentés

29. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag és kontrollként szolgáló anyagok:

— Egy összetevőből álló anyag: kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján;

— több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek: amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai jellemzik;

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— eredet, gyártási szám, ha ismert;

— a vizsgálati vegyi anyag/kontrollanyag kezelése a vizsgálatot megelőzően, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, felhasználási határideje vagy ismételt elemzésének napja, ha ismert;

— tárolási feltételek.

Vivőanyag:

— név, (adott esetben) koncentráció, alkalmazott térfogat;

— a vivőanyag megválasztásának indokolása.

Az alkalmazott in vitro membránbarrier-modell és protokoll, ideértve az igazolt pontosságot és megbízhatóságot

Vizsgálati körülmények:

— az alkalmazott műszer és az elkészítési eljárások leírása;

— az alkalmazott *in vitro* membránbarrier eredete és összetétele;

— az indikátoroldat összetétele és jellemzői;

— a kimutatás módszere;

— a vizsgálati vegyi anyag és a kontrollanyagok mennyisége;

— replikátumok száma;

— az időskálán alapuló kategorizálási vizsgálat leírása és indokolása;

— az alkalmazás módja;

— megfigyelési időszakok;

— az alkalmazott értékelési és osztályozási kritériumok leírása;

— a vizsgálati módszer végrehajtásában való jártasság bizonyítása a módszer rutinszerű használata előtt, a jártassági tesztanyagok vizsgálata révén.

Eredmények:

— az egyes replikátumok egyedi vizsgálatából és kontrollmintáiból nyert egyedi nyers adatok táblázatba foglalása;

— a megfigyelt egyéb hatások leírása;

— az alkalmazott előrejelzési modellel/döntési kritériumokkal összhangban kialakított osztályozás.

Az eredmények értékelése

Következtetések

SZAKIRODALOM

(1) Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Elérhető a következő címen:http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) E melléklet B.4., Akut bőrirritáció/bőrkorrózió fejezete.

(3) E melléklet B.40bis., *In vitro* bőrkorrózió: rekonstruált emberi felhámmodellen végzett vizsgálati módszer című fejezete.

(4) E melléklet B.40., *In vitro* bőrkorrózió: transzkután elektromos rezisztencia (TER) vizsgálat című fejezete.

(5) OECD (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/ Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203). Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicology *In vitro* 12, 483-524.

(7) ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (No 99-4495.)

(8) Gordon V.C., Harvell J.D. and Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10, 37-45.

(9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on testing and Assessment (No 34).

(10) OECD (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen:http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf.

(11) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italy. ATLA 29, 96-97.

(12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (September 20, 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.

(13) E melléklet B.46., *In vitro* bőrirritáció: Rekonstruált emberi felhámmodellen végzett vizsgálati módszer című fejezete. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Elérhető a következő címen:http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

(14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Elérhető a következő címen:http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf.

(15) Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Elérhető a következő címen:http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

Függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: a vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. E kifejezést gyakran használják az „egyezés" megfelelőjeként, amely egy adott vizsgálati módszer alkalmazásakor az azonos eredmények arányát fejezi ki (9).

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Kémiai érzékelő rendszer: vizuális vagy elektronikus mérési rendszer indikátoroldattal, amely reagál a vizsgálati vegyi anyagok jelenlétére, például azáltal, hogy módosul a vizsgálati vegyi anyag jelenlétére színváltozással reagáló pH-indikátor festék vagy festékkombináció, illetve más típusú kémiai vagy elektrokémiai reakciók által.

Egyezés: a kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. A kifejezést esetenként használják a pontosság megfelelőjeként, és úgy határozzák meg, mint a helyesen pozitívként vagy negatívként besorolt összes vizsgálati vegyi anyag aránya. Az egyezés nagy mértékben függ a vizsgálat tárgyát képező vizsgálati vegyi anyag típusaiban előforduló pozitív eredmények gyakoriságától (9).

GHS (a vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszere): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (1).

IATA: integrált vizsgálati és értékelési megközelítés.

Keverék: két vagy több anyagot tartalmazó elegy vagy oldat.

Egy összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben az egyik fő összetevő legalább 80 tömegszázalékban van jelen.

Több összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben egynél több fő összetevő legalább 10 tömegszázalékban, de 80 tömegszázalékot nem meghaladó koncentrációban van jelen. A több összetevőből álló anyag gyártási folyamat eredménye. A keverék és a több összetevőből álló anyag között az a különbség, hogy a keverék két vagy több anyag összekeverésével, kémiai reakció nélkül jön létre. A több összetevőből álló anyag kémiai reakció eredménye.

NK: nem korrozív.

Teljesítményszabványok: hitelesített referenciamódszeren alapuló szabványok, amelyek a javasolt, végrehajtás és funkcionalitás szempontjából hasonló vizsgálati módszer összehasonlíthatósági értékelésének alapjául szolgálnak. Ide tartoznak: i. a vizsgálati módszer alapvető összetevői; ii. a referencia-vegyianyagok minimális jegyzéke, amely a validált vizsgálati módszer által nyújtott teljesítmény elfogadhatóságának igazolására használt vegyi anyagokból került összeállításra; és iii. a validált vizsgálati módszer eredményei alapján meghatározott, azokhoz hasonló megbízhatósági és pontossági szint, amelyet a javasolt vizsgálati módszernek teljesítenie kell a referencia-vegyianyagok minimális jegyzéke szerinti értékelése során (9).

Relevancia: a vizsgálati módszer és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálati módszer mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálati módszer pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (9).

Megbízhatóság: a vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. A laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság kiszámításával állapítják meg (9).

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálati módszer helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (9).

In vivo *bőrkorrózió*: a vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően négy órán belül megjelenő, visszafordíthatatlan bőrkárosodás, azaz a felhámon át az irhára is átterjedő látható szövetelhalás. A korróziós tünetek jellemzően fekély, vérzés, véres hegesedés és – 14 napos megfigyelés végén – a bőr kifehéredése miatt elszíneződés, teljes szőrhullásos területek és hegek. A kérdéses lézió értékeléséhez figyelembe kell venni a kórszövettant.

Specificitás: a vizsgálati módszerrel helyesen besorolt összes negatív/inaktív vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (9).

Anyag: olyan természetes állapotban előforduló vagy gyártási eljárásból származó kémiai elem és vegyületei, amely a stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagot és az alkalmazott eljárásból származó szennyező anyagokat is tartalmazhat, de nem tartalmaz olyan oldószert, amely az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltoztatása nélkül elkülöníthető.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

UVCB: ismeretlen vagy változó összetételű anyagok, valamint komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok.

B.66. STABILAN TRANSZFEKTÁLT TRANSZAKTIVÁCIÓS *IN VITRO* VIZSGÁLATOK ÖSZTROGÉNRECEPTOROK AGONISTÁINAK ÉS ANTAGONISTÁINAK ÉSZLELÉSÉRE

ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

Az OECD teljesítményalapú vizsgálati iránymutatása

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 455. vizsgálati iránymutatásában (2016) leírt módszerrel. A 455. teljesítményalapú vizsgálati iránymutatás (PBTG) az ösztrogénreceptorok agonistáinak és antagonistáinak észlelésére szolgáló stabilan transzfektált transzaktivációs *in vitro* vizsgálatok (ER TA vizsgálatok) módszertanát ismerteti. Az iránymutatás több mechanikusan és funkcionálisan hasonló vizsgálati módszert tartalmaz az ösztrogénreceptor (vagyis az ERα és/vagy ERβ ösztrogénreceptor) agonistáinak és antagonistáinak azonosítására, és a veszély értékelésére szolgáló új és átdolgozott vizsgálati módszerek validálásáról és nemzetközi elfogadásáról szóló OECD-irányelvben (1) megfogalmazott validálási elvekkel összhangban megkönnyíti az új – hasonló vagy módosított – vizsgálati módszerek kidolgozását. A teljesítményalapú vizsgálati iránymutatás alapjául szolgáló, teljes körűen validált (a 2. és a 3. függelékben ismertetett) vizsgálati referenciamódszerek a következők:

   — a stabilan transzfektált transzaktivációs (STTA) vizsgálat (2), amely (h) ERα-HeLa-9903 sejtvonalat alkalmaz; valamint

   — a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat (3), amely VM7Luc4E2 sejtvonalat [1] alkalmaz, ami elsősorban a humán ösztrogénreceptor α-t, kisebb mértékben a humán ösztrogénreceptor β-t fejezi ki (4) (5).

   Az ugyanezt a veszélyességi végpontot célzó hasonló vizsgálatok kidolgozásához és validálásához rendelkezésre állnak és alkalmazandók teljesítményszabványok (6) (7). A teljesítményszabványok lehetővé teszik a 455. teljesítményalapú vizsgálati iránymutatás időben történő módosítását, hogy az új, hasonló vizsgálatokat be lehessen építeni az átdolgozott iránymutatásba; hasonló vizsgálatok azonban csak azután foglalhatók bele az iránymutatásba, hogy az OECD felülvizsgálta és jóváhagyta a teljesítményszabványok alkalmazását. A 455. vizsgálati iránymutatás alá tartozó vizsgálatok egységesen felhasználhatók az OECD-tagállamok ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálatok eredményeire vonatkozó követelményeinek kialakításához, ugyanakkor biztosítják az adatok kölcsönös elfogadásának előnyeit.

A vizsgálati módszerhez tartozó vizsgálatok háttere és elvei

2. Az OECD 1998-ban kiemelt fontosságú tevékenységet indított az endokrin rendszert esetlegesen károsító vegyi anyagok kiszűrésére és vizsgálatára vonatkozó meglévő vizsgálati iránymutatások felülvizsgálata, valamint új vizsgálati iránymutatások kidolgozása érdekében. Az OECD endokrin rendszert károsító anyagok vizsgálatára és értékelésére szolgáló fogalmi keretét 2012-ben átdolgozták. Az elvi keretrendszer eredeti és átdolgozott változatát mellékletként csatolták az endokrin rendszert károsító vegyi anyagok értékelésére vonatkozó szabványosított vizsgálati iránymutatásokról szóló OECD-iránymutatáshoz (8). Az elvi keretrendszer öt szintet határoz meg, amelyek mindegyike a biológiai komplexitás egy különálló szintjének felel meg. Az e vizsgálati módszer keretében ismertetett ösztrogénreceptor (ER) transzaktivációs (TA) vizsgálatok a 2. szinten helyezkednek el, amely magában foglalja „*a kiválasztott endokrin mechanizmus(ok)ról/útvonal(ak)ról adatokat szolgáltató in vitro vizsgálatokat*”. Ez a vizsgálati módszer *in vitro* transzaktivációs (TA) vizsgálatokra alkalmas, amelyek célja az ösztrogénreceptor (ER) agonistáinak és antagonistáinak azonosítása.

3. Az ösztrogének ösztrogénreceptorokkal való kölcsönhatása befolyásolhatja az ösztrogén kontrollálta gének átírását (transzkripcióját), ami sejtes folyamatok indukciójához vagy gátlásához vezethet, beleértve azokat, amelyek szükségesek a sejtosztódáshoz, a normál magzati fejlődéshez és a szaporodási funkciókhoz (9) (10) (11). A normál ösztrogénrendszerek zavara károsan befolyásolhatja a normál egyedfejlődést (ontogenezist), a reprodukciós egészséget és a reproduktív rendszer integritását.

4. Az *in vitro* transzaktivációs vizsgálatokban a receptor és ligandumja közötti direkt vagy indirekt kölcsönhatások egy riportergén bekapcsolását (transzkripcióját) szabályozzák. Az ilyen vizsgálatokat széles körben használják specifikus sejtmagi receptorok, például ösztrogénreceptorok által szabályozott génkifejeződés értékelésére (12) (13) (14) (15) (16). Javasolt felhasználási területük az ösztrogénreceptorok által szabályozott ösztrogénhatású transzaktiváció észlelése (17) (18) (19). A sejtmagi ösztrogénreceptoroknak legalább két fő altípusa létezik, az α és a β, amelyeket különböző gének kódolnak. A megfelelő fehérjéknek eltérő biológiai funkciói vannak, eltérő a szöveti jelenlétük és ligandumkötő affinitásuk (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26). A sejtmagi ösztrogénreceptor α a klasszikus ösztrogénválaszt közvetíti (27) (28) (29) (30), ezért az ösztrogénreceptorok aktiválásának és gátlásának mérésére kifejlesztett modellek többsége az ösztrogénreceptor α-ra specifikus. A vizsgálatokat arra használják, hogy azonosítsanak

[1] 2016 júniusa előtt ezt a sejtvonalat BG1Luc sejtvonalnak nevezték. A BG-1 sejteket eredetileg Greisinger és munkatársai (1998) írták le (35), később pedig a National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) kutatói karakterizálták (36). Nemrégiben rájöttek arra, hogy a kutatók a BG-1 sejtek két különböző variánsát, a BG-1 Fr-t és a BG-1 NIEHS-t használják. Li és munkatársai (2014) (37) a két BG-1 sejtvonalvariáns részletes elemzése, többek között DNS-vizsgálatuk elvégzése révén kimutatták, hogy a BG-1 Fr egyedi sejtvonal, és hogy a BG-1 NIEHS, vagyis a vizsgálat kidolgozásához eredetileg használt sejtvonal nem a BG1 humán petefészekrák sejtvonala, hanem az MCF7 humán mellráksejtvonal variánsa. A vizsgálatban alkalmazott sejtvonal, eredeti elnevezésén a BG1Luc4E2 (38), immár VM7Luc4E2 néven szerepel („V” = variáns; „M7” = MCF7 sejtek). Hasonlóképpen a vizsgálat jelenlegi elnevezése az VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktiváció. Bár ez módosítja a vizsgálat alapjául szolgáló sejtvonal eredetét, nem befolyásolja sem a közzétett validálási tanulmányokat, sem a vizsgálat hasznosságát és alkalmazhatóságát az ösztrogén/antiösztrogén hatású vegyi anyagok szűrésére.

olyan vegyi anyagokat, amelyek aktiválják (vagy gátolják) az ösztrogénreceptorokat a ligandumkötésben, a kötés révén létrejött receptor-ligandum komplex specifikusan DNS válaszelemekhez kötődik és transzaktivál egy riportergént, megnövelve ezáltal a markerfehérje celluláris kifejeződését. E vizsgálatokban különféle riportergének alkalmazhatók. A luciferáz alapú rendszerekben a luciferáz enzim a luciferin szubsztrátot átalakítja, miközben bioluminiszcens fény keletkezik, amely luminométerrel számszerűen mérhető. Gyakori riporterre példák lehetnek még a fluoreszcens fehérjék génjei és a *lacZ* gén, ez utóbbi a β-galaktozidázt kódolja, egy olyan enzimet, amely képes a színtelen X-gal szubsztrátot (5-bromo-4-kloro-indolil-galaktopiranozid) kék termékké alakítani, amelynek mennyisége spektrofotométerrel mérhető. Ezek a riporterek kereskedelmi forgalomban kapható vizsgálati készletekkel gyorsan és költséghatékonyan értékelhetők.

5. a stabilan transzfektált transzaktivációs és a VM7Luc transzaktivációs vizsgálatok validálási tanulmányai igazolták, hogy e vizsgálatok tervezett felhasználásuk tekintetében relevánsak és megbízhatóak (3) (4) (5) (30). A luminiszcencián alapuló, mellrák sejtvonalat alkalmazó ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálatok teljesítményszabványait az ICCVAM belefoglalta a „LUMI-CELL® ösztrogénreceptor (VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs) vizsgálati módszer: a vegyi anyagok humán ösztrogénreceptorokra kifejtett agonista és antagonista aktivitásának azonosítására szolgáló *in vitro* vizsgálat" című (3), vizsgálati módszert értékelő jelentésébe. Ezeket a teljesítményszabványokat módosították, hogy alkalmazhatók legyenek mind a stabilan transzfektált transzaktivációs, mind a VM7Luc transzaktivációs vizsgálatra (2).

6. A vizsgálati módszerben használt fogalmak és rövidítések meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A transzaktivációs vizsgálatok alkalmazási területe és korlátai

7. E vizsgálatokat szűrési és rangsorolási célra ajánlják, ugyanakkor a mechanizmusra vonatkozólag is képesek adatokat szolgáltatni, amelyek felhasználhatók egy bizonyítékok súlyozásán (WoE) alapuló megközelítésben. A vizsgálatok tárgya egy vegyi anyag ösztrogénreceptorokhoz való kötődése által előidézett transzaktiváció *in vitro* rendszerben. Ezért az eredményekből nem lehet közvetlenül következtetni az intakt *in vivo* endokrin rendszerben megvalósuló összetett jelátvitelre és szabályozásra.

8. Habár az ösztrogénreceptorok által kiváltott transzaktivációt az endokrin zavarok (ED) hátterében álló egyik fő mechanizmusként tartják számon, más mechanizmusok is okozhatnak endokrin zavarokat, többek között i. az endokrin rendszeren belüli más receptorokkal és enzimrendszerekkel való interakciók, ii. hormonszintézis, iii. a hormonok metabolikus aktiválása és/vagy inaktiválása, iv. hormonok elszállítása a célszövetekhez és v. hormonok kiürülése a szervezetből. Ezekkel a hatásmechanizmusokkal a tárgyalt vizsgálati módszerhez kapcsolódó vizsgálatok egyike sem foglalkozik.

9. E vizsgálati módszer célja, hogy felmérje a vegyi anyagok ösztrogénreceptor-dependens transzkripció aktiválására (vagyis agonistaként való viselkedésre) és gátlására (vagyis antagonistaként való viselkedésre) való képességét. Egyes vegyi anyagok a sejttípustól függően agonistaként és antagonistaként is viselkedhetnek, ezek az úgynevezett szelektív ösztrogénreceptor modulátorok (SERM). Az e vizsgálatokban negatívnak minősített vegyi anyagok tovább vizsgálhatók egy ösztrogénreceptorhoz kötődési tesztben, mielőtt megállapításra kerülne, hogy nem kötődnek a receptorhoz. Tekintettel az *in vitro* sejtrendszerek korlátozott metabolikus képességére, a vizsgálatok valószínűleg csak a kiindulási molekula hatásáról szolgáltatnak információt. Mivel a validálás során csak egykomponensű anyagokat használtak, a vizsgálat keverékekre való alkalmazhatósága nem vetődött fel. Mindazonáltal a vizsgálati módszer elvileg alkalmazható több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek vizsgálatára. A vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, több összetevőből álló anyagokon, UVCB-ken és keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény.

10. Az 1. táblázat tájékoztatási céllal ismerteti az e vizsgálati módszer által leírt mindkét teljes körűen validált vizsgálati referenciamódszerben tesztelt 34 anyagra vonatkozó agonista vizsgálati eredményeket. A szóban forgó anyagok közül 26-ot egyértelmű ösztrogénreceptor agonistaként határoztak meg, a többi 8-at negatívnak minősítették a közzétett jelentések, többek között az *in vitro* ösztrogénreceptor-kötődési és transzaktivációs vizsgálatok és/vagy az uterotrofikus vizsgálat alapján (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34). A 2. táblázat pedig ismerteti az e vizsgálati módszer által leírt mindkét teljes körűen validált vizsgálati referenciamódszerben vizsgált 15 anyagra vonatkozó antagonista vizsgálati eredményeket. Ezen anyagok közül 4-et egyértelmű/feltételezett ösztrogénreceptor antagonistaként határoztak meg, míg 10-et negatívnak minősítettek a közzétett jelentések, többek között az *in vitro* ösztrogénreceptor-kötődési és transzaktivációs vizsgálatok alapján (2) (3) (18) (31). Az 1. és 2. táblázatban összefoglalt adatok vonatkozásában 100 %-os egyezés mutatható ki a két vizsgálati referenciamódszer között valamennyi anyag besorolása tekintetében (az antagonista vizsgálatban szereplő mifepriszton kivételével), és minden anyagot helyesen osztályoztak ösztrogénreceptor agonistaként, ösztrogénreceptor antagonistaként vagy negatívként. E vegyianyagcsoportról, valamint a validálási tanulmányok során a stabilan transzfektált transzaktivációs és a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálatban tesztelt egyéb vegyi anyagokról az ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat teljesítményszabványai nyújtanak bővebb tájékoztatást (6) (7), 2. függelék (1., 2., és 3. táblázat).

1. táblázat

A stabilan transzfektált transzaktivációs és a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat eredményeinek áttekintése azon anyagok vonatkozásában, amelyeket mindkét agonista vizsgálatban teszteltek, és ösztrogénreceptor agonistaként (POZ) vagy negatívként (NEG) azonosítottak

	Anyag	CAS-szám	STTA-vizsgálat [1]			VM7Luc ER TA vizsgálat [2]		Osztályozás alapját képező adatforrás [4]		
			ER TA aktivitás	PC_{10} érték (M)	PC_{50} érték [b] (M)	ER TA aktivitás	EC_{50} érték [b], [3] (M)	Egyéb ER TA-k [c]	ER- kötés	Uterotrofikus
1	17ß-ösztradiol [a]	50-28-2	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POZ	$5{,}63 \times 10^{-12}$	POZ (227/227)	POZ	POZ
2	17α-ösztradiol [a]	57-91-0	POZ	$7{,}24 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	POZ	$1{,}40 \times 10^{-9}$	POZ (11/11)	POZ	POZ
3	17α-etinilösztradiol [a]	57-63-6	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POZ	$7{,}31 \times 10^{-12}$	POZ (22/22)	POZ	POZ
4	17β-trenbolon	10161-33-8	POZ	$1{,}78 \times 10^{-8}$	$2{,}73 \times 10^{-7}$	POZ	$4{,}20 \times 10^{-8}$	POZ (2/2)	NT	NT
5	19-norteszto szteron [a]	434-22-0	POZ	$9{,}64 \times 10^{-9}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POZ	$1{,}80 \times 10^{-6}$	POZ (4/4)	POZ	POZ
6	4-kumolfenol [a]	599-64-4	POZ	$1{,}49 \times 10^{-7}$	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POZ	$3{,}20 \times 10^{-7}$	POZ (5/5)	POZ	NT
7	4-*terc*-oktilfenol [a]	140-66-9	POZ	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	POZ	$3{,}19 \times 10^{-8}$	POZ (21/24)	POZ	POZ
8	Apigenin [a]	520-36-5	POZ	$1{,}31 \times 10^{-7}$	$5{,}71 \times 10^{-7}$	POZ	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POZ (26/26)	POZ	NT

	Anyag	CAS-szám	STTA-vizsgálat (1)			VM7Luc ER TA vizsgálat (2)		Osztályozás alapját képező adatforrás (4)		
			ER TA aktivitás	PC_{10} érték (M)	PC_{50} érték (b) (M)	ER TA aktivitás	EC_{50} érték (b), (3) (M)	Egyéb ER TA-k (c)	ER- kötés	Uterotrofikus
9	Atrazin (a)	1912-24-9	NEG	—	—	NEG	—	NEG (30/30)	NEG	NT
10	Biszfenol-A (a)	80-05-7	POZ	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	POZ	$5{,}33 \times 10^{-7}$	POZ (65/65)	POZ	POZ
11	Biszfenol-B (a)	77-40-7	POZ	$2{,}36 \times 10^{-8}$	$2{,}11 \times 10^{-7}$	POZ	$1{,}95 \times 10^{-7}$	POZ (6/6)	POZ	POZ
12	Butilbenzil-ftalát (a)	85-68-7	POZ	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POZ	$1{,}98 \times 10^{-6}$	POZ (12/14)	POZ	NEG
13	Kortikoszteron (a)	50-22-6	NEG	—	—	NEG	—	NEG (6/6)	NEG	NT
14	Kumesztrol (a)	479-13-0	POZ	$1{,}23 \times 10^{-9}$	$2{,}00 \times 10^{-8}$	POZ	$1{,}32 \times 10^{-7}$	POZ (30/30)	POZ	NT
15	Daidzein (a)	486-66-8	POZ	$1{,}76 \times 10^{-8}$	$1{,}51 \times 10^{-7}$	POZ	$7{,}95 \times 10^{-7}$	POZ (39/39)	POZ	POZ
16	Dietilstilbösztrol (a)	56-53-1	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	POZ	$3{,}34 \times 10^{-11}$	POZ (42/42)	POZ	NT
17	Di-n-butil-ftalát	84-74-2	POZ	$4{,}09 \times 10^{-6}$		POZ	$4{,}09 \times 10^{-6}$	POZ (6/11)	POZ	NEG
18	Etilparabén	120-47-8	POZ	$5{,}00 \times 10^{-6}$	(nincs PC_{50})	POZ	$2{,}48 \times 10^{-5}$	POZ		NT
19	Esztron (a)	53-16-7	POZ	$3{,}02 \times 10^{-11}$	$5{,}88 \times 10^{-10}$	POZ	$2{,}34 \times 10^{-10}$	POZ (26/28)	POZ	POZ
20	Geniszten (a)	446-72-0	POZ	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	POZ	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POZ (100/102)	POZ	POZ

	Anyag	CAS-szám	STTA-vizsgálat (1)			VM7Luc ER TA vizsgálat (2)		Osztályozás alapját képező adatforrás (4)		
			ER TA aktivitás	PC_{10} érték (M)	PC_{50} érték (b) (M)	ER TA aktivitás	EC_{50} érték (b), (3) (M)	Egyéb ER TA-k (c)	ER- kötés	Uterotrofikus
21	Haloperidol	52-86-8	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
22	Kempferol (a)	520-18-3	POZ	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	POZ	$3{,}99 \times 10^{-6}$	POZ (23/23)	POZ	NT
23	Kepone (a)	143-50-0	POZ	$7{,}11 \times 10^{-7}$	$7{,}68 \times 10^{-6}$	POZ	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POZ (14/18)	POZ	NT
24	Ketokonazol	65277-42-1	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
25	Linuron (a)	330-55-2	NEG	—	—	NEG	—	NEG (8/8)	NEG	NT
26	*meso*-Hexestrol (a)	84-16-2	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	POZ	$1{,}65 \times 10^{-11}$	POZ (4/4)	POZ	NT
27	Metil-tesztoszteron (a)	58-18-4	POZ	$1{,}73 \times 10^{-7}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POZ	$2{,}68 \times 10^{-6}$	POZ (5/6)	POZ	NT
28	Morin	480-16-0	POZ	$5{,}43 \times 10^{-7}$	$4{,}16 \times 10^{-6}$	POZ	$2{,}37 \times 10^{-6}$	POZ (2/2)	POZ	NT
29	Noretinodrel (a)	68-23-5	POZ	$1{,}11 \times 10^{-11}$	$1{,}50 \times 10^{-9}$	POZ	$9{,}39 \times 10^{-10}$	POZ (5/5)	POZ	NT
30	*p,p'*-Metoxiklór (a)	72-43-5	POZ	$1{,}23 \times 10^{-6}$	(nincs PC_{50}) (b)	POZ	$1{,}92 \times 10^{-6}$	POZ (24/27)	POZ	POZ
31	Fenobarbitál (a)	57-30-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT

	Anyag	CAS-szám	STTA-vizsgálat ([1])			VM7Luc ER TA vizsgálat ([2])		Osztályozás alapját képező adatforrás ([4])		
			ER TA aktivitás	PC_{10} érték (M)	PC_{50} érték ([b]) (M)	ER TA aktivitás	EC_{50} érték ([b]), ([3]) (M)	Egyéb ER TA-k ([c])	ER- kötés	Uterotrofikus
32	Reszerpin	50-55-5	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	NT
33	Spironolakton ([a])	52-01-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	NT
34	Tesztoszteron	58-22-0	POZ	$2{,}82 \times 10^{-8}$	$9{,}78 \times 10^{-6}$	POZ	$1{,}75 \times 10^{-5}$	POZ (5/10)	POZ	NT

Rövidítések: CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám; M = moláris; EC_{50} = a vizsgálati anyag maximális tényleges hatásának felét kiváltó koncentráció; NEG = negatív; POZ = pozitív; NT = nem tesztelt; PC^{10} (és PC_{50}) = a vizsgálati anyagnak az a koncentrációja, amelynél a kiváltott válasz a pozitív kontroll (E2, 1 nm) egyes lemezeken indukált válaszának 10 %-a (illetve PC_{50} esetében 50 %-a).

([a]) A stabilan transzfektált transzaktivációs és a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálatban tesztelt, gyakori előfordulású, ösztrogénreceptor agonistának vagy negatívnak minősített anyagok, amelyeket a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálási tanulmányban a pontosság értékelésére használtak (az ICCVAM VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálatról szóló értékelő jelentése, 4-1. táblázat (3)).

([b]) Mivel nem álltak fent citotoxicitásból vagy oldhatatlanságból fakadó korlátok, a maximális vizsgált koncentráció 1×10^{-5} M (stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálat) és 1×10^{-3} M (VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat) volt.

([c]) A zárójelben feltüntetett szám a pozitív (POZ) vagy negatív (NEG) kategóriába sorolt vizsgálati eredmények és a referenciavizsgálatok teljes számának aránya.

([1]) A „Jelentéstervezet az ösztrogén hatású aktivitás észlelésére szolgáló stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálat elővalidálásáról és laborközi validálásáról – a humán ösztrogénreceptor alfa által közvetített riportergén hER-HeLa-9903 sejtvonallal történő vizsgálata” (2) által közölt értékek.

([2]) Az ICCVAM „LUMI-CELL® ösztrogénreceptor (VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs) vizsgálati módszer: ösztrogénreceptorok agonistáinak és antagonistáinak azonosítására szolgáló *in vitro* módszer” című, vizsgálati módszert értékelő jelentése (3).

([3]) Az átlagos EC_{50} értékek a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálási tanulmányában részt vevő laboratóriumok (XDS, ECVAM és Hijosi) által szolgáltatott adatok alapján kerültek meghatározásra (3).

([4]) Az ösztrogénreceptor agonista és negatív besorolás alapját az ösztrogénreceptor-kötődési és transzaktivációs vizsgálati módszerek felülvizsgálatára vonatkozó ICCVAM-háttérdokumentumokban (31) szereplő információk és az ICCVAM felülvizsgálati háttérdokumentumainak véglegesítése után kiadott és átdolgozott publikációkban közzétett információk képezik (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Megjegyzések: A vizsgálati módszer alapján végzett egyes vizsgálatok mérőszámai eltérőek. Bizonyos helyzetekben – teljes dózis-válasz görbe hiányában – nem lehet meghatározni az EC_{50} értékét. Bár a PC_{10} érték a stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálat fő mérőszámainak egyike, előállhatnak további helyzetek, ahol a PC_X fog hasznos információt nyújtani.

2. táblázat

A stabilan transzfektált transzaktivációs és a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat eredményeinek összevetése azon anyagok vonatkozásában, amelyeket mindkét antagonista vizsgálatban teszteltek, és ösztrogénreceptor antagonistaként (POZ) vagy negatívként (NEG) azonosítottak

	Anyag ([a])	CAS-szám	ER STTA-vizsgálat ([1])		VM7Luc ER TA vizsgálat ([2])		ER STTA vizsgált anyagok hatása ([4])	ICCVAM ([5]) konszenzuson alapuló besorolás	MeSH ([6]) Kémiai osztály	Termékosztály ([7])
			ER TA aktivitás	IC_{50} érték ([b]) (M)	ER TA aktivitás	IC_{50} érték ([b]), ([3]) (M)				
1	4-hidroxitamoxifén	68047-06-3	POZ	$3{,}97 \times 10^{-9}$	POZ	$2{,}08 \times 10^{-7}$	mérsékelten POZ	POZ	Szénhidrogén (ciklikus)	Gyógyszer
2	Dibenzo[a,h]antracén	53-70-3	POZ	Nincs IC_{50}	POZ	Nincs IC_{50}	POZ	FP	Policiklikus vegyület	Laboratóriumi vegyi anyag, természetes termék
3	Mifepriszton	84371-65-3	POZ	$5{,}61 \times 10^{-6}$	NEG	—	enyhén POZ	NEG	Szteroid	Gyógyszer
4	Raloxifen-hidroklorid	82640-04-8	POZ	$7{,}86 \times 10^{-10}$	POZ	$1{,}19 \times 10^{-9}$	mérsékelten POZ	POZ	Szénhidrogén (ciklikus)	Gyógyszer
5	Tamoxifén	10540-29-1	POZ	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POZ	$8{,}17 \times 10^{-7}$	POZ	POZ	Szénhidrogén (ciklikus)	Gyógyszer
6	17β-ösztradiol	50-28-2	NEG	—	NEG	—	FN	FN	Szteroid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
7	Apigenin	520-36-5	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Heterociklikus vegyület	Festék, természetes termék, gyógyszerészeti köztes termék

	Anyag [a]	CAS-szám	ER STTA-vizsgálat [1]		VM7Luc ER TA vizsgálat [2]		ER STTA vizsgált anyagok hatása [4]	ICCVAM [5] konszenzuson alapuló besorolás	MeSH [6] Kémiai osztály	Termékosztály [7]
			ER TA aktivitás	IC_{50} érték [b] (M)	ER TA aktivitás	IC_{50} érték [b], [3] (M)				
8	Atrazin	1912-24-9	NEG	—	NEG	—	NEG	FN	Heterociklikus vegyület	Gyomirtó szer
9	Di-n-butil-ftalát	84-74-2	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Észter, ftálsav	Kozmetikai összetevő, ipari vegyi anyag, lágyítószer
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG	—	NEG	—	nem vizsgált	FN	Heterociklikus vegyület, pirimidin	Gombaölő szer
11	Flavon	525-82-6	NEG	—	NEG	—	FN	FN	Flavonid, heterociklikus vegyület	Természetes termék, gyógyszer
12	Flutamid	13311-84-7	NEG	—	NEG	—	NEG	FN	Amid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
13	Geniszten	446-72-0	NEG	—	NEG	—	FN	NEG	Flavonid, heterociklikus vegyület	Természetes termék, gyógyszer
14	p-n-nonilfenol	104-40-5	NEG	—	NEG	—	nem vizsgált	NEG	Fenol	Köztes vegyi anyag

	Anyag ([a])	CAS-szám	ER STTA-vizsgálat ([1])		VM7Luc ER TA vizsgálat ([2])		ER STTA vizsgált anyagok hatása ([4])	ICCVAM ([5]) konszenzuson alapuló besorolás	MeSH ([6]) Kémiai osztály	Termékosztály ([7])
			ER TA aktivitás	IC_{50} érték ([b]) (M)	ER TA aktivitás	IC_{50} érték ([b]), ([3]) (M)				
15	Rezveratrol	501-36-0	NEG	—	NEG	—	FN	NEG	Szénhidrogén (ciklikus)	Természetes termék

Rövidítések: CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám; M = moláris; IC_{50} = a vizsgálati anyag maximális gátló hatásának felét kiváltó koncentráció; NEG = negatív; FN = feltételezhetően negatív; POZ = pozitív; FP = feltételezhetően pozitív.

([a]) A stabilan transzfektált transzaktivációs és a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálatban tesztelt, gyakori előfordulású, ösztrogénreceptor antagonistának vagy negatívnak minősített anyagok, amelyeket a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálási tanulmányban a pontosság értékelésére használtak (2) (3).

([b]) Mivel nem álltak fent citotoxicitásból vagy oldhatatlanságból fakadó korlátok, a maximális vizsgált koncentráció 1×10^{-3} M (stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálat) és 1×10^{-5} M (VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat) volt.

([1]) Ösztrogénreceptorok által közvetített aktivitás észlelésére szolgáló, stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálat validálási jelentése, B rész (2).

([2]) Az ICCVAM „LUMI-CELL® ösztrogénreceptor (VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs) vizsgálati módszer: ösztrogénreceptorok agonistáinak és antagonistáinak azonosítására szolgáló *in vitro* módszer" című, vizsgálati módszert értékelő jelentése (3).

([3]) Az átlagos IC_{50} értékek a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálási tanulmányában részt vevő laboratóriumok (XDS, ECVAM és Hijosi) által szolgáltatott adatok alapján kerültek meghatározásra (3).

([4]) A vizsgálat anyagok ösztrogénreceptor stabilan transzfektált transzaktivációs aktivitására az ösztrogénreceptor-kötődési vizsgálat CERI által dokumentált adataiból, az uterotrofikus vizsgálatból és a szabadon hozzáférhető szakirodalomban (2) szereplő információkból ismert hatásuk alapján következtettek.

([5]) Az ösztrogénreceptor antagonista vagy negatív besorolás alapját az ösztrogénreceptor-kötődési és transzaktivációs vizsgálatok felülvizsgálatára vonatkozó ICCVAM-háttérdokumentumokban (31) szereplő információk és az ICCVAM felülvizsgálati háttérdokumentumainak véglegesítése után kiadott és átdolgozott publikációkban közzétett információk képezik (2) (3) (18) (31).

([6]) Az anyagok egy vagy több kémiai osztályba sorolása az Egyesült Államok nemzetközileg elismert szabványosított osztályozási rendszere, a Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) nemzeti könyvtára alapján történt (elérhető a következő címen: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Az anyagok egy vagy több termékosztályba sorolása az Egyesült Államok Medicine's Hazardous Substances Data Bank nemzeti könyvtára alapján történt (elérhető a következő címen: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI

A vizsgálat alapvető összetevői

11. Ez a vizsgálati módszer olyan vizsgálatokra alkalmazható, amelyek stabilan transzfektált vagy endogén ösztrogénreceptor α-t, valamint egy stabilan transzfektált, egy vagy több ösztrogén válaszelemmel szabályozott riportergén konstrukciót használnak, amelyben azonban más receptorok, például ösztrogénreceptor β is jelen lehet. Ezek a vizsgálat alapvető összetevői.

Kontrollok

12. Meg kell határozni az egyes agonista és antagonista vizsgálatokhoz javasolt, párhuzamosan tesztelt referenciaszabvány alapját. A párhuzamos kontrollok (negatív, pozitív és oldószeres) arra szolgálnak, hogy igazolják a vizsgálat tesztkörülmények közötti megfelelő működését, és megteremtsék az alapját az egyes kísérletek összevetésének; általában részét képezik a szóban forgó kísérlet elfogadhatósági kritériumainak (1).

Standard minőség-ellenőrzési eljárások

13. Az egyes vizsgálatokhoz meghatározott standard minőség-ellenőrzési eljárásokat kell végezni annak biztosítása érdekében, hogy a sejtvonalak több passzálást követően is stabilak maradjanak, mikoplazmától (vagyis bakteriális fertőzéstől) mentesek legyenek, és később is megismételhetőek legyenek az ösztrogénreceptor által közvetített várt válaszreakciók. Emellett ellenőrizni kell a sejtvonalak megfelelő azonosságát, valamint az egyéb fertőző ágensek (pl. gombák, élesztő és vírusok) hiányát.

A laboratórium jártasságának igazolása

14. Mielőtt ismeretlen vegyi anyagokat tesztelnének az e vizsgálati módszerhez kapcsolódó bármely vizsgálattal, a laboratóriumoknak igazolniuk kell az adott vizsgálat alkalmazásában szerzett jártasságukat. A jártasság igazolásához minden laboratóriumnak tesztelnie kell az agonista vizsgálat 3. táblázatban feltüntetett 14 jártassági tesztanyagát és az antagonista vizsgálat 4. táblázatban szereplő 10 jártassági tesztanyagát. E jártassági vizsgálatok bizonyítják a vizsgálati rendszer reagálóképességét is. A jártassági tesztanyagok jegyzéke az ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálatok teljesítményszabványaiban (6) megadott referenciaanyagok egy csoportjából tevődik össze. Ezek az anyagok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők, olyan kémiai osztályokat képviselnek, amelyeknél gyakori az ösztrogénreceptor agonista vagy antagonista aktivitás, az ösztrogénreceptor agonistáktól és antagonistáktól elvárt potenciál megfelelő tartományát képviselik (erőstől a gyengéig) és vannak közöttük negatív besorolású anyagok is. A jártassági tesztanyagok vizsgálatát legalább kétszer, különböző napokon meg kell ismételni. A jártasság az egyes jártassági tesztanyagok megfelelő (pozitív/negatív) osztályba sorolásával igazolható. A vizsgálat elsajátítása során a jártassági vizsgálatot minden technikusnak meg kell ismételnie. Sejttípustól függően e jártassági tesztanyagok némelyike szelektív ösztrogénreceptor modulátorként viselkedhet, vagyis kifejthet agonista és antagonista aktivitást is. Azonban a jártassági tesztanyagok 3. és 4. táblázatban ismertetett besorolása ismert domináns aktivitásuk alapján történt, azt kell figyelembe venni a jártassági értékelés során.

15. A vizsgálat teljesítményének igazolása és minőség-ellenőrzés céljából minden laboratóriumnak referenciaszabványok (pl. 17β-ösztradiol és tamoxifén), kontrollként szolgáló pozitív és negatív vegyi anyagok, valamint oldószeres kontrollanyagok (pl. DMSO) adataiból álló agonista és antagonista adatbázisokat kell létrehozniuk. Az induló adatbázist legalább 10 független agonista (pl. 17β-ösztradiol) és 10 független antagonista (pl. tamoxifén) vizsgálatmenet alapján kell létrehozni. Az adatbázist ki kell bővíteni e referenciaszabványok és oldószeres kontrollanyagok későbbi elemzéseiből származó eredményekkel, hogy az idő múlásával is biztosítani lehessen a biológiai vizsgálat konzisztenciáját és teljesítményét.

3. táblázat

Az agonista vizsgálathoz használatos jártassági tesztanyagok (14) jegyzéke [1]

Szám [8]	Anyag	CAS-szám	Várt válasz [2]	STTA-vizsgálat			VM7Luc ER TA vizsgálat		MeSH kémiai osztály [6]	Termékosztály [7]
				PC_{10} érték (M) [3]	PC_{50} érték (M) [3]	Vizsgálati koncentrációtartomány (M)	VM7Luc EC_{50} érték (M) [4]	Legmagasabb konc. dózisbehatároláshoz (M) [5]		
14	Dietilstilbösztrol	56-53-1	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	10^{-14}–10^{-8}	$3{,}34 \times 10^{-11}$	$3{,}73 \times 10^{-4}$	Szénhidrogén (ciklikus)	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
12	17α-ösztradiol	57-91-0	POZ	$4{,}27 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	10^{-11}–10^{-5}	$1{,}40 \times 10^{-9}$	$3{,}67 \times 10^{-3}$	Szteroid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
15	*meso*-Hexestrol	84-16-2	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	10^{-11}–10^{-5}	$1{,}65 \times 10^{-11}$	$3{,}70 \times 10^{-3}$	Szénhidrogén (ciklikus), fenol	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
11	4-*terc*-oktilfenol	140-66-9	POZ	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	10^{-11}–10^{-5}	$3{,}19 \times 10^{-8}$	$4{,}85 \times 10^{-3}$	Fenol	Köztes vegyi anyag
9	Geniszten	446-72-0	POZ	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	10^{-11}–10^{-5}	$2{,}71 \times 10^{-7}$	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Flavonid, heterociklikus vegyület	Természetes termék, gyógyszer
6	Biszfenol-A	80-05-7	POZ	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	10^{-11}–10^{-5}	$5{,}33 \times 10^{-7}$	$4{,}38 \times 10^{-3}$	Fenol	Köztes vegyi anyag

Szám ([8])	Anyag	CAS-szám	Várt válasz ([2])	STTA-vizsgálat			VM7Luc ER TA vizsgálat		MeSH kémiai osztály ([6])	Termékosztály ([7])
				PC_{10} érték (M) ([3])	PC_{50} érték (M) ([3])	Vizsgálati koncentrációtartomány (M)	VM7Luc EC_{50} érték (M) ([4])	Legmagasabb konc. dózisbehatároláshoz (M) ([5])		
2	Kempferol	520-18-3	POZ	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	10^{-11}–10^{-5}	$3{,}99 \times 10^{-6}$	$3{,}49 \times 10^{-3}$	Flavonid, heterociklikus vegyület	Természetes termék
3	Butilbenzil-ftalát	85-68-7	POZ	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	10^{-11}–10^{-5}	$1{,}98 \times 10^{-6}$	$3{,}20 \times 10^{-4}$	Karbonsav, észter, ftálsav	Lágyítószer, ipari vegyi anyag
4	*p,p'*-Methoxyklór	72-43-5	POZ	$1{,}23 \times 10^{-6}$	—	10^{-11}–10^{-5}	$1{,}92 \times 10^{-6}$	$2{,}89 \times 10^{-3}$	Szénhidrogén (halogénezett)	Növényvédő szer, állatgyógyászati hatóanyag
1	Etilparabén	120-47-8	POZ	$5{,}00 \times 10^{-6}$	—	10^{-11}–10^{-5}	$2{,}48 \times 10^{-5}$	$6{,}02 \times 10^{-3}$	Karbonsav, fenol	Gyógyszer, konzerváló szer
17	Atrazin	1912-24-9	NEG	—	—	10^{-10}–10^{-4}	—	$4{,}64 \times 10^{-4}$	Heterociklikus vegyület	Gyomirtó szer
20	Spironolakton	52-01-7	NEG	—	—	10^{-11}–10^{-5}	—	$2{,}40 \times 10^{-3}$	Lakton, szteroid	Gyógyszer

Szám ([8])	Anyag	CAS-szám	Várt válasz ([2])	STTA-vizsgálat			VM7Luc ER TA vizsgálat		MeSH kémiai osztály ([6])	Termékosztály ([7])
				PC_{10} érték (M) ([3])	PC_{50} érték (M) ([3])	Vizsgálati koncentrációtartomány (M)	VM7Luc EC_{50} érték (M) ([4])	Legmagasabb konc. dózisbehatároláshoz (M) ([5])		
21	Ketokonazol	65277-42-1	NEG	—	—	10^{-11}–10^{-5}	—	$9{,}41 \times 10^{-5}$	Heterociklikus vegyület	Gyógyszer
22	Reszerpin	50-55-5	NEG	—	—	10^{-11}–10^{-5}	—	$1{,}64 \times 10^{-3}$	Heterociklikus vegyület, indol	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag

Rövidítések: CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám; EC_{50} = a vizsgálati anyag maximális tényleges hatásának felét kiváltó koncentráció; NEG = negatív; POZ = pozitív; PC^{10} (és PC_{50}) = a vizsgálati anyagnak az a koncentrációja, amelynél a kiváltott válasz a pozitív kontroll (E2, 1 nm) egyes lemezeken indukált válaszának 10 %-a (illetve PC_{50} esetében 50 %-a).

([1]) Az ösztrogénreceptor agonista aktivitás pozitív vagy negatív besorolásának alapját az ösztrogénreceptor-kötődési és transzaktivációs vizsgálatok felülvizsgálatára vonatkozó ICCVAM-háttérdokumentumok (31) és az ICCVAM felülvizsgálati háttérdokumentumainak véglegesítése után kiadott és átdolgozott referenciavizsgálatokból nyert empirikus adatok és egyéb információk képezik (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

([2]) A „Jelentéstervezet az ösztrogén hatású aktivitás észlelésére szolgáló stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálat elővalidálásáról és laborközi validálásáról – a humán ösztrogénreceptor alfa által közvetített riportergén hER-HeLa-9903 sejtvonallal történő vizsgálata” (30) által közölt értékek.

([3]) Az átlagos EC_{50} értékek a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálási tanulmányában részt vevő laboratóriumok (XDS, ECVAM és Hijosi) által szolgáltatott adatok alapján kerültek meghatározásra (3).

([4]) A jelzett koncentrációértékek a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálása során (dózisbehatárolás céljából) vizsgált legmagasabb koncentrációk. Amennyiben az egyes laboratóriumok eltérő koncentrációértékeket alkalmaztak, a legmagasabb koncentráció került feltüntetésre. Lásd az ICCVAM „LUMI-CELL® ösztrogénreceptor (VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs) vizsgálati módszer: a vegyi anyagok humán ösztrogénreceptorokra kifejtett agonista és antagonista aktivitásának azonosítására szolgáló *in vitro* vizsgálat” című (3), vizsgálati módszert értékelő jelentésének 4-10. táblázatát.

([5]) Az anyagok egy vagy több kémiai osztályba sorolása az Egyesült Államok nemzetközileg elismert szabványosított osztályozási rendszere, a Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) nemzeti könyvtára alapján történt (elérhető a következő címen: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([6]) Az anyagok egy vagy több termékosztályba sorolása az Egyesült Államok Medicine's Hazardous Substances Database nemzeti könyvtára alapján történt (elérhető a következő címen: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)

([7]) A teljesítményszabványok (6) 1. táblázatából (az ösztrogénreceptor agonisták meghatározása pontosságának értékelésére használt referencia vegyi anyagok (22) jegyzéke).

([8]) Amennyiben egy adott jártassági tesztanyag kereskedelmi forgalmazása megszűnik, akkor használható helyette egy azonos besorolású, hasonló potenciállal és hatásmechanizmussal rendelkező, azonos kémiai osztályba tartozó anyag.

4. táblázat

Az antagonista vizsgálathoz használatos jártassági tesztanyagok (10) jegyzéke

	Anyag [a]	CAS-szám	ER STTA-vizsgálat [1]			VM7Luc ER TA vizsgálat [2]			ER STTA [1] vizsgált anyagok hatása	ICCVAM [5] konszenzuson alapuló besorolás	MeSH [6] Kémiai osztály	Termékosztály [7]
			ER TA aktivitás	IC_{50} (M)	Vizsgálati koncentráció-tartomány (M)	ER TA aktivitás	IC_{50} [3] (M)	Legmagasabb konc. dózisbe-határoláshoz (M) [4]				
1	4-hidroxita-moxifén	68047-06-3	POZ	$3{,}97 \times 10^{-9}$	10^{-12} –10^{-7}	POZ	$2{,}08 \times 10^{-7}$	$2{,}58 \times 10^{-4}$	mérsékelten POZ	POZ	Szénhidrogén (ciklikus)	Gyógyszer
2	Raloxifen-hidroklorid	82640-04-8	POZ	$7{,}86 \times 10^{-10}$	10^{-12} –10^{-7}	POZ	$1{,}19 \times 10^{-9}$	$1{,}96 \times 10^{-4}$	mérsékelten POZ	POZ	Szénhidrogén (ciklikus)	Gyógyszer
3	Tamoxifén	10540-29-1	POZ	$4{,}91 \times 10^{-7}$	10^{-10} –10^{-5}	POZ	$8{,}17 \times 10^{-7}$	$2{,}69 \times 10^{-4}$	POZ	POZ	Szénhidrogén (ciklikus)	Gyógyszer
4	17β-öszt-radiol	50-28-2	NEG	—	10^{-9} –10^{-4}	NEG	—	$3{,}67 \times 10^{-3}$	negatívnak kell lennie (*)	FN	Szteroid	Gyógyszer, állat-gyógyászati hatóanyag
5	Apigenin	520-36-5	NEG	—	10^{-9} –10^{-4}	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Heterociklikus vegyület	Festék, termé-szetes termék, gyógyszerészeti köztes termék
6	Di-n-butil-ftalát	84-74-2	NEG	—	10^{-8} –10^{-3}	NEG	—	$3{,}59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Észter, ftálsav	Kozmetikai összetevő, ipari vegyi anyag, lágyítószer

	Anyag ([a])	CAS-szám	ER STTA-vizsgálat ([1])			VM7Luc ER TA vizsgálat ([2])			ER STTA ([1]) vizsgált anyagok hatása	ICCVAM ([5]) konszenzuson alapuló besorolás	MeSH ([6]) Kémiai osztály	Termékosztály ([7])
			ER TA aktivitás	IC_{50} (M)	Vizsgálati koncentráció-tartomány (M)	ER TA aktivitás	IC_{50} ([3]) (M)	Legmagasabb konc. dózisbe-határoláshoz (M) ([4])				
7	Flavon	525-82-6	NEG	—	10^{-8} –10^{-3}	NEG	—	$4{,}50 \times 10^{-4}$	negatívnak kell lennie (*)	FN	Flavonid, hete-rociklikus vegyület	Természetes termék, gyógy-szer
8	Geniszten	446-72-0	NEG	—	10^{-9} –10^{-4}	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	negatívnak kell lennie (*)	NEG	Flavonid, hete-rociklikus vegyület	Természetes termék, gyógy-szer
9	p-n-nonilfe-nol	104-40-5	NEG	—	10^{-9} –10^{-4}	NEG	—	$4{,}54 \times 10^{-4}$	nem vizsgált	NEG	Fenol	Köztes vegyi anyag
10	Rezveratrol	501-36-0	NEG	—	10^{-8} –10^{-3}	NEG	—	$4{,}38 \times 10^{-4}$	negatívnak kell lennie (*)	NEG	Szénhidrogén (ciklikus)	Természetes termék

Rövidítések: CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám; M = moláris; IC_{50} = a vizsgálati anyag maximális gátló hatásának felét kiváltó koncentráció; NEG = negatív; FN = feltételezhetően negatív; POZ = pozitív.

(*) a szakirodalmi áttekintésben negatívként besorolva (2).

([a]) A stabilan transzfektált transzaktivációs és a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálatban tesztelt, gyakori előfordulású, ösztrogénreceptor antagonistának vagy negatívnak minősített anyagok, amelyeket a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálási tanulmányban a pontosság értékelésére használtak (2) (3).

([1]) ösztrogénreceptorok által közvetített aktivitás észlelésére szolgáló, stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálat validálási jelentése, B rész (2).

([2]) Az ICCVAM „LUMI-CELL ösztrogénreceptor (VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs) vizsgálati módszer: ösztrogénreceptorok agonistáinak és antagonistáinak azonosítására szolgáló *in vitro* módszer" című, vizsgálati módszert értékelő jelentése (3).

([3]) Az átlagos IC_{50} értékek a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálási tanulmányában részt vevő laboratóriumok (XDS, ECVAM és Hijosi) által szolgáltatott adatok alapján kerültek meghatározásra (3).

([4]) A jelzett koncentrációértékek a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálása során (dózisbehatárolás céljából) vizsgált legmagasabb koncentrációk. Amennyiben az egyes laboratóriumok eltérő koncentrációértékeket alkalmaztak, a legmagasabb koncentráció került feltüntetésre. Lásd az ICCVAM vizsgálati módszert értékelő jelentésének 4-11. táblázatát. A „LUMI-CELL® ER (VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs) vizsgálati módszer: a vegyi anyagok humán ösztrogénreceptorokra kifejtett agonista és antagonista aktivitásának azonosítására szolgáló *in vitro* vizsgálat" című (3), vizsgálati módszert értékelő jelentésébe.

([5]) Az ösztrogénreceptor antagonista vagy negatív besorolás alapját az ösztrogénreceptor-kötődési és transzaktivációs vizsgálati módszerek felülvizsgálatára vonatkozó ICCVAM-háttérdokumentumokban (31) szereplő információk és az ICCVAM felülvizsgálati háttérdokumentumainak véglegesítése után kiadott és átdolgozott publikációkban közzétett információk képezik (2) (3) (18) (31).

([6]) Az anyagok egy vagy több kémiai osztályba sorolása az Egyesült Államok nemzetközileg elismert szabványosított osztályozási rendszere, a Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) nemzeti könyvtára alapján történt (elérhető a következő címen: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Az anyagok egy vagy több termékosztályba sorolása az Egyesült Államok Medicine's Hazardous Substances Data Bank nemzeti könyvtára alapján történt (elérhető a következő címen: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

A vizsgálatmenet elfogadhatósági kritériumai

16. A vizsgálatmenetek elfogadására vagy elvetésére az egyes kísérletekben alkalmazott referenciaszabványok és kontrollanyagok eredményeinek értékelése alapján kerül sor. A referenciaszabványok PC_{50} (EC_{50}) vagy IC_{50} értékének meg kell felelnie a választott vizsgálat elfogadhatósági kritériumainak (ezeket a stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálat esetében a 2. függelék, a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat esetében a 3. függelék tartalmazza), és minden elfogadott kísérletben megfelelően kell besorolni az összes pozitív/negatív kontrollanyagot. A vizsgálat következetes végrehajtásának képességét bizonyítani kell azáltal, hogy a laboratóriumok adatbázist hoznak létre és tartanak fent a referenciaszabványok és kontrollanyagok adataiból (lásd a 15. pontot). A laboratóriumon belüli reprodukálhatóság mérésére használhatók a referenciaszabványok átlagához illesztett, több kísérletből származó paraméterekből álló görbe standard deviációi (SD) vagy variációs koefficiensei (CV). Ezenkívül érvényesülniük kell az elfogadhatósági kritériumokra vonatkozó alábbi elveknek is:

— Elegendő mennyiségű adattal kell rendelkezni ahhoz, hogy számszerűen értékelni lehessen az ösztrogénreceptor aktivitást (agonista vizsgálat esetén) vagy gátlást (antagonista vizsgálat esetén) (vagyis a hatékonyságot és a potenciált).

— A megfelelő érzékenység biztosítása érdekében a referenciaösztrogén referenciakoncentrációjánál kifejtett átlagos riporter aktivitásnak – a vivőanyagos (oldószeres) kontroll esetén tapasztalt aktivitáshoz képest – el kell érnie legalább a vizsgálatokban meghatározott minimumszintet. A stabilan transzfektált transzaktivációs és a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat esetén ez a minimumszint az egyes lemezeken vizsgált vivőanyagos kontrollok átlagának négyszerese.

— A vizsgált koncentrációknak a vizsgálati vegyi anyagok oldhatósági tartományán belül kell maradniuk és nem okozhatnak citotoxicitást.

Az adatok elemzése

17. A válaszok pozitív vagy negatív kategóriába sorolásakor az egyes vizsgálatokhoz meghatározott adatértelmezési eljárásra kell támaszkodni.

18. Az elfogadhatósági kritériumok (16. pont) teljesítése jelzi a vizsgálat megfelelő működését, de nem garantálja az egyes vizsgálatmenetek adatainak pontosságát. Az adatok pontosságát az jelzi a legjobban, ha az első vizsgálatmenet eredményei megismételhetők. Amennyiben két vizsgálatmenet bizonyította az eredmény reprodukálhatóságát (például egy adott vizsgálati vegyi anyag mindkét vizsgálatmenetben pozitívnak bizonyult), akkor harmadik vizsgálatmenetre nincs szükség.

19. Ha két vizsgálatmenet nem bizonyítja az eredmény reprodukálhatóságát (például egy vizsgálati vegyi anyag az egyik vizsgálatmenetben pozitívnak, a másikban negatívnak minősült), vagy magasabb fokú bizonyosságot kell szerezni a vizsgálat kimeneteléről, legalább három egymástól független vizsgálatmenetet kell lefolytatni. Ebben az esetben az osztályozás alapja a három vizsgálatmenet során kialakult két megegyező eredmény lesz.

Az adatok értelmezésének általános kritériumai

20. Jelenleg nincs általánosan elfogadott módszer az ösztrogénreceptor transzaktivációs adatok értelmezésére. Ugyanakkor az ösztrogénreceptor által közvetített aktivitás kvalitatív (pl. pozitív/negatív) és/vagy kvantitatív (pl. EC_{50}, PC_{50}, IC_{50}) értékelésének empirikus adatokon és megalapozott tudományos véleményen kell nyugodnia. A pozitív eredményeket lehetőség szerint jellemezni kell mind a vivőanyagos (oldószeres) kontrollhoz vagy referenciaösztrogénhez képest előidézett hatás mértékével, mind a hatást kiváltó koncentrációval (pl. EC_{50}, PC_{50}, RPC_{Max}, IC_{50} stb.).

Vizsgálati jelentés

21. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálat:

— az alkalmazott vizsgálat;

— kontroll/referenciaszabvány/vizsgálati vegyi anyag;

— eredet, gyártási szám, felhasználási határidő, ha rendelkezésre áll;

— A vizsgálati vegyi anyag stabilitása, ha ismert;

— A vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben, ha ismert;

— adott esetben a pH-érték, az ozmolalitás és a kicsapódás mérése abban a tápfolyadékban, amelyhez a vizsgálati vegyi anyagot hozzáadták.

Egy összetevőből álló anyag:

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai révén jellemezve.

Oldószer/vivőanyag:

— jellemzés (az anyag természete, forgalmazója és gyártási száma);

— az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása;

— A vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert.

Sejtek:

— A sejtek típusa és eredete;

  • endogén módon fejeződött ki az ösztrogénreceptor? Ha nem, mely receptor(oka)t transzfektálták?;

  • az alkalmazott riporterkonstrukció(k) (ideértve a forrást);

  • transzfektálási módszer;

  • A stabil transzfekció fenntartására alkalmazott szelekció (ahol van);

  • A transzfektálási módszer releváns a stabil sejtvonalak szempontjából?

— sejtpasszálások száma (felolvasztástól);

— passzált sejtek száma felolvasztáskor;

— A sejttenyészetek fenntartásának módszerei.

Vizsgálati körülmények:

— oldhatóság korlátai;

— az életképesség felmérésére alkalmazott módszer leírása;

— A közeg összetétele, CO_2-koncentráció;

— A vizsgálati vegyi anyag koncentrációi;

— A hozzáadott vivőanyag és vizsgálati vegyi anyag mennyisége;

— inkubációs hőmérséklet és páratartalom;

— A kezelés időtartama;

— sejtsűrűség a kezelés elején és annak időtartama alatt;

— pozitív és negatív referenciaszabványok;

— riporter reagensek (a termék neve, forgalmazója és gyártási száma);

— azok a kritériumok, amelyek meghatározzák, hogy a vizsgálatmenetek pozitívnak, negatívnak vagy többféleképpen értelmezhetőnek tekintendők-e.

Elfogadhatóság ellenőrzése:

— az egyes vizsgálati lemezek indukciós faktorai, illetve hogy az indukciós faktorok a dokumentált kontrollok alapján megfelelnek-e a vizsgálathoz szükséges minimumnak;

— az elfogadhatósági kritériumok tényleges értékei, pl. a párhuzamos pozitív kontrollok/referenciaszabványok $\log_{10}EC_{50}$, $\log_{10}PC_{50}$, $\log IC_{50}$ és Hill-meredekségi értékei.

Eredmények:

— nyers és normalizált adatok;

— az indukciós faktor maximális szintje;

— citotoxicitási adatok;

— ha létezik, a legkisebb hatásos koncentráció (LEC);

— adott esetben az RPC^{Max}, PC_{Max}, PC_{50}, IC_{50} és/vagy EC_{50} értékek;

— amennyiben lehetséges, a koncentráció-válasz összefüggés;

— statisztikai elemzések, ha végeztek ilyeneket, hiba- és megbízhatósági számításokkal (pl. SEM, SD, CV vagy 95 % CI), és annak leírása, hogy milyen módon kapták ezeket az értékeket.

Az eredmények értékelése

Következtetések

SZAKIRODALOM

(1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34.), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(2) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(4) Pujol P. *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer. Res., 58(23): p. 5367-73.

(5) Rogers J.M. and Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In vitro* and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research, 13(1): p. 67-82.

(6) OECD (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 173.), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(7) OECD (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 174.), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(8) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150.), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. Climacteric, 5 Suppl 2: p. 20- 6.

(10) Welboren W.J. *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? Endocr. Relat. Cancer, 16(4): p. 1073-89.

(11) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. Pathol. Lab. Med., 135(1): p. 63- 6.

(12) Jefferson W.N., *et al.* (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, Journal of Chromatography B, 777(1-2): p. 179-189.

(13) Sonneveld E. *et al.* (2006). Comparison of *In vitro* and *In vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol.* Sci., 89(1): p. 173-187.

(14) Takeyoshi M. *et al.* (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, Toxicology Letters, 126(2): p. 91- 98.

(15) Combes R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In vitro* and *In vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, ATLA Alternatives to Laboratory Animals,28(1): p. 81-118.

(16) Escande A. *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol,71(10): p. 1459-69.

(17) Gray L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol.* Lett, 102-103, 677-680.

(18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.

(19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(20) Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Receptor ß - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, Journal of Endocrinology, 163(3): p. 379-383.

(21) Ogawa S. *et al.* (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor ß (hERß) and its Heterodimerization with ERα *In vivo* and *In vitro,* Biochemical and Biophysical Research Communications, 243(1): p. 122-126.

(22) Enmark E. *et al.* (1997). Human Estrogen Receptor ß-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,82(12): p. 4258-4265.

(23) Ball L.J. *et al.* (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, Molecular and Cellular Endocrinology, 299(2): p. 204-211.

(24) Barkhem T. *et al.* (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, Mol. Pharmacol, 54(1): p. 105-12.

(25) Deroo B.J. and Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor-ß: Mechanistic Insights from Recent Studies, Molecular Endocrinology, 24(9): p. 1703-1714.

(26) Harris D.M. *et al.* (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, Experimental Biology and Medicine, 230(8): p. 558-568.

(27) Anderson J.N. Clark J.H. and Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, Biochemical and Biophysical Research Communications, 48(6): p. 1460-1468.

(28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, Journal of Steroid Biochemistry, 3(3): p. 515-522.

(29) Gorski J. *et al.* (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, Recent Progress in Hormone Research, 24: p. 45-80.

(30) Jensen E.V. *et al*. (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale, 56(3):p. 547-569.

(31) ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (No 03-4505.).

(32) Kanno J. *et al*. (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, Environ. Health Persp., 109:785-94.

(33) Kanno J. *et al*. (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose -Response Studies, Environ. Health Persp., 111:1530-1549.

(34) Kanno J. *et al*. (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, Environ. Health Persp., 111:1550-1558.

(35) Geisinger *et al*. (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(36) Baldwin *et al*. (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(37) Li, Y. *et al*. (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(38) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS RÖVIDÍTÉSEK

Elfogadhatósági kritériumok: a kísérleti kontrollok és referenciaszabványok megfelelőségére vonatkozó minimális előírások. Ahhoz, hogy egy kísérlet érvényesnek minősüljön, meg kell felelni valamennyi elfogadhatósági kritériumnak.

Pontosság (egyezőség): a vizsgálati eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés eltérése. A vizsgálat megfelelőségének mutatója, és relevanciájának egyik szempontja. E kifejezést gyakran használják az „egyezőség" szinonimájaként, amely arra utal, hogy egy adott vizsgálat milyen arányban szolgáltat helyes eredményeket (1).

Agonista: olyan anyag, amely egy specifikus receptorhoz kötődve valamilyen választ, pl. transzkripciót vált ki.

Antagonista: a receptor ligandumok vagy vegyi anyagok azon típusa, amely egy receptorhoz kötődve nem vált ki biológiai válaszreakciót, hanem gátolja vagy tompítja az agonisták által indukált válaszokat.

Antiösztrogén aktivitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy gátolja az ösztrogénreceptorok által közvetített 17β-ösztradiol hatását.

Sejtmorfológia: egy szövettenyészetet tartalmazó lemez egyetlen lyukában lévő egyrétegű sejtek alakja és megjelenési formája. Az elhaló sejtek gyakran a normálistól eltérő sejtmorfológiával rendelkeznek.

CF: Az OECD endokrin rendszert károsító anyagok vizsgálatára és értékelésére szolgáló fogalmi kerete.

Aktív szén/dextrán kezelés: a sejtkultúrához használt szérum kezelési módja. Az aktív szénnel/dextránnal végzett kezelés (szaknyelven „stripping-eljárás") során eltávolítják az endogén hormonokat és hormonmegkötő fehérjéket.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Citotoxicitás: a sejtstruktúrát vagy a sejtfunkciót érő káros hatások, amelyek végső soron sejtpusztuláshoz vezethetnek, kimutatásához összevetik a lyukban növő sejtek számában az expozíciós időszak végére bekövetkezett csökkenést vagy a mérhető sejtfunkciók csökkenését a párhuzamos vivőanyagos kontrollal.

CV: variációs koefficiens.

DCC-FBS: dextránbevonatú aktív szénnel kezelt magzati borjú szérum.

DMEM: Dulbecco-féle módosított Eagle-tápoldat.

DMSO: dimetil-szulfoxid.

E2: 17β-ösztradiol

EC_{50}: a vizsgálati vegyi anyag maximális hatásának felét kiváltó koncentráció.

ED: az endokrin rendszer károsítása.

hERα: humán ösztrogénreceptor alfa.

hERß: humán ösztrogénreceptor béta.

EFM: ösztrogénmentes közeg. A Dulbecco-féle módosított Eagle-tápoldat (DMEM) kiegészítve 4,5 % dextránbevonatú aktív szénnel kezelt magzati borjú szérummal, 1,9 % L-glutaminnal és 0,9 % penicillinnel és sztreptomicinnel.

ER: ösztrogénreceptor.

ERE: ösztrogén válaszelem.

Ösztrogénhatású aktivitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy a 17β-ösztradiolhoz hasonlóan ösztrogénreceptorokhoz kötődjön és aktiválja azokat. Ezzel a vizsgálati módszerrel a humán ösztrogénreceptor alfa által közvetített ösztrogénhatású aktivitás észlelhető.

ER TA: ösztrogénreceptor transzaktiváció.

FBS: magzati borjú szérum.

HeLa: humán méhnyakból származó halhatatlan sejtvonal.

HeLa9903: egy hERαα-val és egy luciferáz riportergénnel stabilan transzfektált HeLa-sejt szubklónja.

IC_{50}: egy gátló vizsgálati vegyi anyag maximális tényleges hatásának felét kiváltó koncentráció.

ICCVAM: alternatív módszerek validálásával foglalkozó ügynökségközi koordinációs bizottság.

Laboratóriumok közötti reprodukálhatóság: annak a mutatója, hogy különböző minősített laboratóriumok milyen mértékben képesek ugyanazon protokoll alkalmazásával és ugyanazon anyagok vizsgálatával hasonló kvalitatív és kvantitatív eredményeket elérni. A laboratóriumok közötti reprodukálhatóság az elővalidálási és validálási folyamat során kerül meghatározásra, és annak mértékét jelzi, hogy az adott vizsgálat mennyire sikeresen vihető át laboratóriumok között; más néven laboratóriumok közötti megismételhetőség (1).

Laboratóriumon belüli reprodukálhatóság: annak meghatározása, hogy egy adott laboratóriumon belül dolgozó szakemberek milyen mértékben képesek egy meghatározott protokoll alapján különböző időpontokban sikeresen megismételni az eredményeket. Más néven „laboratóriumon belüli megismételhetőség” (1).

LEC: a legkisebb hatásos koncentráció a vizsgálati vegyi anyag azon legalacsonyabb koncentrációja, amely választ vált ki (vagyis a vizsgálati vegyi anyag legkisebb koncentrációja, amelynél az indukciós faktor statisztikailag eltér a párhuzamos vivőanyagos kontrolltól).

Me-too vizsgálat: olyan vizsgálatok köznapi elnevezése, amelyek strukturálisan és funkcionálisan hasonlóak egy validált és elfogadott, referenciaként szolgáló vizsgálati módszerhez. A hasonló vizsgálati módszer szinonimája.

MT: metallotionein.

MMTV: egér emlőtumor vírus.

OHT: 4-hidroxitamoxifén.

PBTG: teljesítményalapú vizsgálati iránymutatás.

PC (pozitív kontroll): erős hatást kifejtő anyag, lehetőség szerint 17β-ösztradiol, amelyet belefoglalnak minden vizsgálatba, hogy biztosítsák a vizsgálat megfelelő működését.

PC_{10}: a vizsgálati vegyi anyagnak az a koncentrációja, amelynél az agonista vizsgálat során mért aktivitás a pozitív kontroll (a stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálatnál 1nM E2) egyes lemezeken indukált maximális aktivitásának 10 %-a.

PC_{50}: a vizsgálati vegyi anyagnak az a koncentrációja, amelynél az agonista vizsgálat során mért aktivitás a pozitív kontroll (E2 a vizsgálati módszerben megadott referenciakoncentrációban) egyes lemezeken indukált maximális aktivitásának 50 %-a.

PC_{Max}: a vizsgálati vegyi anyag RPC_{Max} hatást kiváltó koncentrációja.

Teljesítményszabványok: validált vizsgálaton alapuló szabványok, amelyek a javasolt, végrehajtás és funkcionalitás szempontjából hasonló vizsgálat összehasonlíthatósági értékelésének alapjául szolgálnak. Ide tartoznak: (1) a vizsgálat alapvető összetevői; (2) a referencia-vegyianyagok minimális jegyzéke, amely a validált vizsgálati módszer elfogadható teljesítményének igazolására használt vegyi anyagokból került összeállításra; és (3) a validált vizsgálati módszer eredményei alapján meghatározott, hasonló megbízhatósági és pontossági szintek, amelyeket a javasolt vizsgálatnak teljesítenie kell a minimális jegyzék referencia-vegyianyagainak felhasználásával történő értékelése során (1).

Jártassági tesztanyagok: a teljesítményszabványokban megadott referenciaanyagokon belüli alcsoport, amelyet a laboratóriumok felhasználhatnak a szabványosított vizsgálati módszerben való szakmai jártasságuk igazolására. Ezeket az anyagokat általában az alapján választják ki, hogy összességükben lefedik a válaszreakciók lehetséges tartományát, kereskedelmi forgalomban kaphatók és rendelkezésre állnak rájuk vonatkozó minőségi referenciaadatok.

Jártasság: annak igazolása, hogy a laboratórium képes megfelelően lefolytatni egy adott vizsgálatot, mielőtt ismeretlen anyagokat tesztelne.

Referenciaösztrogén (pozitív kontroll, PC): 17β-ösztradiol (E2, CAS-száma: 50-28-2).

Referenciaszabvány: egy adott vizsgálat megfelelőségének bizonyítására használt referenciaanyag. A stabilan transzfektált transzaktivációs és a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat referenciaszabványa a 17β-ösztradiol.

Vizsgálati referenciamódszerek: A 455. teljesítményalapú vizsgálati iránymutatás alapját képező vizsgálatok.

Relevancia: valamely vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálat pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (1).

Megbízhatóság: a vizsgálat laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. A laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság kiszámításával állapítják meg.

RLU: relatív fényegység.

RNS: ribonukleinsav.

RPC_{Max}: valamely vizsgálati vegyi anyag által előidézett maximális szintű válasz, amelyet ugyanazon lemezen vizsgált 1 nM mennyiségű E2 által kiváltott válasz százalékában adnak meg.

RPMI: RPMI-1 640 tápoldat kiegészítve 0,9 % penicillinnel és sztreptomicinnel, valamint 8,0 % magzati borjú szérummal (FBS).

Vizsgálatmenet: egyszeri kísérlet, amelynek során értékelik a vizsgálat biológiai eredményére gyakorolt kémiai hatást. Minden vizsgálatmenet egy teljes kísérletnek felel meg, amelyet közös sejtkészletből származó, ugyanabban az időben replikátum lyukakba kiszélesztett sejteken végeznek el.

Független vizsgálatmenet: más sejtkészletből származó sejtekkel, frissen hígított vegyi anyagokkal, különböző napokon vagy ugyanazon a napon más szakemberek által végzett különálló, független kísérlet, amelynek során értékelik a vizsgálat biológiai eredményére gyakorolt kémiai hatást.

SD: standard deviáció.

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív anyag aránya, amelyet a vizsgálat helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálat pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálat relevanciájának megítélésében (1).

Specificitás: az összes olyan negatív/aktív anyag aránya, amelyet a vizsgálat helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálat pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálat relevanciájának megítélésében (1).

Stabil transzfekció: amikor a DNS-t olyan módon transzfektálják a tenyésztett sejtekbe, hogy az stabilan integrálódik a sejtek genomjába, lehetővé téve ezáltal a transzfektált gének stabil kifejeződését. A stabilan transzfektált sejtek klónjainak szelektálását stabil markerekkel végzik (pl. G418-rezisztencia alapján).

STTA-vizsgálat: stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálat, a HeLa 9 903 sejtvonalat alkalmazó ösztrogénreceptor alfa transzkripciós aktivációs vizsgálat.

Tanulmány: egyetlen, konkrét anyag meghatározott vizsgálattal való értékeléséhez végzett teljes körű kísérleti munka. A tanulmány magában foglal minden lépést, egyebek mellett a vizsgálati anyag vizsgálati közegben végzett hígítási tesztjeit, az előzetes dózistartomány-kereső vizsgálatmeneteket, az összes szükséges teljes körű vizsgálatmenetet, az adatok elemzését, a minőség-ellenőrzést és a toxicitás felmérését. A tanulmány lezárásakor lehetővé válik a vizsgálati vegyi anyag toxicitási célpontra kifejtett és az alkalmazott vizsgált által értékelt hatásának besorolása (pl. aktív, inaktív vagy nem meggyőző), valamint a pozitív referencia-vegyianyaghoz viszonyított potenciáljának megbecslése.

Anyag: a REACH-rendelet ([1]) értelmében az anyag természetes állapotban előforduló vagy gyártási folyamatból származó kémiai elem és vegyületei, amely az anyag stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagot és az alkalmazott folyamatból származó szennyező anyagot is tartalmazhat, de nem tartalmaz olyan oldószert, amely az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltoztatása nélkül elkülöníthető. Az ENSZ GHS (1) egy ehhez nagyon hasonló meghatározást alkalmaz.

TA (transzaktiváció): az mRNS szintézis elindítása egy specifikus kémiai jel, például az ösztrogén ösztrogénreceptorhoz való kötődésének hatására.

Vizsgálat: e vizsgálati módszer keretében a vizsgálat azon hitelesnek elfogadott módszertanok egyike, amelyek eleget tesznek a meghatározott teljesítési kritériumoknak. A vizsgálat összetevői közé tartozik például a specifikus sejtvonal a hozzá kapcsolódó tenyésztési körülményekkel, a vizsgálat elvégzéshez használt specifikus tápoldat, a lemez elrendezésének körülményei, a vizsgálati vegyi anyag elrendezése és hígítása, továbbá bármely más szükséges minőség-ellenőrzési intézkedés és a kapcsolódó adatkiértékelési lépések.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Transzkripció: mRNS szintézis.

UVCB: ismeretlen vagy változó összetételű vegyi anyagok, komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok.

Validált vizsgálati módszer: olyan vizsgálat, amelynek az adott céllal kapcsolatos relevanciája (pontosságát is ideértve) és megbízhatósága validálási vizsgálatok alapján megállapítást nyert. Fontos megjegyezni, hogy a validált vizsgálati módszer a javasolt felhasználási célra nem feltétlenül kínál megfelelő pontosságú és megbízhatóságú elfogadható eljárást (1).

Validálás: az az eljárás, amelynek révén megállapítják egy bizonyos megközelítés, módszer, vizsgálat, eljárás vagy értékelés adott célra való megbízhatóságát és relevanciáját (1).

VC (Vivőanyagos kontroll): a vizsgálati és a kontrollként szolgáló vegyi anyagok feloldására használt oldószert önmagában, az oldott vegyi anyag nélkül, vivőanyagként vizsgálják.

VM7: immortalizált adenokarcinoma sejtvonal, amely endogénen fejezi ki az ösztrogénreceptort.

VM7Luc4E2: a VM7Luc4E2 sejtvonal VM7 immortalizált humán adenokarcinoma sejtekből származik, amelyek endogén módon kifejezik az ösztrogénreceptor mindkét formáját (ERα és ERβ), és ezt a sejtvonalat stabilan transzfektálták a pGudLuc7 plazmiddal. Ez a plazmid az egér emlőtumor vírus (MMTV) promóter előtt négy szintetikus oligonukleotid kópián hordozza az ösztrogén válaszelemet, és a szentjánosbogár luciferáz gén expresszióját szabályozza.

Gyenge pozitív kontroll: a referencia-vegyianyagok jegyzékéből kiválasztott gyenge hatást kifejtő anyag, amelyet belefoglalnak minden vizsgálatba, hogy biztosítsák a vizsgálat megfelelő működését.

([1]) Az Európai Parlament és a Tanács 1907/2006/EK rendelete (2006. december 18.) a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH), az Európai Vegyianyag-ügynökség létrehozásáról, az 1999/45/EK irányelv módosításáról, valamint a 793/93/EGK tanácsi rendelet, az 1488/94/EK bizottsági rendelet, a 76/769/EGK tanácsi irányelv, a 91/155/EGK, a 93/67/EGK, a 93/105/EK és a 2000/21/EK bizottsági irányelv hatályon kívül helyezéséről (HL L 304., 2007.11.22., 1. o.).

2. függelék

STABILAN TRANSZFEKTÁLT HUMÁN ÖSZTROGÉNRECEPTOR A TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT VEGYI ANYAGOK ÖSZTROGÉNHATÁSÚ AGONISTA ÉS ANTAGONISTA AKTIVITÁSÁNAK ÉSZLELÉSÉRE HERA-HELA-9903 SEJTVONALBAN

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

1. Ez a transzaktivációs (TA) vizsgálat hERα-HeLa-9903 sejtvonalat használ a humán ösztrogénreceptor alfa (hERα) által közvetített ösztrogénhatású agonista aktivitás észlelésére. A stabilan transzfektált transzaktivációs (STTA) vizsgálat validálási tanulmányát a japán Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI) végezte el, hERα-HeLa-9903 sejtvonalat használva a humán ösztrogénreceptor alfa (hERα) által közvetített ösztrogénhatású agonista és antagonista aktivitás észlelésére, amely tanulmány bizonyította, hogy a vizsgálat tervezett felhasználása tekintetében releváns és megbízható (1).

2. A vizsgálat kifejezetten azt a célt szolgálja, hogy a kémiai lumineszcencia mint végpont mérése révén észlelje a hERα által közvetített transzaktivációt. Azonban beszámoltak arról, hogy az 1 μM-nél magasabb fitoösztrogén-koncentrációnál a luciferáz riportergén túlzott aktiválása miatt nem receptorok által közvetített lumineszcencia jelek észlelhetők (2) (3). Bár a dózis-válasz görbe arra utal, hogy az ER-rendszer ténylegesen alacsonyabb koncentrációknál aktiválódik, a magas fitoösztrogén-koncentráció mellett vagy feltehetőleg a luciferáz riportergént a fitoösztrogénhez hasonlóan túlzottan aktiváló vegyületek magas koncentrációja mellett kapott luciferáz-kifejeződést körültekintően meg kell vizsgálni stabilan transzfektált ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálati rendszerekben (1. függelék).

3. E vizsgálat szabályozási célra való alkalmazása előtt el kell olvasni az „ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS” és „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” részt. Az ebben a vizsgálati iránymutatásban használt fogalmak és rövidítések meghatározását a 2.1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

4. A vizsgálat az ösztrogénreceptor ligandumhoz kötődésének jelzésére szolgál. A ligandum kötődését követően a receptor-ligandum komplex transzlokálódik a sejtmagba, ahol specifikus DNS válaszelemekhez kötődve transzaktivál egy szentjánosbogár luciferáz riportergént, ami megnöveli a luciferáz enzim celluláris kifejeződését. A luciferin egy szubsztrát, amit a luciferáz enzim átalakít és közben bioluminescens fény keletkezik, amely luminométerrel számszerűen mérhető. A luciferáz-aktivitás számos kereskedelmi forgalomban kapható vizsgálati készlettel gyorsan és költséghatékonyan értékelhető.

5. A vizsgálati rendszer humán méhnyakdaganatból származó hERα-HeLa-9903 sejtvonalat használ, két stabilan inzertált konstrukcióval: i. a hERα expressziós konstrukcióval (amely a teljes humán ösztrogénreceptort kódolja), és ii. egy szentjánosbogár luciferáz riporterkonstrukcióval, amely egy vitellogenin ösztrogén válaszelem ötször ismétlődő szakaszát tartalmazza hozzákapcsolva egy egér metallotionein promóter TATA-boxához. Az egér metallotionein promóter TATA-box génkonstrukció biztosítja a legjobb teljesítményt, ezért használata általánosan elterjedt. Következésképpen a hERα-HeLa-9903 sejtvonal képes mérni egy adott vizsgálati vegyi anyag azon képességét, hogy beindítja a humán ösztrogénreceptor alfa által irányított luciferáz gén kifejeződést.

6. ösztrogénreceptor agonista vizsgálat esetén az adatok értelmezése azon alapul, hogy a vizsgálati vegyi anyag által előidézett maximális szintű válasz megegyezik-e vagy meghaladja-e a pozitív kontrollanyagként használt 17β-ösztradiol (E2) indukáláshoz alkalmazott maximális (1 nM) koncentrációja által keltett agonista válasz 10 %-át (vagyis a PC_{10} értékét). ösztrogénreceptor antagonista vizsgálat esetén az adatok értelmezése azon alapul, hogy a válasz előidézi-e a kiegészítő kontroll (25 pM E2) által kiváltott válaszhoz képest az aktivitás legalább 30 %-os csökkenését, citotoxicitás nélkül. Az adatok elemzésének és értelmezésének részleteivel a 34–48. pont foglalkozik.

ELJÁRÁS

Sejtvonalak

7. A vizsgálathoz stabilan transzfektált hERα-HeLa-9903 sejtvonalat kell használni. A sejtvonal egy anyagátadási megállapodás aláírását követően beszerezhető a japán Collection of Research Bioresources (JCRB) sejtbankból ([1]).

8. A vizsgálat során kizárólag mikoplazmamentesnek nyilvánított sejtek használhatók. A mikoplazma-fertőzés érzékeny detektálására az RT-PCR (valós idejű polimeráz láncreakció) módszer alkalmazandó (4) (5) (6).

A sejtvonal stabilitása

9. A sejtvonal stabilitásának nyomon követéséhez az agonista vizsgálat során referenciaszabványként E2-t, 17α-ösztradiolt, 17α-metiltesztoszteront és kortikoszteront kell használni, emellett a vizsgálat minden elvégzése során legalább egy alkalommal fel kell venni egy teljes koncentráció-válasz görbét az 1. táblázatban szereplő koncentrációtartományban, és az eredményeknek meg kell felelniük az 1. táblázatban feltüntetett eredményeknek.

10. Antagonista vizsgálat során minden vizsgálatmenetben párhuzamosan meg kell határozni két referenciaszabvány, a tamoxifén és a flutamid teljes koncentrációgörbéjét. Ellenőrizni kell továbbá, hogy e két vegyi anyagot a kvalitatív osztályozás során helyesen sorolták-e pozitív, illetve negatív kategóriába.

Sejttenyésztés és a leültetés körülményei

11. A sejteket fenolvörösmentes, 60 mg/l kanamicin antibiotikummal és 10 %-os dextránbevonatú aktív szénnel kezelt magzati borjú szérummal (DCC-FBS) kiegészített Eagle-féle minimum esszenciális tápoldatban (Eagle's Minimum Essential Medium, EMEM), CO_2 inkubátorban (5 % CO_2), 37 ±1 °C-on kell fenntartani. 75–90 %-os konfluencia elérését követően a sejteket tovább kell oltani egy 100 mm-es sejttenyésztő edénybe, 10 ml térfogatban $0{,}4 \times 10^5$ –1 $\times 10^5$ sejt/ml sűrűségben. 10 %-os FBS-EMEM (vagyis DCC-FBS-sel kiegészített EMEM) sejtszuszpenziót kell készíteni, majd a sejteket egy mikrotiterlemez lyukaiba 1×10^4 sejt/(100 µl × lyuk) sűrűségben ki kell széleszteni. A vegyi anyaggal való kezelést megelőzően a sejteket 5 %-os CO_2-tartalmú inkubátorba n 37° ±1° C-on 3 órán át preinkubálni kell. A műanyag edénynek nem lehet ösztrogénhatású aktivitása.

12. A válasz integritása érdekében a fagyasztott sejtkultúra sejtjein legalább két, de legfeljebb 40 passzálást kell végrehajtani a kondicionált tápoldatban. A hERα-HeLa-9903 sejtvonal esetében ez három hónapnál kevesebb időt vesz igénybe. A nem megfelelő tenyésztési körülmények között növő sejtek hatékonysága csökkenhet.

13. A DCC-FBS elkészíthető a 2.2. függelékben leírtak szerint, de kereskedelmi forrásból is beszerezhető.

Elfogadhatósági kritériumok

Az ösztrogénreceptor agonista vizsgálathoz használandó pozitív és a negatív referenciaszabványok

14. A tanulmány előtt és alatt a vizsgálati rendszer reakcióképességét ellenőrizni kell egy erős ösztrogén (E2), egy gyenge ösztrogén (17α-ösztradiol) és egy nagyon gyenge agonista (17α-metiltesztoszteron) megfelelő koncentrációkban való alkalmazásával, valamint egy negatív anyaggal (kortikoszteron). A validálási tanulmányból (1) származó elfogadható értéktartományokat a 1. táblázat ismerteti. E 4 párhuzamosan vizsgálandó referenciaszabványt bele kell foglalni minden kísérletbe, vizsgálatuk eredményének pedig az elfogadható határértékeken belül kell lennie. Ellenkező esetben meg kell határozni, hogy mi okból nem teljesültek az elfogadhatósági kritériumok (pl. a sejtek kezelése, a szérum és az antibiotikum minősége és koncentrációja), a vizsgálatot pedig meg kell ismételni. Az elfogadhatósági kritériumok

([1]) JCRB sejtbank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japán Fax: +81-72-641-9812.

teljesülése esetén az EC_{50}, a PC_{50} és a PC_{10} értékek minimális szórása érdekében törekedni kell a sejttenyésztésben részt vevő anyagok következetes használatára. A négy párhuzamosan vizsgált referenciaszabvány – amelyeket minden kísérletben vizsgálni kell (azonos körülmények között, ideértve az anyagokat, a sejtek passzálási számát és a technikusokat is) – biztosíthatja a vizsgálat érzékenységét, mivel a három pozitív referenciaszabvány PC_{10} értékének az elfogadhatósági tartományba kell esnie, csakúgy mint PC_{50} és EC_{50} értékeknek, ha meghatározható (lásd az 1. táblázatot).

1. táblázat

Az ösztrogénreceptor agonista vizsgálathoz használandó négy referenciaszabvány elfogadhatósági tartománya

Elnevezés	$logPC_{50}$	$logPC_{10}$	$logEC_{50}$	Hill-meredekség	Vizsgálati tartomány
17β-ösztradiol (E2) CAS-szám: 50-28-2	-11,4~-10,1	< -11	-11,3~-10,1	0,7~1,5	10^{-14}~10^{-8}M
17α-ösztradiol CAS-szám: 57-91-0	-9,6~-8,1	-10,7~-9,3	-9,6~-8,4	0,9~2,0	10^{-12}~10^{-6}M
Kortikoszteron CAS-szám: 50-22-6	—	—	—	—	10^{-10}~10^{-4}M
17α-metiltesztoszteron CAS-szám: 58-18-4	-6,0~-5,1	-8,0~-6,2	—	—	10^{-11}~10^{-5}M

Az ösztrogénreceptor antagonista vizsgálathoz használandó pozitív és negatív referenciaszabványok

15. A tanulmány előtt és alatt a vizsgálati rendszer reakcióképességét egy pozitív anyag (tamoxifén) és egy negatív anyag (flutamid) megfelelő koncentrációkban való alkalmazásával ellenőrizni kell. A validálási tanulmányból (1) származó elfogadható értéktartományokat a 2. táblázat ismerteti. E két párhuzamosan vizsgálandó referenciaszabványt bele kell foglalni minden kísérletbe, vizsgálatuk eredményét pedig a kritériumoknak megfelelően kell értékelni. Ha az eredmény nem elfogadható, meg kell határozni, hogy mi okból nem teljesültek a kritériumok (pl. a sejtek kezelése, a szérum és az antibiotikum minősége és koncentrációja), a vizsgálatot pedig meg kell ismételni. Emellett meg kell határozni a pozitív anyag (tamoxifén) IC_{50} értékét, és az eredménynek az elfogadható határértékeken belül kell lennie. Az elfogadhatósági kritériumok teljesülése esetén az IC_{50} értékének minimális szórása érdekében mindenképpen biztosítani kell a sejttenyésztésben részt vevő anyagok következetes használatát. A két párhuzamosan vizsgált referenciaszabvány – amelyeket minden kísérletben vizsgálni kell (azonos körülmények között, ideértve az anyagokat, a sejtek passzálási számát és a technikusokat) – képes biztosítani a vizsgálat érzékenységét (lásd a 2. táblázatot).

2. táblázat

Az ösztrogénreceptor antagonista vizsgálathoz használandó két referenciaszabvány kritériuma és elfogadhatósági tartománya

Elnevezés	Kritériumok	$LogIC_{50}$	Vizsgálati tartomány
Tamoxifén CAS-szám: 10540-29-1	Pozitív: meg kell határozni az IC_{50} értéket	-5,942 -7,596	10^{-10} 10^{-5} M
FlutamidCAS-szám: 13311-84-7	Negatív: nem kell meghatározni az IC_{30} értéket	—	10^{-10} 10^{-5} M

Pozitív és vivőanyagos kontrollok

16. A pozitív kontrollt az ösztrogénreceptor agonista vizsgálat esetén (1 nM mennyiségű E2) és az ösztrogénreceptor antagonista vizsgálat esetén (10 μM mennyiségű TAM) lemezenként legalább három ismétlésben kell végrehajtani. A vizsgálati vegyi anyag feloldására használt vivőanyagot vivőanyagos kontroll keretében lemezenként legalább három ismétlésben kell vizsgálni. Amennyiben a pozitív kontroll során a vizsgálati vegyi anyagétól eltérő vivőanyagot alkalmaznak, e vivőanyagos kontroll mellett egy másik vivőanyagos kontrollt kell végezni legalább három ismétlésben, a pozitív kontrollal azonos lemezen.

Az ösztrogénreceptor agonista vizsgálat minőségi kritériumai

17. A pozitív kontroll (1 nM E2) során tapasztalt átlagos luciferáz-aktivitás minden lemezen legalább a vivőanyagos kontroll átlagértékének négyszerese legyen. E kritérium meghatározása a validálási tanulmány végpontértékeinek megbízhatóságán alapul (a dokumentált értékek négyszeres és harmincszoros között helyezkednek el).

18. A vizsgálat minőség-ellenőrzése szempontjából a párhuzamos pozitív kontroll (1 nM E2) PC_{10} értékének megfelelő indukciós faktor nagyobbnak kell lennie, mint a párhuzamos vivőanyagos kontroll indukciós faktora (=1) plusz a standard deviáció kétszerese (1+2SD). Rangsorolási célból a PC_{10} érték a statisztikai elemzéshez képest leegyszerűsítheti a szükséges adatelemzést. Bár a statisztikai elemzés információt nyújt a szignifikanciáról, nem szolgáltat a koncentráció alapján megállapított potenciálhoz hasonló kvantitatív paramétert, ezért rangsorolás céljára kevésbé alkalmas.

Az ösztrogénreceptor antagonista vizsgálat minőségi kritériumai

19. A kiegészítő kontroll (25 pM mennyiségű E2) luciferáz-aktivitásának átlaga lemezenként legalább négyszerese legyen a vivőanyagos kontroll átlagértékének. E kritérium meghatározása a validálási tanulmány végpontértékeinek megbízhatóságán alapul.

20. A vizsgálat minőség-ellenőrzése szempontjából az 1 nM mennyiségű E2 relatív transzkripciós aktiválásának (RTA) meg kell haladnia a 100 %-ot, az 1 μM mennyiségű 4-hidroxitamoxifén (OHT) relatív transzkripciós aktiválás értékének kisebbnek kell lennie 40,6 %-nál, a 100 μM digitonin (Dig) relatív transzkripciós aktiválás értéke pedig nem haladhatja meg a 0 %-ot.

A laboratórium jártasságának igazolása (lásd a vizsgálati módszer „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” részének 14. pontját, valamint 3. és 4. táblázatát).

Vivőanyag

21. Párhuzamos vivőanyagos kontrollként dimetil-szulfoxidot (DMSO) vagy más megfelelő oldószert kell használni, azonos koncentrációban a különböző pozitív és negatív kontrollok és a vizsgálati vegyi anyag tesztelése során. A vizsgálati vegyi anyagokat olyan oldószerben kell feloldani, amelyik szolubilizálja az adott vizsgálati vegyi anyagot és elegyedik a sejtek tápoldatával. A megfelelő vivőanyagok közé tartozik a víz, az etanol (95–100 %-os tisztaságban) és a dimetil-szulfoxid. Dimetil-szulfoxid használata esetén az anyag mennyisége nem haladhatja meg a 0,1 térfogatszázalékot. Minden vivőanyag esetében igazolni kell, hogy maximális alkalmazott térfogatuk nem fejt ki citotoxikus hatást és nem befolyásolja a vizsgálat teljesítményét.

Vizsgálati vegyi anyagok előkészítése

22. Általában a vizsgálati vegyi anyagokat dimetil-szulfoxidban vagy más alkalmas oldószerben fel kell oldani, és ugyanazzal az oldószerrel sorozatban 1:10 arányban hígítani kell, elkészítve az oldatokat a tápoldattal való hígításhoz.

Oldhatóság és citotoxicitás: a dózisbehatárolás szempontjai

23. Elővizsgálatot kell végezni a vizsgálandó vegyi anyag megfelelő koncentrációtartományának meghatározására, illetve annak megállapítására, hogy a vizsgálati vegyi anyaggal kapcsolatban felmerül-e oldhatósági és citotoxicitási probléma. A vegyi anyagokat először a legmagasabb, vagyis 1 μl/ml, 1 mg/ml vagy 1 mM koncentrációig vizsgálják, melyek közül a legalacsonyabb a mérvadó. Az elővizsgálat során megfigyelt citotoxicitási szint vagy oldhatatlanság alapján az első végleges vizsgálatmenetben a legmagasabb elfogadható koncentrációtól (pl. 1 mM, 100 μM, 10 μM stb.) induló logaritmikus hígítási oldatsorozatban kell vizsgálni a vegyi anyagot, és fel kell jegyezni az esetlegesen tapasztalt zavarosságot, kicsapódást vagy citotoxicitást. A második, illetve ha szükséges a harmadik vizsgálatmenet koncentrációértékeit megfelelően ki kell igazítani, hogy jó koncentráció-válasz görbe alakuljon ki, és ki lehessen zárni azokat a koncentrációkat, amelyek oldhatatlannak bizonyultak vagy túlzott citotoxicitást idéztek elő.

24. Az ER-agonisták és ER-antagonisták esetében a magas szintű citotoxicitás szignifikánsan módosíthatja vagy megakadályozhatja a tipikusan szigmoid választ, ezért figyelembe kell venni az adatok értelmezésénél. Olyan citotoxicitási vizsgálati módszereket kell alkalmazni, amelyek információt nyújtanak a 80 %-os sejtéletképességről, a megfelelő vizsgálatot a laboratórium tapasztalata alapján kell kiválasztani.

25. Amennyiben a citotoxicitási vizsgálat eredményei azt jelzik, hogy a vizsgálati vegyi anyag koncentrációja legalább 20 %-kal csökkenti a sejtszámot, ezt a koncentrációt citotoxikusnak kell tekinteni, és a citotoxikus vagy afeletti koncentrációkat ki kell zárni az értékelésből.

Vegyi anyaggal történő kezelés és a vizsgálati lemez elrendezése

26. A vegyi anyag hígításának elkészítése (1. és 2. lépés) és a sejtek kezelése (3. lépés) az alábbiak szerint is elvégezhető:

1. lépés: Az egyes vizsgálati vegyi anyagokkal DMSO-dal vagy megfelelő oldószerrel hígítási sorozatot kell készíteni, és a három ismétléses elrendezésben kell elhelyezni a mikrotiterlemez lyukaiban az előkísérletben megállapított dózistartománynak megfelelő végső koncentrációsorozat szerint (egy tipikus oldatsorozat például az 1 mM, 100 μM, 10 μM, 1μM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM és 10 pM (10^{-3}–10^{-11} M)).

2. lépés: Vegyi anyag hígítása: az oldószerben először 1,5 μl mennyiségű vizsgálati vegyi anyagot oldjunk fel a tápoldat 500 μl-jében.

3. lépés: A sejtek kezelése a vegyi anyaggal: a (2. lépésben elkészített) tápoldattal hígított 50 μl mennyiségű anyagot adjuk hozzá a lyukanként és 100 μl-enként 10^4 sejtet tartalmazó vizsgálati lyukakhoz.

Az egyes lyukakba helyezendő tápoldat végleges ajánlott térfogata 150 μl. A vizsgálati minták és a referenciaszabványok elosztása történhet a 3. és 4. táblázatban foglaltak szerint.

3. táblázat

Példa az ösztrogénreceptor agonista vizsgálathoz használt vizsgálati lemezen tesztelt referenciaszabványok koncentrációértékeire

Sor	17α-metiltesztoszteron			Kortikoszteron			17α-ösztradiol			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1. konc. (10 μM)	→	→	100 μM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	2. konc. (1 μM)	→	→	10 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	3. konc. (100 nM)	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	4. konc. (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	5. konc. (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	6. konc. (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	7. konc. (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Vivőanyagos kontroll (0,1 % DMSO); PC: Pozitív kontroll (1 nM E2).

27. A referenciaszabványokat (E2, 17α-ösztradiol, 17α-metiltesztoszteron és kortikoszteron) minden vizsgálatmenetben tesztelni kell (3. táblázat)vvMinden vizsgálati lemezen legyenek pozitív kontrollként szolgáló, a maximális indukciót előidéző 1 nM mennyiségű E2-vel kezelt lyukak, és kizárólag DMSO-dal (vagy megfelelő oldószerrel) kezelt, vivőanyagos kontrollként szolgáló lyukak (4. táblázat). Amennyiben egy adott kísérlet során különböző forrásból származó (pl. eltérő passzálásból, más tételből származó stb.) sejteket alkalmaznak, a referenciaszabványokat minden egyes sejtforráshoz külön vizsgálni kell.

4. táblázat

Példa az ösztrogénreceptor agonista vizsgálathoz használt vizsgálati lemez elrendezésére a vizsgálati és kontrollanyagok különböző koncentrációjánál

Sor	1. vizsgálati vegyi anyag			2. vizsgálati vegyi anyag			3. vizsgálati vegyi anyag			4. vizsgálati vegyi anyag		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1. konc. (10 μM)	→	→	1 mM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	2. konc. (1 μM)	→	→	100 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	3. konc. (100 nM)	→	→	10 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	4. konc. (10 nM)	→	→	1 μM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	5. konc. (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	6. konc. (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	7. konc. (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Vivőanyagos kontroll (0,1 % DMSO); PC: Pozitív kontroll (1 nM E2).

5. táblázat

Példa az ösztrogénreceptor antagonista vizsgálathoz használt vizsgálati lemez elrendezésére a referenciaszabványok különböző koncentrációjánál

Sor	**Tamoxifén**			**Flutamid**			**1. vizsgálati vegyi anyag**			**2. vizsgálati vegyi anyag**		
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	**1. konc. (10 μM)**	→	→	**10 μM**	→	→	**10 μM**	→	→	**10 μM**	→	→
B	**2. konc. (1 μM)**	→	→	**1 μM**	→	→	**1 μM**	→	→	**1 μM**	→	→
C	**3. konc. (100 nM)**	→	→	**100 nM**	→	→	**100 nM**	→	→	**100 nM**	→	→
D	**4. konc. (10 nM)**	→	→	**10 nM**	→	→	**10 nM**	→	→	**10 nM**	→	→
E	**5. konc. (1 nM)**	→	→	**1 nM**	→	→	**1 nM**	→	→	**1 nM**	→	→
F	**6. konc. (100 pM)**	→	→	**100 pM**	→	→	**100 pM**	→	→	**100 pM**	→	→
G	**0,1 % DMSO**	→	→	→	→	→	**1 μM OHT**	→	→	**100 μM Dig**	→	→
H	**VC**	→	→	→	→	→	**PC**	→	→	→	→	→

VC: Vivőanyagos kontroll (0,1 % DMSO), PC: Pozitív kontroll (1 nM E2), OHT: 4-hidroxitamoxifén, Dig: Digitonin.

= 25 pM E2-vel kiegészítve

28. A vegyi anyagok antagonista aktivitásának értékeléséhez az A–G sor vizsgálati lyukaihoz hozzá kell adni 25 pM E2-t. A referenciaszabványokat (tamoxifén és flutamid) minden vizsgálatmenetben tesztelni kell. Minden vizsgálati lemezen legyenek pozitív kontrollként szolgáló, a hERα-HeLa-9903 sejtvonal minőség-ellenőrzésére használható 1 nM E2-vel kezelt lyukak, DMSO-dal (vagy megfelelő oldószerrel) kezelt, vivőanyagos kontrollként szolgáló lyukak, 0,1 % DMSO-dal kezelt, „kiegészítő kontrollként" szolgáló lyukak, amelyek DMSO mellett E2-t is tartalmaznak, 1 μM végső koncentrációjú 4-hidroxitamoxifennel kezelt lyukak, valamint 100 μM digitonionnal kezelt lyukak (5. táblázat). A további vizsgálati lemezeken a referenciaszabványokat tartalmazó lyukak kivételével ugyanezt az elrendezést kell alkalmazni (6. táblázat). Amennyiben egy adott kísérlet során különböző forrásból származó (pl. eltérő passzálásból, más tételből származó stb.) sejteket alkalmaznak, a referenciaszabványokat minden egyes sejtforráshoz külön vizsgálni kell.

6. táblázat

Példa az ösztrogénreceptor antagonista vizsgálathoz használt vizsgálati lemez elrendezésére a vizsgálati és kontrollanyagok különböző koncentrációjánál

Sor	1. vizsgálati vegyi anyag			2. vizsgálati vegyi anyag			3. vizsgálati vegyi anyag			4. vizsgálati vegyi anyag		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1. konc. (10 μM)	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→
B	2. konc. (1 μM)	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→
C	3. konc. (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	4. konc. (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	5. konc. (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	6. konc. (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 μM OHT	→	→	100 μM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Vivőanyagos kontroll (0,1 % DMSO), PC: Pozitív kontroll (1 nM E2), OHT: 4-hidroxitamoxifén, Dig: Digitonin.

: 25 pM E2-vel kiegészítve.

29. Adott esetben meg kell bizonyosodni arról, hogy nem érvényesül perem-hatás, ha gyaníthatóan fennáll peremhatás, annak kiküszöbölése érdekében módosítani kell a lemez elrendezését. Például olyan elrendezés alkalmazható, amelyen a széleken lévő lyukak üresen maradnak.

30. A vegyi anyagok hozzáadását követően a vizsgálati lemezeket 5 %-os CO_2-tartalmú inkubátorba n 37° ±1° C-on 20–24 órán át inkubálni kell, hogy a riportergén termékei kifejeződjenek.

31. Rendkívül illékony vegyületek esetén egyedi szempontokat is figyelembe kell venni. Ilyenkor ugyanis a kontrollanyagot tartalmazó közeli lyukak álpozitív eredményt hozhatnak, amit a várt és az ismert kontrollértékek fényében kell értékelni. Abban a néhány esetben, amikor az illékonyság gondot okozhat, „zárófólia" használatával hatékonyan izolálhatók az egyes lyukak a vizsgálat során, ezért ilyen esetekben zárófólia alkalmazása ajánlott.

32. A vizsgálatok függetlenségének biztosítása érdekében az azonos vegyi anyaggal végzett végleges vizsgálatokat különböző napokon kell megismételni.

Luciferáz vizsgálat

33. A vizsgálathoz kereskedelmi forgalomban beszerezhető luciferáz vizsgálati reagens [pl. Steady-Glo® luciferáz vizsgálati rendszer (Promega, E2510 vagy ezekkel egyenértékű rendszer)] vagy standard luciferáz vizsgálati rendszer (pl. Promega, E1500 vagy ezekkel egyenértékű rendszer) is használható, amennyiben teljesülnek az elfogadhatósági kritériumok. A vizsgálati reagenseket a használt luminométer érzékenysége alapján kell kiválasztani. Standard luciferáz vizsgálati rendszer alkalmazása esetén a szubsztrátum hozzáadása előtt sejtkultúrát lizáló reagenst (pl. Promega, E1531 vagy ezekkel egyenértékű reagenst) kell használni. A luciferáz reagenst a gyártó utasításai szerint kell alkalmazni.

AZ ADATOK ELEMZÉSE

Ösztrogénreceptor agonista vizsgálat

34. Az ösztrogénreceptor agonista vizsgálat esetében a pozitív kontrollhoz (1 nM E2) viszonyított, relatív transzkripciós aktivitás meghatározásához egy adott lemez lumineszcencia jelei az alábbi lépések végrehajtásával elemezhetők (ezzel egyenértékű más matematikai eljárások is elfogadhatók):

1. lépés Számítsuk ki a VC átlagértékét.

2. lépés Az adatok normalizálásához a VC átlagértékét vonjuk ki az egyes lyukaknál kapott értékből.

3. lépés Számítsuk ki a normalizált PC átlagértékét.

4. lépés Osszuk el a lemez egyes lyukainak normalizált értékét a PC normalizált átlagértékével (PC=100 %).

Az egyes lyukak végső értéke adja meg az adott lyuk PC-válaszhoz viszonyított, relatív transzkripciós aktivitását.

5. lépés Számítsuk ki a vizsgálati vegyi anyag egyes koncentrációcsoportjaira jellemző relatív transzkripciós aktivitás átlagértékét. A válasznak két vetülete van: az átlagos transzkripciós aktivitás (válasz) és az adott koncentráció, amelynél bekövetkezik a válasz (lásd a következő részt).

Az EC_{50}, PC_{50} és PC_{10} indukció szempontjai

35. Az EC_{50} meghatározásához teljes koncentráció-válasz görbére van szükség, ennek létrehozása azonban a vizsgált koncentrációtartomány korlátaiból fakadóan (például citotoxicitás vagy oldhatósági problémák miatt) nem mindig megvalósítható vagy nem mindig praktikus. Mivel azonban az EC_{50} és az indukció maximális szintje (ami a Hill-egyenlet felső értékének felel meg) lényeges információt hordozó paraméterek, lehetőség szerint bele kell foglalni őket a jelentésbe. Az EC_{50} és az indukció maximális szintjének meghatározásához megfelelő statisztikai szoftvert kell használni (ilyen például a Graphpad Prism statisztikai szoftver). Amennyiben a koncentráció-válasz adatokra alkalmazható a Hill-féle logisztikai egyenlet, az EC_{50} értékét az alábbi egyenlettel kell kiszámítani (7):

Y=görbe alja + (görbe teteje-alja) / (1+10 exp. ((log EC_{50} –X) × Hill-meredekség)), ahol:

az × a koncentráció logaritmusa; valamint

az Y a válasz, az Y a szigmoid görbe aljánál kezdődik és a tetejéig halad. A Hill-féle logisztikai egyenletben a görbe aljához rögzítik a nullpontot.

36. Az egyes vizsgálati vegyi anyagok tekintetében az alábbi adatokat kell biztosítani:

az RPC_{Max} értéket, amely valamely vizsgálati vegyi anyag által előidézett maximális szintű válasz, amelyet ugyanazon lemezen vizsgált 1 nM mennyiségű E2 által kiváltott válasz százalékában adnak meg, továbbá a PC_{Max} értéket (az RPC_{Max} választ kiváltó koncentráció); valamint

pozitív vegyi anyagok esetében azokat a koncentrációkat, amelyeknél PC_{10}, illetve adott esetben PC_{50} hatás figyelhető meg.

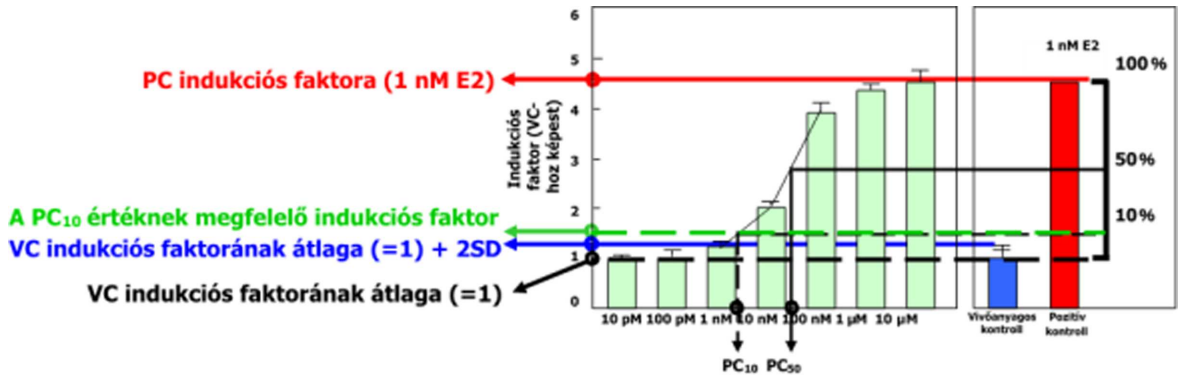
37. A PC_x értéket interpolációval lehet számítani az X-Y koordinátatengely 2 pontja között, az egyik pontnak közvetlenül a PC_x érték felett, a másiknak közvetlenül alatta kell elhelyezkednie. Amennyiben a közvetlenül a PC_x érték felett elhelyezkedő adatpont koordinátája (a,b), az alatta elhelyezkedő adatponté pedig (c,d), akkor a PC_x érték az alábbi egyenlet alapján határozható meg:

$$\log[PC_x] = \log[c]+(x-d)/(d-b)$$

38. A PC-értékek leírását az alábbi 1. ábra ismerteti.

1. ábra

Példa a PC-értékek meghatározására. A PC (1 nM mennyiségű E2) minden vizsgálati lemezen megtalálható



Ösztrogénreceptor antagonista vizsgálat

39. Az ösztrogénreceptor antagonista vizsgálat esetében a kiegészítő kontrollhoz (25 pM E2) viszonyított, relatív transzkripciós aktivitás meghatározásához egy adott lemez lumineszcencia jelei az alábbi lépések végrehajtásával elemezhetők (ezzel egyenértékű más matematikai eljárások is elfogadhatók):

1. lépés: Számítsuk ki a VC átlagértékét.

2. lépés: Az adatok normalizálásához a VC átlagértékét vonjuk ki az egyes lyukaknál kapott értékből.

3. lépés: Számítsuk ki a normalizált kiegészítő kontroll átlagértékét.

4. lépés: Osszuk el a lemez egyes lyukainak normalizált értékét a normalizált kiegészítő kontroll átlagértékével (kiegészítő kontroll=100 %).

Az egyes lyukak végső értéke adja meg az adott lyuknak a kiegészítő kontroll válaszához viszonyított, relatív transzkripciós aktivitását.

5. lépés: Számítsuk ki az egyes kezelések során megfigyelt relatív transzkripciós aktivitás átlagértékét.

Az IC_{30} és IC_{50} indukció szempontjai

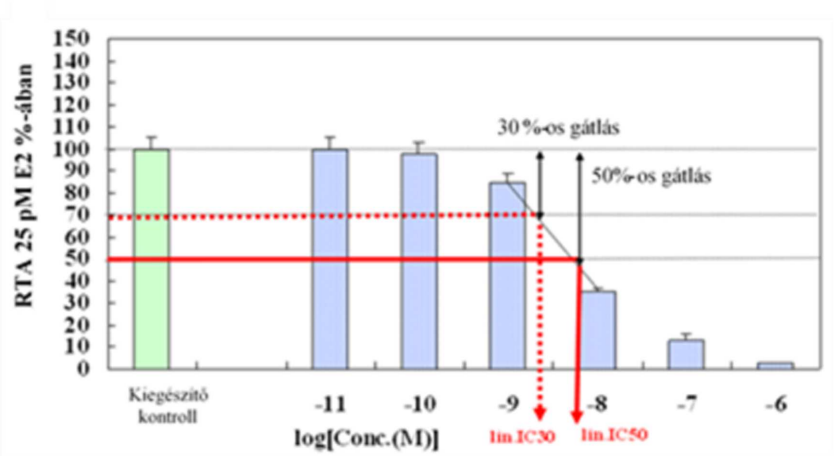
40. A pozitív vegyi anyagok esetében meg kell adni azokat a koncentrációkat, amelyeknél IC_{30}, illetve adott esetben IC_{50} hatás figyelhető meg.

41. Az IC_x értéket interpolációval lehet kiszámítani az X-Y koordinátatengely 2 pontja között, az egyik pontnak közvetlenül az IC_x érték felett, a másiknak közvetlenül alatta kell elhelyezkednie. Amennyiben a közvetlenül az IC_x érték felett elhelyezkedő adatpont koordinátája (c,d), az alatta elhelyezkedő adatponté pedig (a,b), akkor az IC_x érték az alábbi egyenlet alapján határozható meg:

lin ICx = a-(b-(100-x)) (a-c)/(b-d)

2. ábra

Példa az IC-értékek meghatározására A kiegészítő kontroll (25 pM E2) minden vizsgálati lemezen megtalálható



RTA: relatív transzkripciós aktivitás

42. Az eredményeknek két (vagy három) független vizsgálatmeneten kell alapulniuk. Amennyiben két vizsgálatmenet összevethető, vagyis reprodukálható eredményeket ad, akkor harmadik vizsgálatmenetre nincs szükség. Az eredmények akkor elfogadhatók, ha:

— teljesülnek az elfogadhatósági kritériumok (e kritériumokat lásd a 14–20. pontban),

— megismételhetők.

Az adatok értelmezésének kritériumai

7. táblázat

Pozitív és negatív besorolás feltételei az ösztrogénreceptor agonista vizsgálatoknál

Pozitív	Amikor az RPC_{Max} érték két vagy három vizsgálatmenetből kettőben megegyezik a pozitív kontroll által előidézett válasz 10 %-ával, vagy meghaladja azt.
Negatív	Amikor az RPC_{Max} érték két vagy három vizsgálatmenetből kettőben nem éri el legalább a pozitív kontroll által előidézett válasz 10 %-át.

8. táblázat

Pozitív és negatív besorolás feltételei az ösztrogénreceptor antagonista vizsgálatoknál

Pozitív	Amikor két vagy három vizsgálatmenetből kettőben számítható IC_{30} érték.
Negatív	Amikor két vagy három vizsgálatmenetből kettőben nem számítható IC_{30} érték.

43. Az adatok értelmezésének kritériumait a 7. és a 8. táblázat tartalmazza. A pozitív eredményeket jellemezni kell mind a kiváltott hatás mértékével, mind a hatást előidéző koncentrációval. E két cél egyszerre teljesíthető azáltal, ha az eredményeket abban a koncentrációban fejezik ki, amelynél a PC-értékek 50 %-át (PC_{50}) vagy 10 %-át (PC_{10}) elérték az agonista vizsgálatban, és a kiegészítő kontroll értékének 50 %-a (IC_{50}) vagy 30 %-a (IC_{30}) gátlódott az antagonista vizsgálatban. Egy adott vizsgálati vegyi anyag pozitívnak minősül, ha a vizsgálati vegyi anyag által előidézett maximális válasz (RPC_{Max}) két vagy három vizsgálatmenetből kettőben megegyezik a pozitív kontroll által előidézett válasz 10 %-ával, vagy meghaladja azt, ugyanakkor negatívnak tekintendő, ha az RPC_{Max} értéke két vagy három vizsgálatmenetből kettőben nem éri el legalább a pozitív kontroll által előidézett válasz 10 %-át.

44. Az ösztrogénreceptor agonista vizsgálat PC_{10}, PC_{50} és PC_{Max} értékeinek, valamint az ösztrogénreceptor antagonista vizsgálat IC_{30} és IC_{50} értékeinek kiszámításához igénybe lehet venni a vizsgálati iránymutatáshoz tartozó és az OECD nyilvános weboldalán ([2]) rendelkezésre álló táblázatot.

45. A PC_{10} vagy PC_{50} és az IC_{30} vagy IC^{50} értékek legalább két alkalommal történő meghatározása általában elegendőnek bizonyul. Ha azonban egy adott koncentrációtartományba tartozó adatoknál az alapvonal szórása elfogadhatatlanul magas variációs koefficiensű (CV; %), megkérdőjelezhető az adatok megbízhatósága, és be kell azonosítani a nagy szórás okát. A PC_{10} érték meghatározásához használt adatpontok nyers adatainak (vagyis a lumineszcencia intenzitására vonatkozó adatoknak) három ismétlésből számolt variációs koefficiense nem érheti el a 20 %-ot.

46. Az elfogadhatósági kritériumok teljesítése jelzi a vizsgálati rendszer megfelelő működését, de nem garantálja az egyes vizsgálatmenetek adatainak pontosságát. Az adatok pontosságát az biztosítja a legjobban, ha az első vizsgálatmenet eredményei megismételhetők.

47. Azon ösztrogénreceptor agonista vizsgálatok esetében, amelyeknél a pozitív vizsgálati vegyi anyagok – különösen a PC_{10}–PC_{49} értékkel rendelkező és a gyaníthatóan túlzott luciferáz-aktivitást okozó vegyi anyagok – tekintetében több információra van szükség, mint amit e szűrési és rangsorolási célú vizsgálati iránymutatás biztosít, egy ERα antagonista használatával megerősíthető, hogy a megfigyelt luciferáz-aktivitást kizárólag az ERα idézi elő (lásd a 2.1. függeléket).

VIZSGÁLATI JELENTÉS

48. Lásd „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” című 20. pontot.

SZAKIRODALOM

(1) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(2) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459-1469.

(3) Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.,* 139, 4252-4263.

([2]) http://www.oecd.org/env/testguidelines

(4) Spaepen M., *et al.* (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, FEMS Microbiol. Lett., 78(1), 89-94.

(5) Kobayashi H., *et al.* (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, J. Vet. Med. Sci., 57(4), 769- 71.

(6) Dussurget O. and Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl.* Environ. Microbiol., 60(3), 953-9.

(7) De Lean A., Munson P.J. and Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, Am. J. Physiol., 235, E97-El02.

2.1. függelék

ÁLPOZITÍV EREDMÉNYEK: A NEM RECEPTOR ÁLTAL KÖZVETÍTETT LUMINESZCENCIA JELEK ÉRTÉKELÉSE

1. Az ösztrogénreceptor agonista vizsgálat álpozitív eredményei keletkezhetnek abból, hogy a luciferáz gént nem az ösztrogénreceptor által közvetített aktiválás indukálta, a géntermék közvetlenül aktiválódott, illetve a vizsgálattól független fluoreszcencia lépett fel. Az ilyen jellegű hatásokra a dózis-válasz görbe hiányosságából vagy szokatlan formájából lehet következtetni. Amennyiben gyaníthatóan ilyen hatások játszanak közre, meg kell vizsgálni egy ösztrogénreceptor antagonista (pl. nem toxikus koncentrációban alkalmazott 4-hidroxitamoxifén (OHT)) válaszra gyakorolt hatását. A tisztán antagonista ICI 1827 80 nem feltétlenül alkalmas erre a célra, mivel az ICI 1827 80 megfelelő koncentrációja csökkentheti a VC értékét, ami befolyásolja az adatelemzést.

2. E megközelítés hitelességének biztosítása érdekében az alábbiakat kell vizsgálni ugyanazon a lemezen:

   — az ismeretlen vegyi anyag agonista hatású aktivitása 10 μM OHT-vel és anélkül vizsgálva,

   — VC (három ismétlés),

   — OHT (három ismétlés),

   — agonista pozitív kontrollként 1 nM E2 (három ismétlés),

   — 1 nM E2 + OHT (három ismétlés).

Az adatok értelmezésének kritériumai

Megjegyzés: Valamennyi lyukat a vivőanyag azonos koncentrációjával kell kezelni.

— Amennyiben az ismeretlen vegyi anyag agonista hatású aktivitását NEM befolyásolja az ER-antagonistával való kezelése, akkor „negatívnak" minősítendő.

— Ha az ismeretlen vegyi anyag agonista hatású aktivitását teljesen gátolta a kezelés, akkor a döntési kritériumokat kell alkalmazni.

— Amennyiben a legalacsonyabb koncentrációnál az agonista hatású aktivitás megegyezik a PC_{10} válasszal vagy meghaladja azt, az ismeretlen vegyi anyag gátlása eléri vagy meghaladja a PC_{10} választ. Meg kell határozni a kezeletlen és az ER-antagonistával kezelt lyukak válaszreakciója közötti különbséget, és ez a különbség tekintendő valós válasznak, ez alapján kell kiszámítani a kategóriába sorolási döntést lehetővé tévő, megfelelő paramétereket.

Az adatok elemzése

Ellenőrizzük a teljesítményszabványokat.

Ellenőrizzük az azonos feltételekkel kezelt lyukak közötti variációs koefficienst.

1. Számítsuk ki a VC átlagát.

2. A VC átlagát vonjuk ki az egyes OHT-vel **nem** kezelt lyukaknál kapott értékből.

3. Számítsuk ki az OHT átlagát.

4. A VC átlagát vonjuk ki az egyes OHT-vel kezelt lyukaknál kapott értékből.

5. Számítsuk ki a PC átlagát.

6. Számítsuk ki a többi lyuk pozitív kontrollhoz viszonyított, relatív transzkripciós aktivitását.

2.2. függelék

A DEXTRÁNBEVONATÚ AKTÍV SZÉNNEL (DCC) KEZELT SZÉRUM ELKÉSZÍTÉSE

1. A szérum dextránbevonatú aktív szénnel (DCC) történő kezelése egy általánosan használt módszer arra, hogy az ösztrogénhatású vegyületeket eltávolítsák a tápoldatot kiegészítő szérumból, biztosítva ezáltal, hogy a szérumban lévő maradék ösztrogének ne torzítsák el a válasz. Ezen eljárás keretében 500 ml magzati borjú szérumot (FBS) kezelnek.

Alkotóelemek

2. Az alábbi anyagokra és eszközökre lesz szükség:

Anyagok

Aktív szén

Dextrán

Magnézium-klorid-hexahidrát ($MgCl_2 \times 6H_2O$)

Szacharóz

1 M HEPES pufferoldat (pH-értéke 7,4)

Szűrőrendszerrel előállított ultra nagytisztaságú víz

Eszközök

Autokláv üvegedény (mérete szükség szerint módosítandó), általános laboratóriumi centrifuga (amely beállítható 4 °C-os hőmérsékletre)

Az eljárás

3. Az alábbi eljárást 50 ml-es centrifugacsövek használatához alakítottuk:

[1. nap] Készítsük el a dextránbevonatú aktív szén szuszpenziót, ehhez szükséges 1 l ultra nagytisztaságú víz, ami 1,5 mM $MgCl_2$-t, 0,25 M szacharózt, 2,5 g aktív szenet, 0,25 g dextránt és 5 mM HEPES puffert tartalmaz, majd 4 °C-on kevertessük egy éjszakán át.

[2. nap] Adagoljuk a szuszpenziót 50 ml-es centrifugacsövekbe, és 10 000 rpm sebességgel 4 °C-on centrifugáljuk 10 percig. Távolítsuk el a felülúszót, és az aktív szén üledék felét tároljuk 4 °C-on, ez a 3. napon kerül felhasználásra. Az aktív szén üledék másik felét szuszpendáljuk FBS-sel, amelyet előzőleg a kicsapódások elkerülése érdekében lassan felolvasztottunk és 56 °C-on 30 percig inaktiváltunk, majd helyezzük a szuszpenziót autoklávozott üvegedénybe, például Erlenmeyer-lombikba. Óvatosan kevertessük a szuszpenziót 4 °C-on egy éjszakán keresztül.

[3. nap] Adagoljuk az FBS-t tartalmazó szuszpenziót centrifugacsövekbe, és 10 000 rpm sebességgel 4 °C-on centrifugáljuk 10 percig. Gyűjtsük össze az FBS-t, és adjuk hozzá a második napon készített és eltárolt aktív szén üledéket. Szuszpendáljuk fel az aktív szén üledéket, majd a szuszpenziót egy autoklávozott üvegedényben óvatosan kevertessük 4 °C-on egy éjszakán keresztül.

[4. nap] Adagoljuk ki a szuszpenziót, és 10 000 rpm sebességgel 4 °C-on centrifugáljuk 10 percig, majd egy 0,2 μm steril szűrőn való átszűréssel sterilizáljuk a felülúszót. Ez a dextránbevonatú aktív szénnel kezelt magzati borjú szérum -20 °C-on tárolandó, és egy évig felhasználható.

3. Függelék

ÖSZTROGÉNRECEPTOR AGONISTÁK ÉS ANTAGONISTÁK ÉSZLELÉSÉRE SZOLGÁLÓ VM7LUC ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

1. Ez a vizsgálat VM7Luc4E2 sejtvonalak ([1]) használatára épül. A vizsgálatot az Országos Toxikológiai Program Alternatív Toxikológiai Módszerek Értékelésével Foglalkozó Ügynökségközi Központja (NICEATM) és az alternatív módszerek validálásával foglalkozó ügynökségközi koordinációs bizottság (ICCVAM) validálta (1). A VM7Luc sejtvonalak elsősorban endogén ERα, kisebb mértékben endogén ERβ receptorokat fejeznek ki (2) (3) (4).

2. Ez a vizsgálat anyagok széles skálájára alkalmazható, feltéve, ha oldódnak dimetil-szulfoxidban (DMSO; CAS-szám: 67-68-5), nem lépnek reakcióba a DMSO-dal vagy a sejttenyésztő közeggel, és a vizsgált koncentrációkban nem citotoxikusak. Amennyiben DMSO nem használható, más vivőanyag, például etanol vagy víz is alkalmazható (lásd a 12. pontot). A VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs (ant)agonista vizsgálat bizonyított hatékonysága arra enged következtetni, hogy a vizsgálat során nyert adatok információt nyújthatnak az ER-közvetített hatásmechanizmusokról, és alkalmasak az anyagok további vizsgálatra való rangsorolására.

3. Ezt a vizsgálatot kifejezetten arra a célra tervezték, hogy a kémiai lumineszcencia mint végpont mérése révén észlelje a hERα és a hERß által közvetített transzaktivációt. A kémiai lumineszcenciát széles körben alkalmazzák a biológiai vizsgálatok során, mert a lumineszcencia nagy érzékenységgel mérhető a háttérzajhoz képest. A sejtalapú vizsgálatokban azonban a szentjánosbogár luciferáz aktivitását megzavarhatják olyan anyagok, amelyek gátlólag hatnak a luciferáz enzimre, és ezáltal egyaránt előidézhetnek látszólagos gátlást és fehérjestabilizációból fakadó erősebb lumineszcenciát. Emellett néhány luciferáz alapú ER riportergén vizsgálatban beszámoltak arról, hogy az 1 μM-nél magasabb fitoösztrogén-koncentrációnál a luciferáz riportergén túlzott aktiválása miatt nem receptorok által közvetített lumineszcencia jelek észlelhetők. Bár a dózis-válasz görbe arra utal, hogy az ER-rendszer ténylegesen alacsonyabb koncentrációknál aktiválódik, a magas fitoösztrogén-koncentráció mellett vagy feltehetőleg a luciferáz riportergént a fitoösztrogénhez hasonlóan túlzottan aktiváló vegyületek magas koncentrációja mellett kapott luciferázkifejeződést körültekintően kell vizsgálni a stabilan transzfektált ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálati rendszerekben.

4. E vizsgálat szabályozási célra való alkalmazása előtt el kell olvasni az „ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS” és „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” részt. A vizsgálati módszerben használt fogalmak és rövidítések meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

5. Ez a vizsgálat arra szolgál, hogy jelezze az ösztrogénreceptor ligandumhoz kötődését, amely ezt követően mint receptor-ligandum komplex transzlokálódik a sejtmagba. A receptor-ligandum komplex a sejtmagban a specifikus DNS válaszelemekhez kötődve transzaktiválja a riportergént (*luc*), aminek eredményeként luciferáz termelődik, majd fény szabadul fel, amelynek mennyisége luminométerrel meghatározható. A luciferáz-aktivitás számos kereskedelmi forgalomban kapható készlettel gyorsan és költséghatékonyan értékelhető. A VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktiváció során egy ösztrogénreceptor-reszponzív humán emlő adenokarcinoma sejtvonalat, a VM7-et használják, amelyet egy szentjánosbogár luciferáz riporterkonstrukcióval stabilan transzfektáltak, a riporter gén az egér emlőtumor vírus (MMTV) promóter előtt található négy ösztrogén válaszelem szabályzása alatt áll, így lehet észlelni *in vitro* az ösztrogénreceptor agonista vagy antagonista hatást kiváltó anyagokat. Ez az MMTV-promóter más szteroid és nem

([1]) 2016 júniusa előtt ezt a sejtvonalat BG1Luc sejtvonalnak nevezték. A BG-1 sejteket eredetileg Greisinger és munkatársai (1998) írták le (12), később pedig a National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) kutatói karakterizálták (13). Nemrégiben rájöttek arra, hogy a kutatók a BG-1 sejtek két különböző variánsát, a BG-1 Fr-t és a BG-1 NIEHS-t használják. Li és munkatársai (2014) (14) a két BG-1 sejtvonalvariáns részletes elemzése, többek között DNS-vizsgálatuk elvégzése révén kimutatták, hogy a BG-1 Fr egyedi sejtvonal, és hogy a BG-1 NIEHS, vagyis a vizsgálat kidolgozásához eredetileg használt sejtvonal nem a BG1 humán petefészekrák sejtvonala, hanem az MCF7 humán mellráksejtvonal variánsa. A vizsgálatban alkalmazott sejtvonal, eredeti elnevezésén a BG1Luc4E2 (15), immár VM7Luc4E2 néven szerepel („V” = variáns; „M7” = MCF7 sejtek). Hasonlóképpen a vizsgálat jelenlegi elnevezése az VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktiváció. Bár ez módosítja a vizsgálat alapjául szolgáló sejtvonal eredetét, nem befolyásolja sem a közzétett validálási tanulmányokat, sem a vizsgálat hasznosságát és alkalmazhatóságát az ösztrogén/antiösztrogén hatású vegyi anyagok szűrésére.

szteroid hormonokra csak csekély mértékben aktiválódik (8). Az adatok értelmezésének kritériumait részletesen a 41. pont ismerteti. Röviden: a pozitív válasz olyan koncentráció-válasz görbe alapján ismerhető fel, amely legalább három pontot tartalmaz, amelyeknek a szórása nem fed át (átlag ± SD), valamint a (normalizált relatív fényegységben [RLU] mért) válasz amplitúdója eléri a referenciaszabvány maximális értékének legalább 20 %-át (a referenciaszabvány a 17β-ösztradiol [E2; CAS-szám: 50-28-2] az agonista vizsgálat esetén, a raloxifen-hidroklorid [Ral; CAS-szám: 84 449-90-1]/E2 az antagonista vizsgálat esetén).

ELJÁRÁS

Sejtvonal

6. A vizsgálathoz stabilan transzfektált VM7Luc4E2 sejtvonalat kell használni. A sejtvonal jelenleg kizárólag szakmai licencszerződés birtokában szerezhető be a Kaliforniai Egyetemtől, Davis, Kalifornia, USA ([2]) és a Xenobiotic Detection Systems Inc. vállalattól, Durham, Észak-Karolina, USA ([3]).

A sejtvonal stabilitása

7. A sejtvonal stabilitásának és integritásának megőrzése érdekében a fagyasztott sejtkultúrából származó sejteket legalább két passzálásig megfelelő tápoldatban kell növeszteni (lásd a 9. pontot). A sejteket legfeljebb 30 alkalommal szabad passzálni. A VM7Luc4E2 sejtvonal esetében a 30 passzálás mintegy három hónapot vesz igénybe.

Sejttenyésztés és a leültetés körülményei

8. Az összes anyag és módszer minőségének biztosítása érdekében az Iránymutatás a megfelelő sejttenyésztési gyakorlathoz (5) (6) című dokumentumban meghatározott eljárások szerint kell eljárni, hogy garantálni lehessen az elvégzett tevékenységek integritását, hitelességét és megismételhetőségét.

9. A VM7Luc4E2 sejteket 0,9 % penicillinnel és sztreptomicinnel, valamint 8,0 % magzati borjú szérummal (FBS) kiegészített RPMI 1 640 tápoldatban tartják fenn, egy erre a célra alkalmas szövettenyésztő inkubátorban 37 °C-on (± 1 °C), 90 %-os (± 5 %) páratartalom és 5,0 %-os (± 1 %) CO_2-tartalom mellett.

10. Mintegy 80 %-os konfluencia elérését követően a VM7Luc4E2 sejteket szubkultúrákat hoznak létre és a leültetés előtt egy ösztrogénmentes környezetben 48 órán át kondicionálják, majd a sejteket leültetik egy 96 lyukú lemezre, ahol a vizsgálati vegyi anyaggal kezelik és elemzik a luciferáz-aktivitás ösztrogénfüggő indukcióját. Az ösztrogénmentes tápoldat (EFM) egy fenolvörösmentes Dulbecco-féle módosított Eagle-tápoldat (DMEM), kiegészítve 4,5 % dextránbevonatú aktív szénnel kezelt magzati borjú szérummal (FBS), 1,9 % L-glutaminnal, valamint 0,9 % penicillinnel és sztreptomicinnel. A műanyag edényeken nem történhet ösztrogénhatású aktivitás [lásd a részletes protokollt (7)].

Elfogadhatósági kritériumok

11. Valamely vizsgálat elfogadására vagy elvetésére az egyes 96 lyukú lemezeken végzett kísérletekben alkalmazott referenciaszabványok és kontrollok eredményeinek értékelése alapján kerül sor. Minden referenciaszabványt több

([2]) Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, e-mail-cím: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649

([3]) Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, e-mail-cím: info@dioxins.com, telefonszám: 919-688-4804, fax: 919-688-4404

koncentrációban kell tesztelni, és minden referenciaszabvány- és kontrollanyag-koncentrációt több mintán kell vizsgálni. Az eredményeket össze kell vetni az e paraméterek minőség-ellenőrzésére szolgáló adatokkal, amelyek a laboratórium által a jártasság bizonyítása során létrehozott agonista és antagonista adatbázisokból származnak. Ezeket az adatbázisokat a referenciaszabványokra és a kontrollanyagokra kapott értékekkel folyamatosan frissítik. A felszerelés vagy a laboratóriumi körülmények változása esetén új adatbázisok létrehozására lehet szükség.

Agonista vizsgálat

Dózistartomány- kereső vizsgálat

- Indukció: A lemezen tapasztalt aktivitás indukciós faktorának méréséhez el kell osztani az E2 referenciaszabvány átlagos legmagasabb relatív fényegységét (RLU) a DMSO-kontroll átlagos RLU-értékével. Általában ötszörös indukció figyelhető meg, de a legalább négyszeres indukció már elfogadható.

- DMSO-kontroll eredményei: Az oldószeres kontroll RLU-értékeinek nem szabad meghaladniuk a dokumentált oldószeres kontrollok átlagos RLU-értékére jellemző standard deviáció 2,5-szeresét.

- Azt a kísérletet, amelyben e két elfogadhatósági kritérium bármelyike nem teljesül, figyelmen kívül kell hagyni és meg kell ismételni.

Teljes körű vizsgálat

Az agonista dózistartomány-kereső vizsgálat elfogadhatósági kritériumai mellett az alábbiakat foglalja magában:

- Referenciaszabvány eredményei: Az E2 referenciaszabvány koncentráció-válasz görbéje legyen szigmoid formájú és tartalmazzon legalább három értéket a koncentráció-válasz görbe lineáris szakaszán.

- Pozitív kontroll eredményei: A metoxiklórral végzett kontroll RLU-értékei haladják meg a DMSO átlagától való standard deviáció háromszorosával növelt DMSO-átlagot.

- Azt a kísérletet, amelyben valamely elfogadhatósági kritérium nem teljesül, figyelmen kívül kell hagyni és meg kell ismételni.

Antagonista vizsgálat

Dózistartomány- kereső vizsgálat

- Aktivitás csökkenése: A lemezen tapasztalt aktivitás csökkenésének méréséhez el kell osztani a Ral/E2 referenciaszabvány átlagos legmagasabb RLU-értékét a DMSO-kontroll átlagos RLU-értékével. Általában ötszörös csökkenés figyelhető meg, de a legalább háromszoros csökkenés már elfogadható.

- E2-kontroll eredményei: Az E2-kontroll RLU-értékeinek nem szabad meghaladniuk a dokumentált E2-kontrollok átlagos RLU-értékére jellemző standard deviáció 2,5-szeresét.

- DMSO-kontroll eredményei: A DMSO-kontroll RLU-értékeinek nem szabad meghaladniuk a dokumentált oldószeres kontrollok átlagos RLU-értékére jellemző standard deviáció 2,5-szeresét.

• Azt a kísérletet, amelyben valamely elfogadhatósági kritérium nem teljesül, figyelmen kívül hagyják és megismétlik.

Teljes körű vizsgálat

Az antagonista dózistartomány-kereső vizsgálat elfogadhatósági kritériumai mellett az alábbiakat foglalja magában:

• Referenciaszabvány eredményei: A Ral/E2 referenciaszabvány koncentráció-válasz görbéje legyen szigmoid formájú és tartalmazzon legalább három értéket a koncentráció-válasz görbe lineáris szakaszán.

• Pozitív kontroll eredményei: A tamoxifénnel/E2-vel végzett kontroll RLU-értékei nem haladhatják meg az E2-kontroll átlagától való standard deviáció háromszorosával csökkentett E2-átlagot.

• Azt a kísérletet, amelyben valamely elfogadhatósági kritérium nem teljesül, figyelmen kívül hagyják és megismétlik.

Referenciaszabványok, pozitív és vivőanyagos kontrollok

Vivőanyagos kontroll (agonista és antagonista vizsgálat)

12. A vizsgálati vegyi anyagok feloldására használt vivőanyagot vivőanyagos kontroll keretében vizsgálni kell. A VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálása során használt vivőanyag 1 térfogatszázaléknyi dimetil-szulfoxid (DMSO, CAS-szám: 67-68-5) (lásd a 24. pontot). DMSO-tól eltérő vivőanyag használata esetén valamennyi referenciaszabványt, kontrollanyagot és vizsgálati vegyi anyagot ugyanabban a vivőanyagban kell tesztelni, ha alkalmazandó.

Referenciaszabvány (agonista dózisbehatárolás)

13. A referenciaszabvány az E2 (CAS-szám: 50-28-2). A dózistartomány-kereső vizsgálatban a referenciaszabvány az E2 négy elemből álló koncentrációsorozata (1,84 x 10^{-10}, 4,59 x 10^{-11}, 1,15 x 10^{-11} és 2,87 x 10^{-12} M), minden egyes koncentrációértéket replikátumban kell vizsgálni.

Referenciaszabvány (agonista teljes körű vizsgálat)

14. A teljes körű vizsgálatban az E2 1:2 arányban hígított 11 elemes (3,67 x 10^{-10} és 3,59 x 10^{-13} M között terjedő) koncentrációsorozatból áll, a koncentrációértékeket replikátumban vizsgálják.

Referenciaszabvány (antagonista dózisbehatárolás)

15. A referenciaszabvány a Ral (CAS-szám: 84 449-90-1) és az E2 (CAS-szám: 50-28-2) kombinációja. A dózistartomány-kereső vizsgálatban a Ral/E2 a Ral három elemből álló hígított koncentrációsorozatából (3,06 x 10^{-9}, 7,67 x 10^{-10} és 1,92 x 10^{-10} M) és az E2 fix koncentrációjából (9,18 × 10^{-11} M) tevődik össze, minden koncentrációértéket replikátumban vizsgálnak.

Referenciaszabvány (antagonista teljes körű vizsgálat)

16. A teljes körű vizsgálatban a Ral/E2 a Ral 1:2 arányban hígított (2,45 x 10^{-8} és 9,57 x 10^{-11} M között terjedő) koncentrációsorozatából és az E2 fix koncentrációjából (9,18 × 10^{-11} M) tevődik össze, a Ral/E2 kilenc koncentrációértékének mindegyikét replikátumban vizsgálják.

Gyenge pozitív kontroll (agonista)

17. A gyenge pozitív kontroll az ösztrogénmentes közegben vizsgált 9,06 x 10^{-6} M *p,p'*-metoxiklór (metoxiklór; CAS-száma: 72-43-5).

Gyenge pozitív kontroll (antagonista)

18. A gyenge pozitív kontroll az ösztrogénmentes közegben, 9,18 × 10^{-11} M E2 jelenlétében vizsgált 3,36 x 10^{-6} M tamoxifén (CAS-száma: 10 540-29-1).

E2-kontroll (csak antagonista vizsgálat esetén)

19. Az alapvonal negatív kontrollként szolgáló E2-kontroll az ösztrogénmentes közegben vizsgált 9,18 × 10^{-11} M E2.

Indukciós faktor (agonista)

20. A referenciaszabvány (E2) által előidézett luciferáz-aktivitás méréséhez el kell osztani az E2 referenciaszabvány átlagos legmagasabb RLU-értékét a DMSO-kontroll átlagos RLU-értékével; az eredménynek négyszeresnél nagyobb indukciót kell jeleznie.

Indukciós faktor (antagonista)

21. A referenciaszabvány (Ral/E2) által előidézett átlagos luciferáz-aktivitás méréséhez el kell osztani a Ral/E2 referenciaszabvány átlagos legmagasabb RLU-értékét a DMSO-kontroll átlagos RLU-értékével, és az eredménynek háromszorosnál nagyobb csökkenést kell mutatnia.

A laboratórium jártasságának igazolása (lásd a vizsgálati módszer „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI" részének 14. pontját, valamint 3. és 4. táblázatát).

Vivőanyag

22. A vizsgálati vegyi anyagokat olyan oldószerben kell feloldani, amelyik szolubilizálja a vizsgálati vegyi anyagot és elegyedik a tápoldattal. A megfelelő vivőanyagok közé tartozik a víz, az etanol (95–100 %-os tisztaságban) és a dimetil-szulfoxid. Dimetil-szulfoxid használata esetén az anyag mennyisége nem haladhatja meg az 1 térfogatszázalékot. Minden vivőanyag esetében igazolni kell, hogy maximális alkalmazott térfogatuk nem fejt ki citotoxikus hatást és nem zavarja a vizsgálat teljesítményét. A referenciaszabványokat és kontrollanyagokat 100 %-os oldószerben feloldják, majd ösztrogénmentes közegben a megfelelő koncentrációkra hígítják.

Vizsgálati vegyi anyagok előkészítése

23. A vizsgálati vegyi anyagokat 100 %-os DMSO-ban (vagy megfelelő oldószerben) feloldják, majd ösztrogénmentes közegben a megfelelő koncentrációkra hígítják. Feloldás és hígítás előtt meg kell várni, hogy minden vizsgálati vegyi anyag szobahőmérsékletű legyen. A vizsgálati vegyi anyag oldatait minden kísérlethez frissen kell elkészíteni. Az oldatban nem lehet szemmel látható kicsapódás és az oldat nem lehet zavaros. A referenciaszabványok és kontrollanyagok nagy tételben is előkészíthetők; a referenciaszabványok és kontrollanyagok végleges oldatait, valamint a vizsgálati vegyi anyagokat minden egyes kísérlethez frissen kell készíteni, és az elkészítéstől számított 24 órán belül fel kell használni.

Oldhatóság és citotoxicitás: a dózisbehatárolás szempontjai

24. A dózistartomány-kereső vizsgálat hét koncentrációban és duplikátumban vizsgált 1: 10 arányú oldatsorozatból áll. A vizsgálati vegyi anyagokat először a legmagasabb koncentrációig vizsgálják, ami az agonista vizsgálat esetében 1 mg/ml (~1 mM), az antagonista vizsgálat esetében pedig 20 μg/ml (~10 μM). A dózistartomány-kereső kísérletek az alábbiak meghatározására szolgálnak:

— a vizsgálati vegyi anyag teljes körű vizsgálat során alkalmazandó induló koncentrációértékei;

— a vizsgálati vegyi anyag teljes körű vizsgálat során alkalmazandó (1:2 vagy 1:5 arányú) hígításai.

25. Az agonista és antagonista vizsgálati protokollokba belefoglalták a sejtéletképesség/citotoxicitás mérését (7), ami részét képezi mind a dózistartomány-kereső, mind a teljes körű vizsgálatnak. A VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálása során (1) a sejtéletképesség megállapítása céljából egy lépcsőzetes kvalitatív vizuális megfigyelési módszerrel mérték fel a citotoxicitást; a citotoxicitás meghatározásához azonban kvantitatív módszert is lehet alkalmazni (lásd a protokollt (7)). Az életképességet több mint 20 %-kal csökkentő vegyianyag-koncentrációkra vonatkozó adatok nem használhatók.

Vegyi anyaggal történő kezelés és a vizsgálati lemez elrendezése

26. A sejteket megszámlálják és ösztrogénmentes tápoldatban (lyukanként 2 x 10^5 sejt sűrűségben) 96 lyukú szövettenyésztő lemezre szélesztik ki, majd 24 órán át inkubálják, hogy a sejtek kitapadjanak a lemezre. Ezt követően az ösztrogénmentes tápoldatot eltávolítják, és a sejteket ösztrogénmentes tápoldatba adagolt vizsgálati és referencia vegyi anyagokkal 19–24 órán keresztül inkubálják. Rendkívül illékony anyagok esetén egyedi szempontokat is figyelembe kell venni, mivel a kontrollanyagot tartalmazó közeli lyukak álpozitív eredményhez vezethetnek. Ilyen esetekben a „zárófólia" használata hatékonyan izolálhatja az egyes lyukakat a vizsgálat során, ezért alkalmazása ajánlott.

Dózistartomány-kereső vizsgálatok

27. A dózistartomány-kereső vizsgálat során a 96 lyukú lemez összes lyukának felhasználásával akár hat vizsgálati vegyi anyag is tesztelhető hét koncentrációban, duplikátumban, 1:10 arányú hígítási sorozatban (lásd az 1. és a 2. ábrát).

— Az *agonista* dózistartomány-kereső vizsgálat során referenciaszabványként az E2 négy koncentrációját mérik duplikátumban, és négy lyukat tartanak fent a DMSO-kontroll számára.

— Az *antagonista* dózistartomány-kereső vizsgálat során pedig referenciaszabványként a Ral/E2 három koncentrációját mérik 9,18 × 10^{-11} M E2-vel duplikátumban, és három-három lyukat tartanak fent az E2 és a DMSO-kontroll számára.

1. ábra

A 96 lyukú lemez elrendezése agonista dózistartomány-kereső vizsgálathoz

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Rövidítések: E2-1 és E2-4 között = az E2 referenciaszabvány koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC1-1 és TC1-7 között = az 1. vizsgálati vegyi anyag (TC1) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC2-1 és TC2-7 között = a 2. vizsgálati vegyi anyag (TC2) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC3-1 és TC3-7 között = a 3. vizsgálati vegyi anyag (TC3) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC4-1 és TC4-7 között = a 4. vizsgálati vegyi anyag (TC4) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC5-1 és TC5-7 között = az 5. vizsgálati vegyi anyag (TC5) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC6-1 és TC6-7 között = a 6. vizsgálati vegyi anyag (TC6) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); VC = vivőanyagos kontroll (DMSO [1 térfogatszázalék EFM-ben]).

2. ábra

A 96 lyukú lemez elrendezése antagonista dózistartomány-kereső vizsgálathoz

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Rövidítések: E2 = E2-kontroll; Ral-1 és Ral-3 között = a raloxifen/E2 referenciaszabvány koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC1-1 és TC1-7 között = az 1. vizsgálati vegyi anyag (TC1) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC2-1 és TC2-7 között = a 2. vizsgálati vegyi anyag (TC2) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC3-1 és TC3-7 között = a 3. vizsgálati vegyi anyag (TC3) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC4-1 és TC4-7 között = a 4. vizsgálati vegyi anyag (TC4) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC5-1 és TC5-7 között = az 5. vizsgálati vegyi anyag (TC5) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC6-1 és TC6-7 között = a 6. vizsgálati vegyi anyag (TC6) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); VC = vivőanyagos kontroll (DMSO [1 térfogatszázalék EFM-ben]).

Megjegyzés: Minden vizsgálati vegyi anyagot $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2 jelenlétében kell vizsgálni.28.
Az egyes lyukakba helyezendő tápoldat végleges ajánlott térfogata 200 µl. Csak olyan vizsgálati lemezek használhatók, amelyek valamennyi lyukában a sejtek életképessége legalább 80 %.

29. A teljes körű ***agonista*** vizsgálat induló koncentrációértékeinek meghatározását részletesen ismerteti az agonista protokoll (7). Röviden az alábbi kritériumoknak kell megfelelni:

— Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag koncentrációgörbéjén nincs olyan pont, amelyik meghaladná a DMSO-kontroll átlagától való standard deviáció háromszorosával növelt átlagot, a teljes körű vizsgálatot 1:2 arányban hígított, 11 elemből álló koncentrációsorozattal kell végrehajtani, a maximális oldható koncentrációval kezdve.

— Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag koncentrációgörbéjén vannak olyan pontok, amelyek meghaladják a DMSO-kontroll átlagától való standard deviáció háromszorosával növelt átlagot, a teljes körű vizsgálat 11 koncentrációjú hígítási rendszerének induló koncentrációértéke egy loggal magasabb legyen annál a koncentrációnál, amely a dózisbehatárolás során a legmagasabb kiigazított RLU-értéket adta. A 11 koncentrációjú hígítási rendszer alapja az 1:2 vagy 1:5 arányú hígítás, az alábbi kritériumok alapján:

  Az 1:2 arányban hígított, 11 elemből álló koncentrációsorozat akkor alkalmazandó, ha az eredményül kapott koncentrációtartomány – a dózistartomány-kereső vizsgálat koncentráció-válasz görbéje alapján – magában foglalja a válaszok teljes tartományát. Ellenkező esetben 1:5 arányú hígítást kell alkalmazni.

— Amennyiben valamely vizsgálati vegyi anyag dózistartomány-kereső vizsgálata kétfázisú koncentráció-válasz görbét eredményez, a teljes körű vizsgálat során mindkét fázist figyelembe kell venni.

30. A teljes körű ***antagonista*** vizsgálat induló koncentrációértékeinek meghatározását részletesen ismerteti az antagonista protokoll (7). Röviden az alábbi kritériumoknak kell megfelelni:

— Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag koncentrációgörbéjén nincs olyan pont, ami kisebb mint az E2-kontroll átlagától való standard deviáció háromszorosával csökkentett átlag, a teljes körű vizsgálatot 1:2 arányban hígított, 11 elemből álló koncentrációsorozattal kell végrehajtani, a maximális oldható koncentrációval kezdve.

— Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag koncentrációgörbéjén vannak olyan pontok, amelyek nem haladják meg az E2-kontroll átlagától való standard deviáció háromszorosával csökkentett átlagot, a teljes körű vizsgálat 11 koncentrációjú hígítási rendszerének induló koncentrációértéke az alábbiak egyike kell legyen:

• a dózisbehatárolás során a legalacsonyabb kiigazított RLU-értéket adó koncentráció;

• a maximális oldható koncentráció (lásd az antagonista protokoll (7) 14-2. ábráját);

• a legalacsonyabb citotoxikus koncentráció (vonatkozó példához lásd az antagonista protokoll (7) 14-3. ábráját).

— A 11 koncentrációjú hígítási rendszer alapja az 1:2 vagy 1: 5 arányú hígítás, az alábbi kritériumok alapján:

Az 1:2 arányban hígított, 11 elemből álló koncentrációsorozat akkor alkalmazandó, ha az eredményül kapott koncentrációtartomány – a dózistartomány-kereső vizsgálat koncentráció-válasz görbéje alapján – magában foglalja a válaszok teljes tartományát. Ellenkező esetben 1:5 arányú hígítást kell alkalmazni.

Teljes körű tesztelés

31. A teljes körű vizsgálat egy 11 elemes koncentrációsorozatból áll (1:2 vagy 1:5 arányú hígítás alkalmazandó a teljes körű vizsgálat induló koncentrációértékének meghatározási kritériumai alapján), és minden koncentrációértéket három ismétlésben mérnek egy 96 lyukú lemezen (lásd a 3. és 4. ábrát).

— Az *agonista* teljes körű vizsgálat során referenciaszabványként az E2 11 koncentrációját mérik replikátumban. Mindegyik lemezen négy replikátum lyukat tartanak fent a DMSO-kontroll és négy replikátum lyukat a metoxiklórral végzett kontroll (9,06 x 10^{-6} M) számára.

— Az *antagonista* teljes körű vizsgálat során referenciaszabványként a Ral/E2 kilenc koncentrációját mérik 9,18 × 10^{-11} M E2-vel duplikátumban, emellett négy replikátum lyukat tartanak fent a 9,18 x 10^{-11} M E2-kontroll, négy replikátum lyukat a DMSO-kontroll és négy replikátum lyukat a 3,36 x 10^{-6} M tamoxifén kontroll számára.

3. ábra

A 96 lyukú lemez elrendezése agonista teljes körű vizsgálathoz

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Met
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Met
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Met
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Met

Rövidítések: TC1-1 és TC1-11 között = a 1. vizsgálati vegyi anyag koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC2-1 és TC2-11 között = a 2. vizsgálati vegyi anyag koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); E2-1 és E2-11 között = az E2 referenciaszabvány koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); Met = p,p'-metoxiklórral végzett gyenge pozitív kontroll; VC = 1 térfogatszázalék DMSO-dal EFM-ben végzett vivőanyagos kontroll.

4. ábra

A 96 lyukú lemez elrendezése antagonista teljes körű vizsgálathoz

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Rövidítések: E2 = E2-kontroll; Ral-1 és Ral-9 között = a raloxifen/E2 referenciaszabvány koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); Tam = tamoxifénnel/E2-vel végzett gyenge pozitív kontroll; TC1-1 és TC1-11 között = az 1. vizsgálati vegyi anyag (TC1) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC2-1 és TC2-11 között = a 2. vizsgálati vegyi anyag (TC2) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); VC = vivőanyagos kontroll (DMSO [1 térfogat-százalék EFM-ben]).

Megjegyzés: Amint az már említésre került, minden referencia és vizsgálati anyagot tartalmazó lyuk fix koncentrációban ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M) E2-t tartalmaz.

32. A vizsgálatok függetlenségének biztosítása érdekében az azonos vegyi anyaggal végzett teljes körű vizsgálatokat különböző napokon kell megismételni. Legalább két teljes körű vizsgálatot kell végezni. Ha az egyik vizsgálat eredménye ellentmond a másikénak (pl. az egyik pozitív, a másik negatív), vagy ha az egyik vizsgálat nem megfelelő eredményre vezetett, egy további, harmadik vizsgálatra van szükség.

A lumineszcencia mérése 33.

A lumineszcencia 300 és 650 nm közötti tartományban mérhető, a mérés egy injektor luminométer és egy szoftver segítségével történik, ez utóbbi szabályozza az injektált térfogatot és a mérési időközt (7). Az egyes lyukak által kibocsátott fényt lyukankénti RLU-ban fejezik ki.

AZ ADATOK ELEMZÉSE

Az EC_{50} /IC_{50} érték meghatározása

34. Az EC_{50} érték (a vizsgálati vegyi anyag maximális hatásának felét kiváltó koncentráció [agonisták esetében]) és az IC_{50} érték (a vizsgálati vegyi anyag maximális gátló hatásának felét kiváltó koncentráció [antagonisták esetében]) a koncentráció-válasz adatok alapján kerül meghatározásra. A legalább egy koncentrációban pozitívnak bizonyult vizsgálati vegyi anyagoknál a vizsgálati vegyi anyag félmaximális választ kiváltó koncentrációját (IC_{50} vagy EC_{50}) Hill-féle funkcióanalízissel vagy annak megfelelő alternatívájával számítják ki. A Hill-féle funkcióanalízis egy négy paraméteres logisztikai-matematikai modell, amely az alábbi egyenlet révén összekapcsolja a vizsgálati vegyi anyag koncentrációját a válasszal (ami általában egy szigmoid görbe formáját veszi fel): *Y = Görbe alja +(Görbe teteje - Görbe alja)* $1 + 10(\square_{50} - \square)$*Hill-meredekség*

$$Y = Görbe\ alja + \frac{(Görbe\ teteje - Görbe\ alja)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)Hill - meredekség}$$

ahol:

Y= a válasz (vagyis az RLU-értékek);

X= a koncentráció logaritmusa;

Görbe alja= a minimális válasz;

Görbe teteje= a maximális válasz;

lg EC_{50} (vagy lg IC_{50})= az X logaritmusa, a görbe teteje és alja közötti válasz;

Hill-meredekség= a görbe meredeksége.

A modell kikalkulálja a felső, alsó, meredekségi, IC_{50} és EC_{50} paraméterek legjobb mérőszámait. Az EC_{50} és IC_{50} értékek meghatározásához megfelelő statisztikai szoftvert kell használni (ilyen például a Graphpad Prism^{R} statisztikai szoftver).

Kiugró értékek meghatározása

35. A statisztikai eredmények megfelelő értékelését megkönnyíti, ha a vizsgálat során (egyebek mellett) elvégeznek egy Q-tesztet (az adatelemzésből kizárandó „használhatatlan" lyukak azonosításáról lásd az agonista és antagonista protokollt (7)).

36. Az E2 referenciaszabvány (két mintájú) replikátumai esetében az E2 bármely koncentrációjú replikátumának kiigazított RLU-értéke akkor tekinthető kiugrónak, ha az adott érték 20 %-kal alatta vagy felette van az adatbázisban az adott koncentrációra vonatkozó kiigazított RLU-értéknek.

Luminométerrel mért adatok begyűjtése és kiigazítása dózistartomány-kereső vizsgálathoz

37. A luminométer által szolgáltatott nyers adatokat át kell vezetni a vizsgálat céljára létrehozott táblázatsablonba. Meg kell határozni, hogy vannak-e a vizsgálatból kizárandó kiugró adatok. (Lásd az elemzés során meghatározott paraméterekre vonatkozó elfogadhatósági kritériumokat.) Az alábbi számításokat kell elvégezni:

Agonista vizsgálat

1. lépés Számítsuk ki a DMSO vivőanyagos kontroll (VC) átlagértékét.

2. lépés Az adatok normalizálásához a DMSO VC átlagértékét vonjuk ki az egyes lyukaknál kapott értékből.

3. lépés Számítsuk ki a referenciaszabvány (E2) átlagos indukciós faktorát.

4. lépés Számítsuk ki a vizsgálati vegyi anyagok átlagos EC_{50} értékét.

Antagonista vizsgálat

1. lépés Számítsuk ki a DMSO VC átlagértékét.

2. lépés Az adatok normalizálásához a DMSO VC átlagértékét vonjuk ki az egyes lyukaknál kapott értékből.

3. lépés Számítsuk ki a referenciaszabvány (Ral/E2) átlagos redukciós faktorát.

4. lépés Számítsuk ki az E2 referenciaszabvány átlagértékét.

5. lépés Számítsuk ki a vizsgálati vegyi anyagok átlagos IC_{50} értékét.

A teljes körű vizsgálat során a luminométerrel mért adatok begyűjtése és kiigazítása

38. A luminométer által szolgáltatott nyers adatokat át kell vezetni a vizsgálat céljára létrehozott táblázatsablonba. Meg kell határozni, hogy vannak-e a vizsgálatból kizárandó kiugró adatok. (Lásd az elemzés során meghatározott paraméterekre vonatkozó elfogadhatósági kritériumokat.) Az alábbi számításokat végzik el:

Agonista vizsgálat

1. lépés Számítsuk ki a DMSO VC átlagértékét.

2. lépés Az adatok normalizálásához a DMSO VC átlagértékét vonjuk ki az egyes lyukaknál kapott értékből.

3. lépés Számítsuk ki a referenciaszabvány (E2) átlagos indukciós faktorát.

4. lépés Számítsuk ki az E2 és a vizsgálati vegyi anyagok átlagos EC_{50} értékét.

5. lépés Számítsuk ki a metoxiklór átlagos kiigazított RLU-értékét.

Antagonista vizsgálat

1. lépés Számítsuk ki a DMSO VC átlagértékét.

2. lépés Az adatok normalizálásához a DMSO VC átlagértékét vonjuk ki az egyes lyukaknál kapott értékből.

3. lépés Számítsuk ki a referenciaszabvány (Ral/E2) átlagos indukciós faktorát.

4. lépés Számítsuk ki a Ral/E2 és a vizsgálati vegyi anyagok átlagos IC_{50} értékét.

5. lépés Számítsuk ki a tamoxifén átlagos kiigazított RLU-értékét.

6. lépés Számítsuk ki az E2 referenciaszabvány átlagértékét.

Az adatok értelmezésének kritériumai

39. A VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat célja, hogy egy bizonyítékok súlyozásán (WoE) alapuló megközelítés részeként segítsen rangsorolni az anyagokat az endokrin zavarokat mérő *in vivo* vizsgálatokhoz. E rangsorolási folyamat egyik lépése az, amikor a vizsgálati vegyi anyagokat ösztrogénreceptor agonista vagy ösztrogénreceptor antagonista aktivitás szempontjából pozitívként vagy negatívként azonosítják. Az 1. táblázat ismerteti azokat a döntési kritériumokat, amelyek alapján a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálási tanulmánya során pozitívnak vagy negatívnak minősítették az anyagokat.

1. táblázat

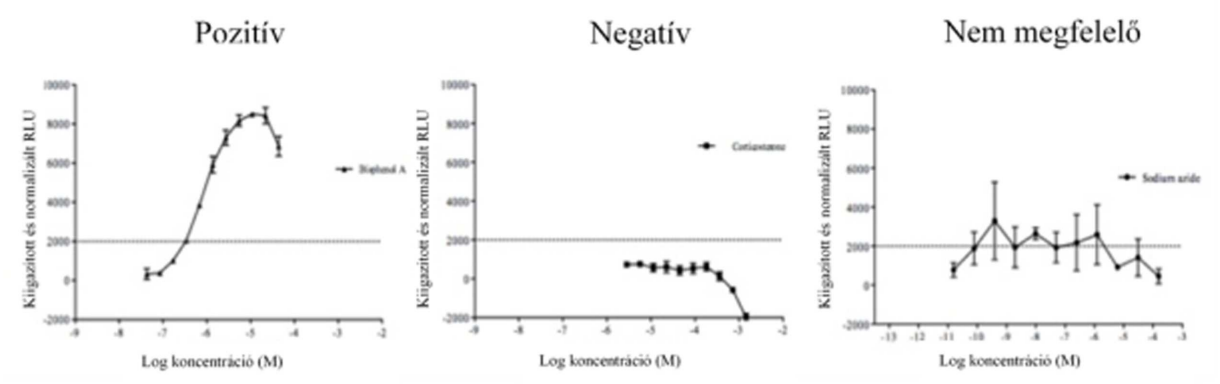
Pozitív és negatív döntési kritériumok

AGONISTA AKTIVITÁS	
Pozitív	— Az ösztrogénreceptor agonista aktivitás szempontjából *pozitívnak* minősített minden vizsgálati vegyi anyag koncentráció-válasz görbéjén lennie kell egy alapvonalnak, amelyet egy pozitív meredekség követ, amely egy platóban vagy csúcspontban zárul. Bizonyos esetekben e három jellemző közül csak kettő határozható meg (alapvonal-meredekség vagy meredekség-csúcspont). — A pozitív meredekséget meghatározó vonalnak legalább három olyan pontot kell tartalmaznia, amelyeknek a szórása nem fed át (átlag ± SD). Az alapvonalat alkotó pontok nem számítanak, de a görbe lineáris szakasza tartalmazhatja a csúcspontot vagy a plató első pontját. — A pozitív besoroláshoz szükséges továbbá, hogy a válasz amplitúdója (vagyis az alapvonal és a csúcspont közötti különbség) elérje legalább az E2 referenciaszabvány maximális értékének 20 %-át (vagyis legalább 2 000 RLU-t, amikor az [E2] referenciaszabvány kiigazított maximális válaszértéke 10 000 RLU). — Amennyiben megoldható, meg kell határozni minden pozitív vizsgálati vegyi anyag EC_{50} értékét.
Negatív	Egy adott koncentráció átlagos kiigazított RLU-értéke megegyezik azzal az értékkel, vagy alatta marad annak az értéknek, amely a DMSO-kontroll átlagos RLU-értéke plusz a DMSO RLU-értékétől való standard deviáció háromszorosa.
Nem megfelelő	Azok az adatok nem tekinthetők hitelesnek, amelyek jelentős kvalitatív vagy kvantitatív korlátok miatt az aktivitás meglétét vagy hiányát mutatják, és ezért nem megfelelőnek kell minősíteni azokat, és nem használhatók fel a vizsgálati vegyi anyag pozitívként vagy negatívként való besorolásához. Ilyenkor a vegyi anyagokat újbóli vizsgálatnak kell alávetni.
ANTAGONISTA AKTIVITÁS	
Pozitív	— A vizsgálati anyag adatai olyan koncentráció-válasz görbét rajzolnak ki, amelyik egy platóból induló negatív meredekség követ. — A negatív meredekséget meghatározó vonal legalább három pontot tartalmaz egymást nem fedő hibasávokkal; az alapvonalat alkotó pontok nem számítanak, de a görbe lineáris szakasza tartalmazhatja a plató első pontját. — A Ral/E2 referenciaszabvány maximális értékéhez képest legalább 20 %-ot kell csökkennie az aktivitásnak (vagyis legfeljebb 8 000 RLU lehet, amikor a [Ral/E2] referenciaszabvány kiigazított maximális válaszértéke 10 000 RLU). — A vizsgálati vegyi anyag legmagasabb nem toxikus koncentrációja legfeljebb 1×10^{-5} M lehet. — Amennyiben megoldható, meg kell határozni minden pozitív vizsgálati vegyi anyag IC_{50} értékét.
Negatív	Minden $1{,}0 \times 10^{-5}$ M-nél kisebb koncentrációnak megfelelő adatpont az EC_{80} érték felett helyezkedik el (ami megegyezik az E2 válasz 80 %-ával vagy 8 000 RLU-val).
Nem megfelelő	Azok az adatok nem tekinthetők hitelesnek, amelyek jelentős kvalitatív vagy kvantitatív korlátok miatt az aktivitás meglétét vagy hiányát mutatják, és ezért nem megfelelőnek kell minősíteni azokat, és nem használhatók fel a vizsgálati vegyi anyag pozitívként vagy negatívként való besorolásához. Ilyenkor a vegyi anyagot újbóli vizsgálatnak kell alávetni.

40. A pozitív eredményeket – ha lehetséges – jellemezni kell mind a kiváltott hatás mértékével, mind a hatást előidéző koncentrációval. A pozitív, negatív és nem megfelelő adatokra az 5. és a 6. ábra szolgáltat példákat.

5. ábra

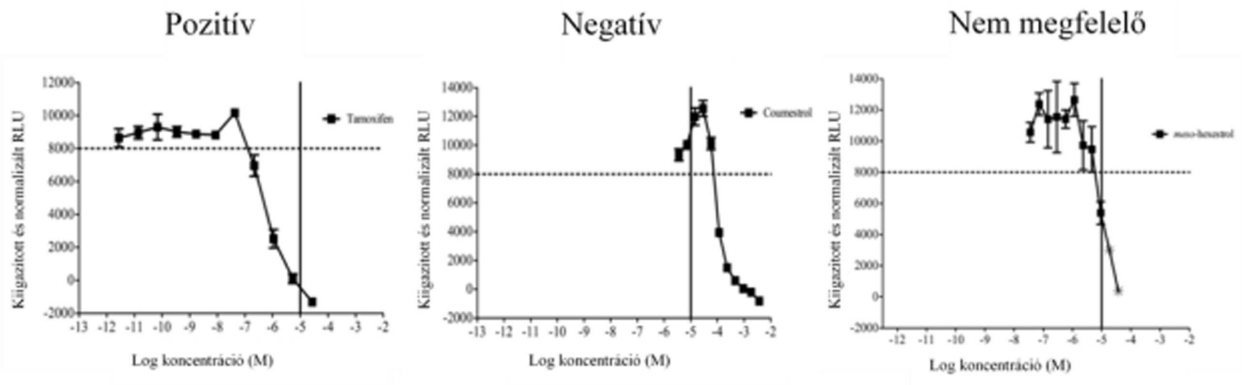
Agonista példák: pozitív, negatív és nem megfelelő adatok



A szaggatott vonal az E2 válasz 20 %-át jelzi, ami 2 000 kiigazított és normalizált RLU-nak felel meg.

6. ábra

Antagonista példák: pozitív, negatív és nem megfelelő adatok



A szaggatott vonal a Ral/E2 válasz 80 %-át jelzi, ami 8 000 kiigazított és normalizált RLU-nak felel meg.

Az egybefüggő vonal az 1,00 x 10^{-5} M koncentrációt jelzi. Ahhoz, hogy egy választ pozitívnak lehessen tekinteni, alatta kell maradnia a 8 000 RLU-t jelző vonalon, és a koncentrációja nem haladhatja meg az 1,00 x 10^{-5} M értéket.

A meso-hexestrol grafikonon csillaggal jelzett koncentrációk „2” vagy annál nagyobb életképességi pontszámot jeleznek.

A meso-hexestrol vizsgálat eredményei nem megfelelőnek tekintendők, mert az egyetlen 8 000 RLU alatti válasz 1,00 x 10^{-5} M koncentrációnál fordul elő.

41. Az EC_{50} és az IC_{50} érték kiszámítható a négy paraméteres Hill-féle funkcióanalízis alkalmazásával (részleteket lásd az agonista és az antagonista protokollban (7)). Az elfogadhatósági kritériumok teljesítése jelzi a rendszer megfelelő működését, de nem garantálja az egyes vizsgálatmenetek adatainak pontosságát. Az adatok pontosságát az biztosítja a legjobban, ha az első vizsgálatmenet eredményei megismételhetők (lásd „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZ-AKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” című 19. pontot).

VIZSGÁLATI JELENTÉS

42. Lásd „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” című 20. pontot.

SZAKIRODALOM

(1) ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, J. Cell Biochem., 82(3): 467-479.

(3) Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer Res., 58(23): 5 367-5 373.

(4) Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER) β, a Modulator of ERα in the Uterus, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(11): 936-5 941.

(5) Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), ALTEX, 23(Suppl): p. 270-273.

(6) Coecke S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, Alternatives to Laboratory Animals, 33: p. 261-287.

(7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7 850.

(8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In vitro* Mol. *Toxicol.*, 13(1):67-82.

(9) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. *Pharmacol.*, 71(10):1 459-69.

(10) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology,17(6):646-57.

(11) Kuiper G.G, *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, Endocrinology, 139(10):4 252-63.

(12) Geisinger, *et al*. (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(13) Baldwin, *et al*. (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(14) Li, Y., *et al*. (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(15) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors:development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenicand anti-estrogenic chemicals, *In vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

4. Függelék

A VEGYI ANYAGOK ÖSZTROGÉNHATÁSÚ AGONISTA ÉS ANTAGONISTA AKTIVITÁSÁNAK ERA CALUX SEJTVONALLAL TÖRTÉNŐ ÉSZLELÉSÉRE SZOLGÁLÓ, STABILAN TRANSZFEKTÁLT HUMÁN ÖSZTROGÉNRECEPTOR ALFA TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

1. Az ösztrogénreceptor α CALUX transzaktivációs vizsgálat humán U2OS sejtvonalat használ a humán ösztrogénreceptor alfa (hERα) által közvetített ösztrogénhatású agonista és antagonista aktivitás észlelésére. A stabil transzfekciós ERα CALUX biológiai vizsgálat validálási tanulmányát a BioDetection Systems BV (Amszterdam, Hollandia) végezte, amely tanulmány bizonyította, hogy a vizsgálat tervezett felhasználása tekintetében releváns és megbízható (1). Az ERα CALUX sejtvonal kizárólag stabilan transzfektált humán ERα-t fejez ki (2) (3).

2. A vizsgálat kifejezetten azt a célt szolgálja, hogy a bioluminescencia mint végpont mérése révén észlelje a hERα által közvetített transzaktivációt. A bioluminescenciát általánosan alkalmazzák a biológiai vizsgálatok során, a magas jel/háttér arány miatt (4).

3. Az 1 μM-nél magasabb fitoösztrogén-koncentrációnál a luciferáz riportergén túlzott aktiválásáról számoltak be, ami nem receptorok által közvetített lumineszcenciához vezet (5) (6) (7). Ezért az ennél magasabb fitoösztrogén-koncentrációértékeket vagy a luciferáz-kifejeződést túlzottan aktiváló más hasonló vegyületeket körültekintően kell vizsgálni a stabilan transzfektált ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálatok során (lásd a 2. függeléket).

4. E vizsgálat szabályozási célra való alkalmazása előtt el kell olvasni az „ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS” és „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” részt. A vizsgálati módszerben használt fogalmak és rövidítések meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

5. Ez a biológiai vizsgálat arra szolgál, hogy értékelje az ösztrogénreceptor ligandumhoz kötődését, és a receptor-ligandum komplex ezt követő transzlokációját a sejtmagba. A sejtmagban a receptor-ligandum komplex specifikus DNS válaszelemekhez kötődve transzaktivál egy szentjánosbogár luciferáz riportergént, ami megnöveli a luciferáz enzim celluláris kifejeződését. A luciferázhoz luciferin szubsztrátumot adagolnak, ezt követően a luciferin bioluminescens termékké alakul. A felszabaduló fény könnyen észlelhető, mennyisége luminométer segítségével meghatározható.

6. A vizsgálati rendszer stabilan transzfektált ERα CALUX sejteket alkalmaz. Az ERα CALUX sejtek a humán oszteoblasztás oszteoszarkóma U2OS sejtvonalból származnak. A humán U2OS sejteket a kalcium-foszfát transzfekciós módszerrel stabilan transzfektálták a 3xHRE-TATA-Luc és pSG5-neo-hERα konstrukciókkal. Az U2OS sejtvonal bizonyult a legjobb jelöltnek arra, hogy ösztrogén-reszponzív (és egyéb szteroidhormon-reszponzív) riporter sejtvonalként szolgáljon, ami azon a megfigyelésen alapul, hogy az U2OS sejtvonal csekély szintű endogén riporter aktivitást mutatott vagy egyáltalán nem mutatott endogén riporter aktivitást. Az endogén receptorok hiányát csak luciferáz riporter plazmidokkal mérték, amelyek a riporter ligandumok hozzáadását követően nem mutattak aktivitást. Emellett ez a sejtvonal erős hormon közvetítésű válaszokat adott hasonló receptorok tranziens transzfekciója esetén (2) (3) (8).

7. Amikor az ERα CALUX sejtvonallal vizsgálják a vegyi anyagok ösztrogénhatású vagy antiösztrogén-hatású aktivitását, szükség van elővizsgálatra és teljes körű vizsgálatmenetekre. Az elővizsgálat során állapítják meg a vizsgálati vegyi anyagok oldhatóságát, citotoxicitását és pontosított koncentrációtartományát a teljes körű vizsgálatokhoz. A teljes körű vizsgálatmenetekben az ERα CALUX biológiai vizsgálat során tesztelik a vizsgálati vegyi anyagok pontosított koncentrációtartományát, majd agonista vagy antagonista aktivitás szempontjából elvégzik besorolásukat.

8. Az adatok értelmezésének kritériumait részletesen a 59. pont ismerteti. Röviden: a vizsgálati vegyi anyag akkor tekinthető pozitív agonistának, ha az anyag legalább két egymást követő koncentrációértéke olyan választ ad, amely megegyezik a referenciaszabványként használt 17β-ösztradiol maximális válaszának 10 %-ával (PC_{10}), illetve meghaladja azt. A vizsgálati vegyi anyag akkor minősíthető pozitív antagonistának, ha az anyag legalább két egymást követő koncentrációértéke olyan választ ad, amely megegyezik a referenciaszabványként használt tamoxifén maximális válaszának 80 %-ával (PC_{80}), illetve alacsonyabb annál.

ELJÁRÁS

Sejtvonalak

9. A vizsgálathoz stabilan transzfektált U2OS ERα CALUX sejtvonalat kell használni. A sejtvonal szakmai licencszerződés birtokában szerezhető be a BioDetection Systems BV vállalattól (Amszterdam, Hollandia).

10. Csak mikoplazmamentes sejtkultúrák használhatók. A felhasznált sejttételeknek vagy igazoltan mikoplazmafertőzésmentesnek kell lenniük, vagy használat előtt el kell végezni rajtuk egy mikoplazma vizsgálatot. A mikoplazmafertőzés detektálására az RT-PCR (valós idejű polimeráz láncreakció) alkalmazandó (9).

A sejtvonal stabilitása

11. A CALUX sejtek stabilitásának és integritásának megőrzése érdekében a sejteket folyékony nitrogénben (-80 ^{0}C-on) kell tárolni. Miután felolvasztották a sejteket, hogy új tenyészetet hozzanak létre, a sejteket legalább kétszer át kell ültetni, mielőtt felhasználnák azokat vegyi anyagok ösztrogénhatású agonista és antagonista aktivitásának értékelésére. A sejteket legfeljebb 30 alkalommal szabad passzálni.

12. Annak nyomon követése érdekében, hogy a sejtvonal az idő múlásával is megőrzi stabilitását, a referenciaszabvány EC_{50} vagy IC_{50} értékének mérésével ellenőrizni kell az agonista és antagonista vizsgálati rendszer válaszadási képességét. Emellett ellenőrizni kell a pozitív kontrollminta (PC) és a negatív kontrollminta (NC) relatív indukciós képességét. Az eredményeknek meg kell felelniük az ERα CALUX biológiai vizsgálat agonista (3C táblázat) vagy antagonista (4C táblázat) tesztjére vonatkozó elfogadhatósági kritériumoknak. Az agonista, illetve az antagonista vizsgálat referenciaszabványát, pozitív és negatív kontrollanyagát az 1. táblázat, illetve a 2. táblázat ismerteti.

Sejttenyésztés és a leültetés körülményei

13. Az U2OS sejteket pH-indikátor fenolvöröst tartalmazó, továbbá magzati borjú szérummal (7,5 %), nem esszenciális aminosavakkal (1 %), 10 egység/ml penicillinnel és sztreptomicinnel, valamint szelekciós markerként szolgáló geneticinnel (G-418) kiegészített tápoldatban (DMEM/F12 (1: 1)) kell tenyészteni. A sejteket 5 %-os CO_2-tartalmú inkubátorba kell helyezni, 37° C-os hőmérséklet és 100 %-os páratartalom biztosítása mellett. 85–95 %-os konfluencia elérését követően a sejteket vagy tovább kell oltani, vagy elő kell készíteni a 96 lyukú mikrotiterlemezekbe történő leoltáshoz. Ez utóbbi esetben a sejteket egy ösztrogénmentes DMEM/F12 (1: 1) tápoldatban 1 x 10^5 sejt/ml sűrűségben felszuszpendálják és a homogenizált sejtszuszpenziót 100 µl-ként kiszélesztik a 96 lyukú mikrotiterlemezek lyukaiba, a tápoldat itt fenolvörösmentes, tartalmaz 5 térfogatszázalék dextránbevonatú aktív szénnel kezelt magzati borjú szérumot, 1 térfogatszázalék nem esszenciális aminosavakat és 10 egység/ml penicillin és sztreptomicint). A kezelést megelőzően a sejteket CO_2 inkubátorban (5 % CO_2, 37 ^{0}C, 100 % páratartalom) 24 órán keresztül preinkubálni kell. A műanyag edények legyenek ösztrogénmentesek.

Elfogadhatósági kritériumok

14. A vizsgálati vegyi anyag(ok) agonista és antagonista aktivitását egy vizsgálatsorozaton keresztül mérik fel. Egy vizsgálatsorozat legfeljebb 6 mikrotiterlemezből áll. Minden vizsgálatsorozat magában foglalja a referenciaszabvány egy teljes oldatsorozatát, egy pozitív kontrollmintát, egy negatív kontrollmintát és az oldószeres kontrollokat. Az 1. és a 2. ábra ismerteti az agonista és az antagonista vizsgálatsorozatokhoz használt lemez elrendezését.

15. A referenciaszabványok, a vizsgálati vegyi anyagok, az oldószeres kontrollanyagok, valamint a pozitív és negatív kontrollanyagok minden egyes oldatát triplikátumban kell vizsgálni. Mindhárom ismétlés eredményeinek meg kell felelniük a 3A és 4A táblázatban szereplő követelményeknek.

16. Minden vizsgálatsorozat első lemezén megmérik a referenciaszabvány (agonista vizsgálat esetén a 17β-ösztradiol; antagonista vizsgálat esetén a tamoxifén) teljes oldatsorozatát. Annak érdekében, hogy a másik 5 mikrotiterlemez elemzésének eredményeit össze lehessen vetni a referenciaszabvány teljes koncentráció-válasz görbéjét tartalmazó első mikrotiterlemezzel, minden lemeznek 3 kontrollmintát kell tartalmaznia: az oldószeres kontrollt, a vizsgált referenciaszabvány legmagasabb koncentrációját és a referenciaszabvány körülbelüli EC_{50} (agonista) vagy IC_{50} (antagonista) koncentrációját. Az első lemez és a másik 5 lemez kontrollmintái átlagának aránya meg kell feleljen a 3C táblázatban (agonista vizsgálat) vagy a 4C táblázatban (antagonista vizsgálat) feltüntetett követelményeknek.

17. Meg kell határozni a vizsgálatsorozatán belüli egyes mikrotiterlemezek z-tényezőjét (10). A z-tényezőt a referenciaszabvány legmagasabb és legalacsonyabb koncentrációjánál kapott válasz alapján kell kiszámítani. A mikrotiterlemezek eredményei akkor tekinthetők hitelesnek, ha eleget tesznek a 3C táblázatban (agonista vizsgálat) vagy a 4C táblázatban (antagonista vizsgálat) feltüntetett követelményeknek.

18. A referenciaszabványnak szigmoid formájú dózis-válasz görbét kell eredményeznie. A referenciaszabvány oldatsorozatának válaszai alapján meghatározott EC_{50} vagy IC_{50} értéknek meg kell felelnie a 3C táblázatban (agonista vizsgálat) vagy a 4C táblázatban (antagonista vizsgálat) szereplő követelményeknek.

19. Minden vizsgálatsorozatnak tartalmaznia kell egy pozitív és egy negatív kontrollmintát. Mind a pozitív, mind a negatív kontrollminta kalkulált relatív indukciós hatásának eleget kell tennie a 3C táblázatban (agonista vizsgálat) vagy a 4C táblázatban (antagonista vizsgálat) feltüntetett követelményeknek.

20. A referenciaszabvány legmagasabb koncentrációjának indukciós faktorát minden mérés során úgy határozzák meg, hogy elosztják a 17β-ösztradiol referenciaszabvány átlagos legmagasabb relatív fényegység (RLU) válaszát a referencia oldószerrel végzett kontroll átlagos RLU-válaszával. Az indukciós faktornak eleget kell tennie a 3C táblázatban (agonista vizsgálat) vagy a 4C táblázatban (antagonista vizsgálat) feltüntetett, indukciós faktorra vonatkozó követelményeknek.

21. Kizárólag a fenti elfogadhatósági kritériumoknak megfelelő mikrotiterlemezek tekinthetők hitelesnek, és használhatók fel a vizsgálati vegyi anyagok által adott válasz értékelésére.

22. Az elfogadhatósági kritériumok egyaránt vonatkoznak az elővizsgálatra és a teljes körű vizsgálatmenetekre.

1. táblázat

Az agonista CALUX biológiai vizsgálathoz használt referenciaszabvány, pozitív kontrollanyag (PC) és negatív kontrollanyag (NC) koncentrációi

	Anyag	CAS-szám	Vizsgálati tartomány (M)
Referenciaszabvány	17β-ösztradiol	50-28-2	$1*10^{-13}$–$1*10^{-10}$
Pozitív kontroll (PC)	17α-metiltesztoszteron	58-18-4	$3*10^{-6}$
Negatív kontroll (NC)	kortikoszteron	50-22-6	$1*10^{-8}$

2. táblázat

Az antagonista CALUX biológiai vizsgálathoz használt referenciaszabvány, pozitív kontrollanyag (PC) és negatív kontrollanyag (NC) koncentrációi

	Anyag	CAS-szám	Vizsgálati tartomány (M)
Referenciaszabvány	tamoxifén	10540-29-1	$3*10^{-9}$–$1*10^{-5}$
Pozitív kontroll (PC)	4-hidroxitamoxifén	68047-06-3	$1*10^{-9}$
Negatív kontroll (NC)	rezveratrol	501-36-0	$1*10^{-5}$

3. táblázat

Az agonista ERα CALUX biológiai vizsgálat elfogadhatósági kritériumai

A – egy lemezen lévő egyes minták		**Kritérium**
1	A három ismétlésben vizsgált lyukak maximális SD-ja %-ban (a NC, a PC, a vizsgálati vegyi anyag és a referenciaszabvány minden oldata tekintetében, kivéve C0)	< 15 %
2	A három ismétlésben vizsgált lyukak maximális SD-ja %-ban (a referenciaszabvány és a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrolljai tekintetében (C0, SC))	< 30 %
3	Az LDH maximális csökkenése, ami a citotoxicitás mérőszáma.	< 120 %
B – egy mikrotiterlemezen belül		
4	A referenciaszabvány oldószeres kontrolljának (C0; 1. lemez) és a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrolljának (SC; 2–x. lemez) aránya	0,5–2,0
5	A kb. EC_{50} és a referenciaszabvány legmagasabb koncentrációjának aránya az 1. lemezen, valamint a kb. EC_{50} és a referenciaszabvány legmagasabb koncentrációjának aránya a 2–x. lemezen (C4, C8)	0,70–1,30
6	Az egyes lemezek z-tényezője	> 0,6
C – egy analízissorozaton belül (egy sorozat összes lemeze)		
7	A referenciaszabvány görbéje szigmoid formájú	Igen (17ß-ösztradiol)
8	A 17ß-ösztradiol referenciaszabvány EC_{50} tartománya	$4*10^{-12}$–$4*10^{-11}$ M
9	A legmagasabb 17β-ösztradiol koncentráció minimális indukciós faktora, a referenciaszabvány oldószeres kontrolljához képest.	5
10	PC relatív indukciója (%)	> 30 %
11	NC relatív indukciója (%)	< 10 %

Kb.: körülbelüli; PC: pozitív kontroll; NC: negatív kontroll; SC: a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrollja; C0: a referenciaszabvány oldószeres kontrollja; SD: standard deviáció; LDH: laktát-dehidrogenáz.

4. táblázat

Az antagonista ERα CALUX biológiai vizsgálat elfogadhatósági kritériumai

A – egy lemezen lévő egyes minták		**Kritérium**
1	A három ismétlésben vizsgált lyukak maximális SD-ja %-ban (az NC, a PC, a vizsgálati vegyi anyag és a referenciaszabvány minden oldata, valamint az oldószeres kontroll (C0) tekintetében)	< 15 %
2	A három ismétlésben vizsgált lyukak maximális SD-ja %-ban (a vivőanyag kontroll (VC) és a referenciaszabvány legmagasabb koncentrációja (C8) tekintetében)	< 30 %
3	Az LDH maximális csökkenése, ami a citotoxicitás mérőszáma.	< 120 %
B – egy mikrotiterlemezen belül		
4	A referenciaszabvány oldószeres kontrolljának (C0; 1. lemez) és a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrolljának (SC; 2–x. lemez) aránya	0,70–1,30
5	Az 1. lemez referenciaszabvány-koncentrációinak kb. IC_{50} értékének és a 2–x. lemez referenciaszabvány-koncentrációinak kb. IC_{50} értékének (C4) aránya	0,70–1,30
6	Az 1. lemez legmagasabb referenciaszabvány-koncentrációinak és a 2–x. lemez legmagasabb referenciaszabvány-koncentrációinak (C8) aránya	0,50–2,0
7	Az egyes lemezek z-tényezője	> 0,6
C – egy analízissorozaton belül (egy sorozat összes lemeze)		
8	A referenciaszabvány görbéje szigmoid formájú	Igen (tamoxifén)
9	A referenciaszabvány (tamoxifén) IC_{50} tartománya	$1*10^{-8}$–$1*10^{-7}$ M
10	A referenciaszabvány oldószeres kontrolljának minimális indukciós faktora, a tamoxifén legmagasabb koncentrációjához képest.	2,5
11	PC relatív indukciója (%)	< 70 %
12	NC relatív indukciója (%)	> 85 %

Kb.: körülbelüli; PC: pozitív kontroll; NC: negatív kontroll; VC: vivőanyagos kontroll (az agonista referenciaszabvány fix koncentrációja nélküli oldószeres kontroll); SC: a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrollja; C0: a referenciaszabvány oldószeres kontrollja; SD: standard deviáció; LDH: laktát-dehidrogenáz.

Oldószeres/vivőanyagos kontroll, referenciaszabványok, pozitív kontrollok, negatív kontrollok

23. Mind az elővizsgálatban, mind a teljes körű vizsgálatmenetekben ugyanazt a kontrollként szolgáló oldószert/vivőanyagot, referenciaszabványokat, pozitív és negatív kontrollanyagokat kell használni. Emellett változatlanul kell hagyni a referenciaszabványok, pozitív és negatív kontrollanyagok koncentrációértékeit is.

Oldószeres kontroll

24. A vizsgálati vegyi anyagok feloldására használt oldószert oldószeres kontroll keretében vizsgálni kell. Az ERα CALUX biológiai vizsgálat validálása során vivőanyagként dimetil-szulfoxidot alkalmaztak (DMSO, 1 térfogatszázalékban, CAS-száma: 67-68-5). DMSO-tól eltérő oldószer használata esetén valamennyi referenciaszabványt, kontrollanyagot és vizsgálati vegyi anyagot ugyanabban a vivőanyagban kell tesztelni. Az antagonista tanulmányok oldószeres kontrollja fix koncentrációban (körülbelül EC_{50} koncentrációban) tartalmazza az agonista referenciaszabványt, a 17β-ösztradiolt. Az antagonista tanulmányokhoz használt oldószer teszteléséhez vivőanyagos kontrollt kell készíteni és tesztelni.

Vivőanyagos kontroll (antagonista vizsgálat)

25. Az antagonista hatás vizsgálatához a vizsgálati tápoldatot az agonista referenciaszabvány, a 17β-ösztradiol fix koncentrációjával (körülbelül EC_{50} koncentrációval) egészítik ki. Az antagonista hatásuk felmérése céljából vizsgált vizsgálati vegyi anyagok feloldásához alkalmazott oldószer teszteléséhez az agonista referenciaszabványként használt 17β-ösztradiol fix koncentrációjától mentes vizsgálati közeget kell készíteni. Ez a kontrollminta az úgynevezett vivőanyagos kontroll. Az ERα CALUX biológiai vizsgálat validálása során vivőanyagként dimetil-szulfoxidot alkalmaztak (DMSO, 1 térfogatszázalékban, CAS-száma: 67-68-5). DMSO-tól eltérő oldószer használata esetén valamennyi referenciaszabványt, kontrollanyagot és vizsgálati vegyi anyagot ugyanabban a vivőanyagban kell tesztelni.

Referenciaszabványok

26. Az agonista referenciaszabvány a 17β-ösztradiol (1. táblázat). A referenciaszabványok a 17β-ösztradiol nyolc koncentrációjából álló oldatsorozatot foglalnak magunkban ($1*10^{-13}$, $3*10^{-13}$, $1*10^{-12}$, $3*10^{-12}$, $6*10^{-12}$, $1*10^{-11}$, $3*10^{-11}$, $1*10^{-10}$ M).

27. Az antagonista referenciaszabvány a tamoxifén (2. táblázat). A referenciaszabványok egy, a tamoxifén nyolc koncentrációjából álló oldatsorozatot foglalnak magunkban ($3*10^{-9}$, $1*10^{-8}$, $3*10^{-8}$, $1*10^{-7}$, $3*10^{-7}$, $1*10^{-6}$, $3*10^{-6}$, $1*10^{-5}$ M). Az antagonista referenciaszabvány minden egyes koncentrációját együtt inkubálják az agonista referenciaszabványként szolgáló 17β-ösztradiol fix koncentrációjával ($3*10^{-12}$ M).

Pozitív kontroll

28. Az agonista tanulmányok pozitív kontrollanyaga a 17α-metiltesztoszteron (1. táblázat).

29. Az antagonista tanulmányok pozitív kontrollanyaga a 4-hidroxitamoxifén (2. táblázat). Az antagonista pozitív kontrollanyagot együtt inkubálják az agonista referenciaszabványként szolgáló 17β-ösztradiol fix koncentrációjával ($3*10^{-12}$ M).

Negatív kontroll

30. Az agonista tanulmányok negatív kontrollanyaga a kortikoszteron (1. táblázat).

31. Az antagonista tanulmányok negatív kontrollanyaga a rezveratrol (2. táblázat). Az antagonista negatív kontrollanyagot együtt inkubálják az agonista referenciaszabványként szolgáló 17β-ösztradiol fix koncentrációjával ($3*10^{-12}$ M).

A laboratórium jártasságának igazolása (lásd a vizsgálati módszer „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI" részének 14. pontját, valamint 3. és 4. táblázatát).

Vivőanyag

32. A vizsgálati vegyi anyagok feloldásához olyan oldószert kell használni, amelyik teljesen szolubilizálja a vizsgálati vegyi anyagot és elegyedik a sejtek tápoldatával. A megfelelő oldószerek közé tartozik a DMSO, a víz és az etanol (95–100 %-os tisztaságban). Amennyiben DMSO-t használnak oldószerként, az inkubálás alatt a DMSO maximális koncentrációja nem haladhatja meg az 1 térfogatszázalékot. Az oldószert alkalmazása előtt tesztelni kell, hogy nem okoz-e citotoxicitást, és nem zavarja-e a vizsgálatok teljesítményét.

A referenciaszabványok, a pozitív és negatív kontrollanyagok, valamint a vizsgálati vegyi anyagok előkészítése

33. A referenciaszabványokat, a pozitív és negatív kontrollanyagokat, valamint a vizsgálati vegyi anyagokat 100 %-os DMSO-ban (vagy más megfelelő oldószerben) kell feloldani. A megfelelő oldatokat (oldatsorozatot) ugyanabban az oldószerben kell elkészíteni. Feloldás előtt meg kell várni, hogy minden anyag szobahőmérsékletű legyen. A referenciaszabványok, a pozitív és negatív kontrollanyagok, valamint a vizsgálati vegyi anyagok frissen készített törzsoldataiban nem lehet szemmel látható kicsapódás és az oldatok nem lehet zavarosak. A referenciaszabványok és kontrollanyagok nagy tételben is előkészíthetők. A vizsgálati vegyi anyagok törzsoldatait minden kísérlet előtt frissen kell elkészíteni. A referenciaszabványok, a pozitív és negatív kontrollanyagok, valamint a vizsgálati vegyi anyagok végső oldatait minden egyes kísérlethez frissen kell készíteni, és az elkészítéstől számított 24 órán belül fel kell használni.

Oldhatóság, citotoxicitás és dózisbehatárolás

34. Az elővizsgálat során meghatározzák a vizsgálati vegyi anyagok választott oldószerben való oldhatóságát. Elkészítik a maximális, 0,1 M törzsoldat-koncentrációt. Amennyiben ennél a koncentrációnál oldhatósági problémák jelentkeznek, alacsonyabb koncentrációjú törzsoldatokat kell készíteni mindaddig, amíg a vizsgálati vegyi anyagok teljesen oldhatónak nem bizonyulnak. Az elővizsgálat során a vizsgálati vegyi anyagok 1: 10 arányú oldatsorozatát tesztelik. Az agonista és antagonista vizsgálat maximális vizsgált koncentrációja az 1 mM. Az elővizsgálat megfelelően pontosítja a vizsgálati vegyi anyagok koncentrációtartományát, a teljes körű vizsgálatmenetek során ezt a tartományt kell vizsgálni. A teljes körű vizsgálat során a következő hígítási arányokat kell alkalmazni: 1x-es, 3x-os, 10x-es, 30x-os, 100x-os, 300x-os, 1000x-es és 3000x-es.

35. A citotoxicitás vizsgálata egyaránt része az agonista és az antagonista vizsgálati protokollnak (11). Mind az elővizsgálat, mind a teljes körű vizsgálatmenetek tartalmaznak citotoxicitási vizsgálatot. Az ERα CALUX biológiai vizsgálat validálása során a citotoxicitás felmérésére a laktát-dehidrogenáz (LDH) szivárgását vizsgáló tesztet használták, és emellett kvalitatív vizuális módszerrel (lásd a 4.1. függeléket) megfigyelték a vizsgálati vegyi anyagokkal kezelt sejteket. Ugyanakkor a citotoxicitás meghatározásához használhatók más kvantitatív módszerek is (pl. a tetrazólium alapú kolorimetriás (MTT) vizsgálat vagy a CALUX citotoxicitási biológiai vizsgálat). Általában véve a vizsgálati vegyi anyagok azon koncentrációi, amelyek a sejtéletképesség több mint 20 %-os visszaesését okozzák, citotoxikusnak tekintendők, így az adatok értékeléséhez nem használhatók. Az LDH szivárgását vizsgáló teszt esetében a vizsgálati vegyi anyag koncentrációja akkor minősül citotoxikusnak, ha az LDH-szivárgás aránya meghaladja a 120 %-ot.

Vegyi anyaggal történő kezelés és a vizsgálati lemez elrendezése

36. A megfelelő sűrűséget elérő sejtkultúra sejtjeit tripszin hozzáadással elválasztják a sejttenyésztő edény aljától, majd a sejteket ösztrogénmentes vizsgálati tápoldatban 1 x 10^5 sejt/ml sűrűségre állítják be. Az újraszuszpendált sejteket 100 µl mennyiségben kiszélesztik a 96 lyukú mikrotiterlemez belső lyukaiba. A lemezen a szélső sorok lyukait 200 µl foszfátpuffert tartalmazó sóoldattal (PBS) töltik meg (lásd az 1. és 2. ábrát). A leültetett sejteket 24 órán keresztül CO_2 inkubátorban preinkubálják (5 % CO_2, 37 °C, 100 % páratartalom mellett).

37. A preinkubációt követően a lemezeken megfigyelik a citotoxicitás (lásd a 4.1. függeléket), a fertőzés és a konfluencia szabad szemmel látható jeleit. A vizsgálathoz kizárólag olyan lemezek használhatók fel, amelyeken nem látható citotoxicitás és fertőzés, a konfluencia mértéke pedig eléri a 85 %-ot. A belső lyukakban lévő sejtekről óvatosan lecserélik a tápoldatot, és 200 µl ösztrogénmentes vizsgálati tápoldattal töltik fel, amely tartalmazza a referenciaszabványok, a vizsgálati vegyi anyagok, a pozitív és negatív kontrollanyagok és az oldószerek megfelelő oldatsorozatát (5. táblázat: agonista tanulmányok; 6. táblázat: antagonista tanulmányok). A referenciaszabványokat, a vizsgálati

vegyi anyagokat, a pozitív és a negatív kontrollanyagokat, valamint az oldószereket három ismétlésben kell vizsgálni. Az 1. ábra ismerteti az agonista vizsgálati lemez elrendezését. A 2. ábra ismerteti az antagonista vizsgálati lemez elrendezését. Az elővizsgálathoz és a teljes körű vizsgálathoz alkalmazott lemezek elrendezése azonos. Az antagonista vizsgálat során minden belső lyuk – a vivőanyagot (VC) tartalmazó lyukakat kivéve – tartalmazza az agonista referenciaszabványként szolgáló 17β-ösztradiol fix koncentrációját is ($3*10^{-12}$ M). C8-as és C4-es koncentrációjú referenciaszabványnak szerepelnie kell minden vizsgálati vegyi anyagot tesztelő lemezen.

38. Miután minden vegyi anyaggal kezelték a sejteket, a 96 lyukú mikrotiterlemezeket ismét 24 órán keresztül CO_2 inkubátorban inkubálják (5 % CO_2, 37 °C, 100 % páratartalom mellett).

1. ábra

A 96 lyukú mikrotiterlemezek elrendezése agonista hatás elővizsgálathoz és értékeléséhez

1. lemez

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NK	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NK	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NK	
H												

Többi lemez

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC_{50})	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC_{50})	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC_{50})	
H												

C0 = a referenciaszabvány oldószere.

C(1–8) = a referenciaszabvány oldatsorozata (1–8, az alacsonytól a magas koncentráció felé).

PC = pozitív kontroll.

NK = negatív kontroll.

TCx-(1–8) = vizsgálati vegyi anyag oldatai (1–8, az alacsonytól a magas koncentráció felé) az x. vizsgálati vegyi anyag elővizsgálatához és agonista hatásának felméréséhez.

SC = a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrollja (optimális esetben azonos a C0-val, de lehetőleg másik tételből származzon).

Szürke cellák: = szélső lyukak, 200 µl PBS-sel feltöltve.

2. ábra

A 96 lyukú mikrotiterlemezek elrendezése antagonista hatás elővizsgálathoz és értékeléséhez

1. lemez

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NK	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F		NK	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
G		NK	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H												

Többi lemez

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		C4 (IC_{50})	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (IC_{50})	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (IC_{50})	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

C0 = a referenciaszabvány oldószere.

C(1–8) = a referenciaszabvány oldatsorozata (1–8, az alacsonytól a magas koncentráció felé).

NK = negatív kontroll.

PC = pozitív kontroll.

TCx-(1–8) = vizsgálati vegyi anyag oldatai (1–8, az alacsonytól a magas koncentráció felé) az x. vizsgálati vegyi anyag elővizsgálatához és agonista hatásának felméréséhez.

SC = a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrollja (optimális esetben azonos a C0-val, de lehetőleg másik tételből származzon).

VC = vivőanyagos kontroll (oldószeres kontroll, az agonista referenciaszabvány, a 17β-ösztradiol fix koncentrációja nélkül).

Szürke cellák: = szélső lyukak, 200 µl PBS-sel feltöltve.

Megjegyzés: minden belső lyuk – a vivőanyagot (VC) tartalmazó lyukakat kivéve – magában foglalja az agonista referenciaszabványként szolgáló 17β-ösztradiol fix koncentrációját is ($3{,}0*10^{-12}$ M).

A lumineszcencia mérése

39. A lumineszcencia mérésének részletes leírása megtalálható az agonista és az antagonista vizsgálati protokollban (10). A lyukakban lévő tápoldatot el kell távolítani, majd a sejteket 24 órás inkubálást követően lizálni kell, hogy feltárják a sejtmembránt, és mérhetővé váljon a luciferáz-aktivitás.

40. A lumineszcencia méréséhez ebben az eljárásban 2 injektorral felszerelt luminométert kell használni. A luciferáz reakció megkezdéséhez beinjektálják a luciferin szubsztrátot. A reakciót 0,2 M NaOH hozzáadásával állítják le. A reakciót azért kell leállítani, hogy ne terjedjen át a lumineszcencia az egyik lyukból a másikba.

41. Az egyes lyukak által kibocsátott fényt lyukankénti relatív fényegységekben (RLU-ban) fejezik ki.

Elővizsgálat

42. Az elővizsgálat elemzésének eredményei alapján határozzák meg a vizsgálati vegyi anyagok teljes körű vizsgálatban alkalmazandó pontosított koncentrációtartományát. Az elővizsgálat eredményeinek értékeléséről és a vizsgálati vegyi anyagok teljes körű vizsgálatban alkalmazandó pontosított koncentrációtartományáról az agonista és az antagonista vizsgálati protokoll nyújt részletes tájékoztatást (10). Az alábbiak csak röviden összefoglalják azt az eljárást, amelynek alapján meghatározható az agonista és az antagonista vizsgálatban használt vizsgálati vegyi anyagok koncentrációtartománya. Az oldatsorozat elemeinek meghatározásához az 5. és a 6. táblázat nyújt iránymutatást.

Az agonista hatások felmérésére szolgáló koncentrációértékek kiválasztása

43. Az elővizsgálat során a vizsgálati vegyi anyagokat az 5. táblázatban (agonista vizsgálat) és a 6. táblázatban (antagonista vizsgálat) jelzett oldatsorozatban kell vizsgálni. Minden koncentrációértéket három-három lyukban kell vizsgálni, az 1. ábrán (agonista vizsgálat) és a 2. ábrán (antagonista vizsgálat) szereplő lemezelrendezésben.

44. Kizárólag az analízis elfogadhatósági kritériumoknak (3. táblázat) megfelelő eredményei tekinthetők hitelesnek, és használhatók fel a vizsgálati vegyi anyagok válaszának értékelésére. Amennyiben az elemzéssorozat egy vagy több mikrotiterlemeze nem felel meg az elfogadhatósági kritériumoknak, az adott mikrotiterlemezeket újbóli elemzésnek kell alávetni. Ha a referenciaszabvány teljes sorozatát tartalmazó első lemez nem teljesíti az elfogadhatósági kritériumokat, ismételten el kell végezni az egész vizsgálatsorozat (mind a 6 lemez) elemzését.

45. A vizsgálati vegyi anyagok kezdeti koncentrációtartományait ki kell igazítani és az elővizsgálatot meg kell ismételni, ha:

— citotoxicitást figyeltek meg. Ilyenkor az elővizsgálatot a vizsgálati vegyi anyag alacsonyabb, nem citotoxikus koncentrációival kell megismételni;

— a vizsgálati vegyi anyag elővizsgálata nem biztosított teljes dózis-válasz görbét, mert a vizsgált koncentrációértékek maximális indukciót idéztek elő. Ilyenkor az elővizsgálatot a vizsgálati vegyi anyag alacsonyabb koncentrációival kell megismételni.

46. Érvényes dózisfüggő válasz esetén azt a (legalacsonyabb) koncentrációt kell kiválasztani, amely maximális indukciót hoz létre, ugyanakkor nem okoz citotoxicitást. A vizsgálati vegyi anyag teljes körű vizsgálatmenetekben tesztelendő legnagyobb koncentrációja e kiválasztott koncentráció háromszorosa legyen.

47. A vizsgálati vegyi anyag pontosított teljes oldatsorozatát az 5. táblázatban szereplő hígítási lépések szerint kell elkészíteni, kiindulva a fenti eljárás alapján meghatározott legnagyobb koncentrációtól.

48. Azokat a vizsgálati vegyi anyagokat, amelyek nem váltanak ki agonista hatást, az elővizsgálat során azonosított legnagyobb nem toxikus koncentrációtól kezdve kell vizsgálni a teljes körű vizsgálatban.

Az antagonista hatások felmérésére szolgáló koncentrációértékek kiválasztása

49. Kizárólag az analízis elfogadhatósági kritériumoknak (4. táblázat) megfelelő eredményei tekinthetők hitelesnek, és használhatók fel a vizsgálati vegyi anyagok válaszának értékelésére. Amennyiben az elemzéssorozat egy vagy több mikrotiterlemeze nem felel meg az elfogadhatósági kritériumoknak, az adott mikrotiterlemezeket újbóli elemzésnek kell alávetni. Ha a referenciaszabvány teljes sorozatát tartalmazó első lemez nem teljesíti az elfogadhatósági kritériumokat, ismételten el kell végezni az egész vizsgálatsorozat (mind a 6 lemez) elemzését.

50. A vizsgálati vegyi anyagok kezdeti koncentrációtartományait ki kell igazítani és az elővizsgálatot meg kell ismételni, ha:

— citotoxicitást figyeltek meg. Ilyenkor az elővizsgálatot a vizsgálati vegyi anyag alacsonyabb, nem citotoxikus koncentrációival kell megismételni;

— a vizsgálati vegyi anyag elővizsgálata nem biztosított teljes dózis-válasz görbét, mert a vizsgált koncentrációértékek maximális gátlást idéztek elő. Ilyenkor az elővizsgálatot a vizsgálati vegyi anyag alacsonyabb koncentrációival kell megismételni.

51. Érvényes dózisfüggő válasz esetén azt a (legalacsonyabb) koncentrációt kell kiválasztani, amely maximális gátlást hoz létre, ugyanakkor nem okoz citotoxicitást. A vizsgálati vegyi anyag teljes körű vizsgálatmenetekben tesztelendő legnagyobb koncentrációja e kiválasztott koncentráció háromszorosa legyen.

52. A vizsgálati vegyi anyag pontosított teljes oldatsorozatát a 6. táblázatban szereplő hígítási lépések szerint kell elkészíteni, kiindulva a fenti eljárás alapján meghatározott legnagyobb koncentrációtól.

53. Azokat a vizsgálati vegyi anyagokat, amelyek nem váltanak ki antagonista hatást, az elővizsgálat során tesztelt legnagyobb nem toxikus koncentrációtól kezdve kell vizsgálni a teljes körű vizsgálatban.

Teljes körű vizsgálatmenetek

54. A pontosított koncentrációtartományok meghatározását követően a teljes körű vizsgálatmenetek során a vizsgálati vegyi anyagokat az 5. táblázatban (agonista vizsgálat) és a 6. táblázatban (antagonista vizsgálat) jelzett oldatsorozatban kell vizsgálni. Minden koncentrációértéket három-három lyukban kell vizsgálni, az 1. ábrán (agonista vizsgálat) és a 2. ábrán (antagonista vizsgálat) szereplő lemezelrendezésben.

55. Kizárólag az analízis elfogadhatósági kritériumoknak (3. és 4. táblázat) megfelelő eredményei tekinthetők hitelesnek, és használhatók fel a vizsgálati vegyi anyagok válaszának értékelésére. Amennyiben az elemzéssorozat egy vagy több mikrotiterlemeze nem felel meg az elfogadhatósági kritériumoknak, az adott mikrotiterlemezeket újbóli elemzésnek kell alávetni. Ha a referenciaszabvány teljes sorozatát tartalmazó első lemez nem teljesíti az elfogadhatósági kritériumokat, ismételten el kell végezni az egész vizsgálatsorozat (mind a 6 lemez) elemzését.

5. táblázat

Az agonista vizsgálathoz használt referenciaanyagok, kontrollanyagok és vizsgálati vegyi anyagok koncentrációi és oldatai

Referencia 17β-ösztradiol		TCx – elővizsgálat		TCx – teljes körű vizsgálat-menet		Kontrollok	
konc. (M)		oldatai		oldatai		konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3000 x	PC	$3*10^{-6}$
C1	$1*10^{-13}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1000 x	NK	$1*10^{-8}$
C2	$3*10^{-13}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$1*10^{-12}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$3*10^{-12}$	TCx-5	1000 x	TCx-5	30 x		
C5	$6*10^{-12}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	$1*10^{-11}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3*10^{-11}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	$1*10^{-10}$						

TCx –x. vizsgálati vegyi anyag
PC –pozitív kontroll (17α-metiltesztoszteron)
NK –negatív kontroll (kortikoszteron)
C0 –a referenciaszabvány oldószeres kontrollja
SC –a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrollja

6. táblázat

Az antagonista vizsgálathoz használt referenciaanyagok, kontrollanyagok és vizsgálati vegyi anyagok koncentrációi és oldatai

Referencia tamoxifén		TCx – elővizsgálat		TCx – teljes körű vizsgálat-menet		Kontrollok	
konc. (M)		oldatai		oldatai		konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3000 x	PC	$1*10^{-9}$
C1	$3*10^{-9}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1000 x	NK	$1*10^{-5}$
C2	$1*10^{-8}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3*10^{-8}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1*10^{-7}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$3*10^{-7}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	**Hozzáadott agonista**	
C6	$1*10^{-6}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	**konc. (M)**	
C7	$3*10^{-6}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β-ösztradiol	$3*10^{-12}$
C8	$1*10^{-5}$						

TCx –x. vizsgálati vegyi anyag
PC –pozitív kontroll (4-hidroxitamoxifén)
NK –negatív kontroll (rezveratrol)
C0 –a referenciaszabvány oldószeres kontrollja
SC –a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrollja
VC –vivőanyagos kontroll (nem tartalmazza az agonista referenciaszabványként szolgáló 17β-ösztradiol fix koncentrációját ($3,0*10^{-12}$ M))

Adatgyűjtés és adatelemzés

56. Az elővizsgálat és a teljes körű vizsgálatmenetek lefolytatását követően meg kell határozni az agonista vizsgálat EC_{10}, EC_{50}, PC_{10} és PC_{50} értéket, valamint a maximális indukciót (TCx_{max}). Antagonista vizsgálat esetében az IC_{20}, IC_{50}, PC_{80} és PC_{50} értéket, valamint a maximális indukciót (TCx_{max}) kell kiszámolni. E paraméterek grafikus ábrázolása látható a 3. ábrán (agonista vizsgálat) és 4. ábrán (antagonista vizsgálat). A szükséges paraméterek kiszámítása az egyes vizsgálati vegyi anyagok relatív (a 100 %-nak vett referenciaszabvány maximális indukciójához viszonyított) indukcióján alapul. Az adatok értékeléséhez nem lineáris regressziót (változó meredekség 4 paraméter alapján) kell alkalmazni, az alábbi egyenlet szerint:

$$Y = Görbe\ alja + \frac{(Görbe\ teteje - Görbe\ alja)}{(1 + 10^{(lgEC_{50} - X) \times Hill - meredekség})}$$

ahol:

X = a dózis vagy a koncentráció logaritmusa

Y = válasz (relatív indukció (%))

Görbe teteje = maximális indukció (%)

Görbe alja = minimális indukció (%)

$LogEC_{50}$ = annak a koncentrációnak a logaritmusa, amely a maximális válasz 50 %-át idézi elő

Hill-meredekség = meredekségi tényező vagy Hill-meredekség

57. A luminométer által szolgáltatott, relatív fényegységekben (RLU) kifejezett nyers adatokat át kell vezetni az elővizsgálat és a teljes körű vizsgálatmenetek adatelemzése céljára létrehozott táblázatsablonba. A nyers adatoknak meg kell felelniük a 3A és 3B táblázatban (agonista vizsgálat) vagy a 4A és 4B táblázatban (antagonista vizsgálat) feltüntetett elfogadhatósági kritériumoknak. Amennyiben a nyers adatok megfelelnek az elfogadhatósági kritériumoknak, az alábbi kalkulációs lépéseken keresztül meg kell határozni a szükséges paramétereket:

Agonista vizsgálat

— Az egyes referenciaszabványok nyers adatainak elemzéséből származó eredményből vonjuk ki a referenciaszabvány oldószeres kontrolljának átlagos RLU-értékét.

— Az egyes vizsgálati vegyi anyagok nyers adatainak elemzéséből származó eredményből vonjuk ki a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrolljának átlagos RLU-értékét.

— Számítsuk ki a referenciaszabvány egyes koncentrációértékeinek relatív indukcióját. Határozzuk meg 100 %-ként a referenciaszabvány legmagasabb koncentrációjának indukcióját.

— Számítsuk ki a vizsgálati vegyi anyagok egyes koncentrációinak a referenciaszabvány 100 %-nak vett legnagyobb koncentrációjához viszonyított, relatív indukcióját.

— Értékeljük az analízis eredményeit nem lineáris regresszió technikájával (változó meredekség, 4 paraméter).

— Határozzuk meg a referenciaszabvány EC_{50} és EC_{10} értékét.

— Határozzuk meg a vizsgálati vegyi anyagok EC_{50} és EC_{10} értékét.

— Határozzuk meg a vizsgálati vegyi anyagok maximális relatív indukcióját (TC_{max}).

— Határozzuk meg a vizsgálati vegyi anyagok PC_{10} és PC_{50} értékét.

A vizsgálati vegyi anyagok esetében citotoxicitás vagy oldhatósági problémák miatt nem mindig hozható létre teljes dózis-válasz görbe. Ekkor nem lehet meghatározni az EC_{50}, EC_{10} és PC_{50} értékét. Ilyen esetben csak a PC_{10} és TC_{max} értéke határozható meg.

Antagonista vizsgálat

— Az egyes referenciaszabványok nyers adatainak elemzéséből származó eredményből vonjuk ki a referenciaszabvány legnagyobb koncentrációjának átlagos RLU-értékét.

— Az egyes vizsgálati vegyi anyagok nyers adatainak elemzéséből származó eredményből vonjuk ki a referenciaszabvány legnagyobb koncentrációjának átlagos RLU-értékét.

— Számítsuk ki a referenciaszabvány egyes koncentrációértékeinek relatív indukcióját. Határozzuk meg 100 %-ként a referenciaszabvány legalacsonyabb koncentrációjának indukcióját.

— Számítsuk ki a vizsgálati vegyi anyagok egyes koncentrációinak a referenciaszabvány 100 %-nak vett legalacsonyabb koncentrációjához viszonyított, relatív indukcióját.

— Értékeljük az analízis eredményeit nem lineáris regresszió technikájával (változó meredekség, 4 paraméter).

— Határozzuk meg a referenciaszabvány IC_{50} és IC_{20} értékét.

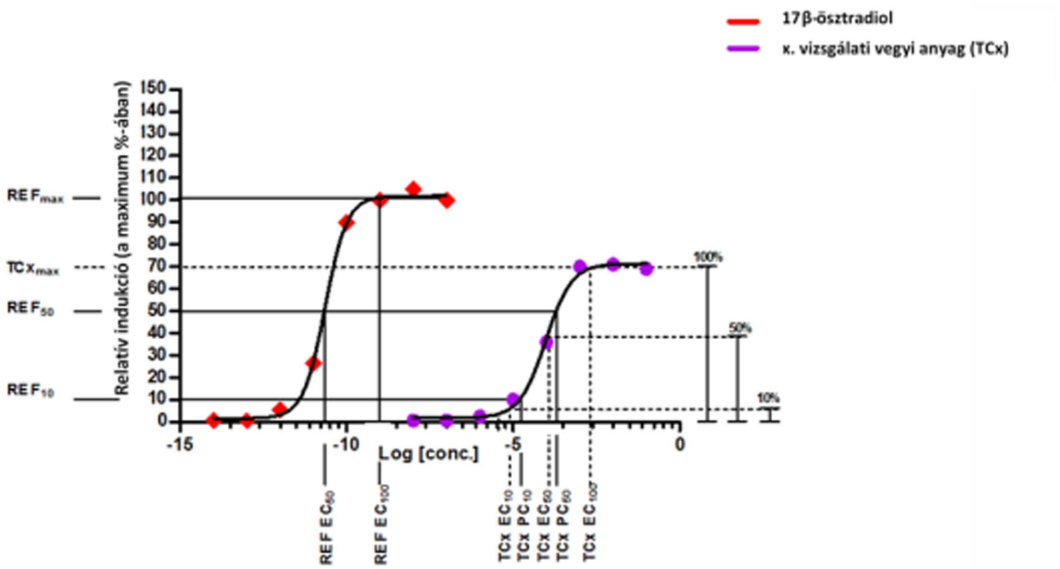
— Határozzuk meg a vizsgálati vegyi anyagok IC_{50} és IC_{20} értékét.

— Határozzuk meg a vizsgálati vegyi anyagok minimális relatív indukcióját (TC_{min}).

— Határozzuk meg a vizsgálati vegyi anyagok PC_{80} és PC_{50} értékét.

3. ábra

Az agonista vizsgálatban meghatározott paraméterek áttekintése



EC_{10} = egy anyag azon koncentrációja, amely a maximális válaszának 10 %-át váltja ki.

EC_{50} = egy anyag azon koncentrációja, amely a maximális válaszának 50 %-át váltja ki.

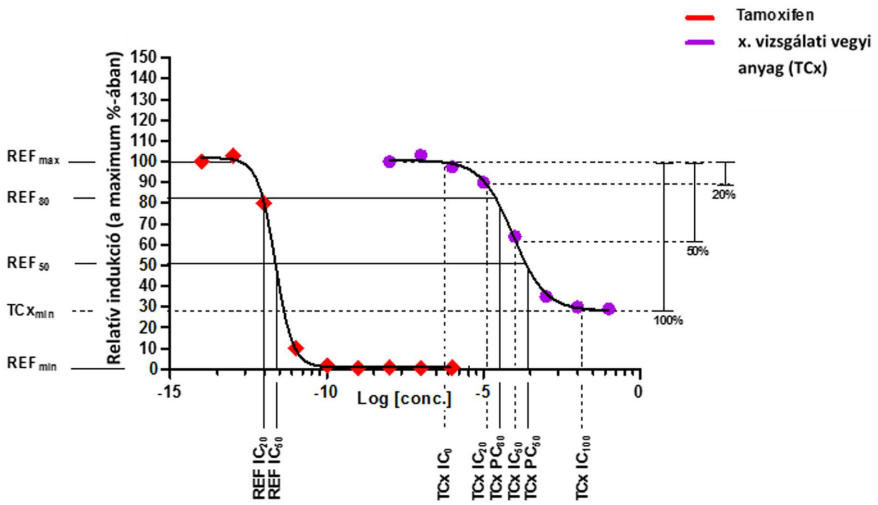
PC_{10} = egy vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely a referenciaszabvány EC_{10} értékével megegyező választ váltott ki.

PC_{50} = egy vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely a referenciaszabvány EC_{50} értékével megegyező választ váltott ki.

TCx_{max} = a vizsgálati vegyi anyag maximális relatív indukciója.

4. ábra

Az antagonista vizsgálatban meghatározott paraméterek áttekintése



IC20 = egy anyag azon koncentrációja, amely a maximális válaszának 80 %-át váltja ki (20 %-os gátlást idéz elő).

IC50 = egy anyag azon koncentrációja, amely a maximális válaszának 50 %-át váltja ki (50 %-os gátlást idéz elő).

PC80 = egy vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely a referenciaszabvány IC_{20} értékével megegyező választ vált ki.

PC50 = egy vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely a referenciaszabvány IC_{50} értékével megegyező választ vált ki.

TCx_{min} = a vizsgálati vegyi anyag minimális relatív indukciója.

A vizsgálati vegyi anyagok esetében citotoxicitás vagy oldhatósági problémák miatt nem mindig hozható létre teljes dózis-válasz görbe. Ekkor nem lehet meghatározni az IC_{50}, IC_{20} és PC_{50} értékét. Ilyen esetben csak a PC_{20} és TC_{min} értéke határozható meg.

58. Az eredményeknek két (vagy három) független vizsgálatmeneten kell alapulniuk. Amennyiben két vizsgálatmenet összevethető, vagyis reprodukálható eredményeket ad, akkor harmadik vizsgálatmenetre nincs szükség. Az eredmények akkor elfogadhatók, ha:

— teljesülnek az elfogadhatósági kritériumok (e kritériumokat lásd a 14–22. pontban),

— megismételhetők.

Az adatok értelmezésének kritériumai

59. Az adatok értelmezéséhez és annak eldöntéséhez, hogy egy adott vizsgálati vegyi anyag pozitív vagy negatív besorolást kapjon, az alábbi kritériumokat kell figyelembe venni:

Agonista vizsgálat

Minden teljes körű vizsgálatmenet tekintetében valamely vizsgálati vegyi anyag az alábbi esetben tekinthető **pozitívnak**:

1. A TC_{max} megegyezik a referenciaszabvány maximális válaszának 10 %-ával (REF_{10}), vagy meghaladja azt.

2. A vizsgálati vegyi anyag legalább 2 egymást követő koncentrációja megegyezik az REF_{10} értékével, vagy meghaladja azt.

Minden teljes körű vizsgálatmenet tekintetében valamely vizsgálati vegyi anyag az alábbi esetben tekinthető **negatívnak**:

1. A TC_{max} nem haladja meg a referenciaszabvány maximális válaszának 10 %-át (REF_{10}).

2. A vizsgálati vegyi anyag kevesebb mint két koncentrációja egyezik meg az REF_{10} értékével, vagy haladja meg azt.

Antagonista vizsgálat

Minden teljes körű vizsgálatmenet tekintetében valamely vizsgálati vegyi anyag az alábbi esetben tekinthető **pozitívnak**:

1. A TC_{min} megegyezik a referenciaszabvány maximális válaszának 80 %-ával (REF_{80} = 20 %-os gátlás), vagy alacsonyabb annál.

2. A vizsgálati vegyi anyag legalább 2 egymást követő koncentrációja megegyezik az REF_{80} értékével, vagy alacsonyabb annál.

Minden teljes körű vizsgálatmenet tekintetében valamely vizsgálati vegyi anyag az alábbi esetben tekinthető **negatívnak**:

1. A TC_{min} meghaladja a referenciaszabvány maximális válaszának 80 %-át (REF_{80} = 20 % gátlás).

2. A vizsgálati vegyi anyag legfeljebb egy koncentrációja egyezik meg az REF_{80} értékével, vagy alacsonyabb annál.

60. Egy adott vizsgálati vegyi anyag pozitív válasza által előidézett hatás jellemzése érdekében a jelentésbe egyaránt bele kell foglalni a kiváltott hatás mértékét (agonista vizsgálatnál: TC_{max}; antagonista vizsgálatnál: TC_{min}) és a hatást előidéző koncentrációt (agonista vizsgálatnál: EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50}; antagonista vizsgálatnál: IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50}).

VIZSGÁLATI JELENTÉS

61. Lásd „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI" című 20. pontot.

SZAKIRODALOM

(1) OECD (2016). Draft Validation report of the (anti-) ERα CALUX bioassay – transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240). Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs

(2) Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136-148.

(3) Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, and van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER)α and not through ERβ. *Endocrinology* 142(3), 1156-1166.

(4) Thorne N, Inglese J and Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology17(6):646-57.

(5) Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavaillès V and Balaguer P.(2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459-1469.

(6) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.,* 139, 4252-4263.

(7) Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Super-induction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.,* 122, 204–211.

(8) Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, and van der Burg B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.,* 89(1), 173–187.

(9) Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M and Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.,* 57(4), 769-771.

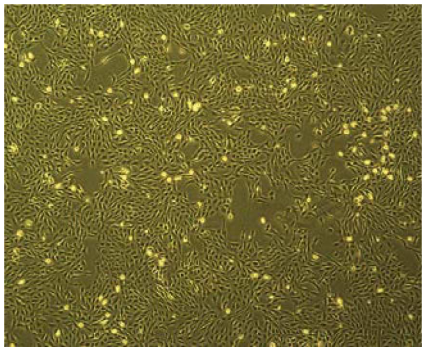
(10) Zhang J-H, Chung TDY, and Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throuphut screening assays. J. Biomol. Scr., 4, 67-73

(11) Besselink H, Middelhof I, and Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, the Netherlands.

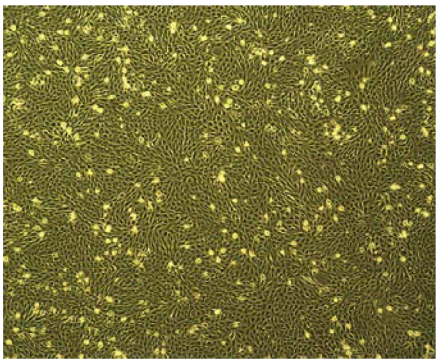
4.1. függelék:

A SEJTÉLETKÉPESSÉG VIZUÁLIS MEGFIGYELÉSE

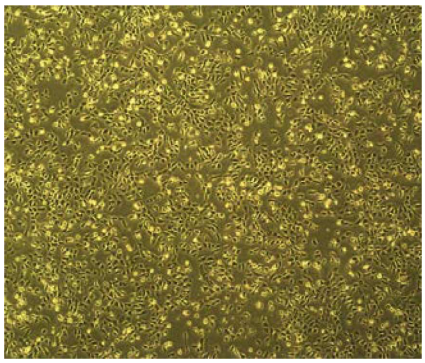
< 5 %-os konfluencia. A sejteket éppen most oltották át. 100 %-os sejtéletképesség. Osztályozás: „
nincs citotoxicitás”



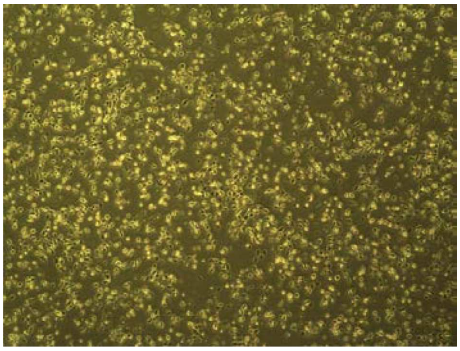
> 85 %-os konfluencia. A sejteket ebben a stádiumban kezelik a vizsgálati vegyi anyagokkal. > 95 %-os sejtéletképesség.
Osztályozás: „nincs citotoxicitás”



> 95 %-os konfluencia. A sejtek sűrűn sorakoznak egymás mellett és kezdenek túlburjánzani. > 95 %-os sejtéletképesség.
Osztályozás: „nincs citotoxicitás”



< 25 %-os sejtéletképesség. A sejtek elválnak egymástól és a közöttük lévő kontaktus csökken. A sejtek kerek formát öltenek. Osztályozás: „citotoxicitás”



< 5 %-os sejtéletképesség. A sejtek teljesen elválnak egymástól és a közöttük lévő kontaktus megszűnik. A sejtek kerek formát öltenek. Osztályozás: „citotoxicitás”

B.67. EMLŐSSEJTEKEN TIMIDIN-KINÁZ GÉNNEL VÉGZETT *IN VITRO* GÉNMUTÁCIÓS VIZSGÁLATOK

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 490. vizsgálati iránymutatásával (2016). A vizsgálati módszereket a tudományos fejlődés, a szabályozási igények és az állatok kíméletének figyelembevételével rendszeresen felülvizsgálják és átdolgozzák. A timidin-kináz (TK) lókuszt alkalmazó egérlimfóma-vizsgálat (MLA) és TK6 vizsgálat eredetileg a B.17. vizsgálati módszer részét képezte. Később azonban a genotoxicitás vizsgálatával foglalkozó nemzetközi műhely (IWGT) MLA szakértői munkacsoportja az egérlimfóma-vizsgálat elfogadhatósági kritériumaira és adatainak értelmezésére vonatkozólag nemzetközi harmonizált ajánlásokat dolgozott ki (1) (2) (3) (4) (5), ezeket az ajánlásokat foglalja magában ez az új, B.67. vizsgálati módszer. Ez a vizsgálati módszer az egérlimfóma-vizsgálathoz készült, és mivel timidin-kináz lókuszt alkalmaz, a TK6 vizsgálatra is érvényes. Az egérlimfóma-vizsgálat ot széles körben alkalmazzák szabályozási célból, a TK6 vizsgálatot viszont sokkal ritkábban. Megjegyzendő, hogy a végpontok hasonlósága ellenére a két sejtvonal nem helyettesíthető egymással, ezért a szabályzási programok adott szabályozási célra jogosan részesítik előnyben az egyiket a másikkal szemben. Az MLA validálása például bizonyította, hogy a vizsgálat nem csupán a génmutáció észlelésére alkalmas, hanem a szerkezeti kromoszómakárosodást okozó vizsgálati vegyi anyagok kiszűrésére is. E vizsgálati módszer a genetikai toxikológiai vizsgálati módszerek sorozatának részét képezi. Az OECD kidolgozott egy, a genetikai toxikológiai vizsgálatokról tömör tájékoztatást nyújtó, az OECD genetikai toxikológiára vonatkozó vizsgálati iránymutatásainak közelmúltbeli változásait áttekintő dokumentumot (6).

2. Az emlőssejteken végzett *in vitro* génmutációs vizsgálatok célja a vegyi anyagok által előidézett génmutációk észlelése. Az ezekben a vizsgálatokban használt sejtvonalak forward (előremutató) mutációkat mérnek riportergénekben, konkrétan az endogén timidin-kináz génben (*TK* emberi sejtekben és *Tk* rágcsálók sejtekben, e vizsgálati módszer keretében együttes megnevezésük *TK*). Ezt a vizsgálati módszert két sejtvonal használatára tervezték: az egyik az L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C egérlimfóma-sejtvonal (általános nevén az L5178Y), a másik a TK6-os humán limfoblasztoid sejtvonal (elterjedt nevén a TK6). Bár a két sejtvonal eredetét, sejtnövekedését, p53 státuszát stb. tekintve különbözik egymástól, a *TK* génmutációs vizsgálatok hasonló módon végezhetők el mindkét sejttípusban, a vizsgálati módszerben leírtak szerint.

3. A timidin-kináz gén autoszomális és heterozigóta jellege lehetővé teszi, hogy a $TK^{+/-} > TK^{-/-}$ mutációt követően észlelni lehessen a timidin-kináz enzimmel nem rendelkező sejtekből álló életképes telepeket. Az enzimhiányt okozhatják a TK gént érintő genetikai események, amelyek lehetnek génmutációk (pontmutációk, a leolvasási keret eltolódása, kisebb deléciók stb.) és kromoszomális események (nagy deléciók, kromoszóma-átrendeződések és mitotikus rekombináció). Ez utóbbi események a heterozigótaság elvesztését okozhatják, ami a humán tumorgenezisben szerepet játszó tumorszupresszor gének gyakori genetikai változása. Az egérlimfóma-vizsgálat elvileg képes detektálni a *TK* gént hordozó teljes kromoszóma magorsókárosodásból és/vagy mitotikus nondiszjunkcióból fakadó elvesztését. A citogenetikus és a molekuláris analízis együttes alkalmazása egyértelműen mutatja, hogy az egérlimfóma-vizsgálat timidin-kináz mutánsainak egy része nondiszjunkcióval jött létre. A bizonyítékok súlyozása azonban arra utal, hogy a TK génmutációs vizsgálatok a standard (e vizsgálati módszerben ismertetett) citotoxicitási kritériumok alkalmazásával nem képesek megbízhatóan kimutatni aneugéneket, ezért ezek a vizsgálatok aneugének észlelésére nem megfelelők (7) (8) (9).

4. A TK génmutációs vizsgálatokban a timidin-kináz mutánsok két eltérő fenotípus csoportba oszthatók: a normális növekedési sebességű mutánsok, amelyek a heterozigóta timidin-kináz sejtekkel megegyező ütemben növekednek, és a lassan növő mutánsok, amelyeknek hosszabb a generációs ideje. A normális növekedési sebességű és a lassan növő mutánsokat az egérlimfóma-vizsgálatban nagy és kis telepmutánsokként, a TK6 vizsgálatban pedig gyorsan és lassan megjelenő telepmutánsokként tartják számon. Az egérlimfóma-vizsgálat nagy és kis telepmutánsainak molekuláris és citogenetikus természetét már részletesen feltárták (8) (10) (11) (12) (13). A TK6 vizsgálat gyorsan és lassan megjelenő mutánsainak molekuláris és citogenetikus természetét is széles körű vizsgálatnak vetették alá (14) (15) (16) (17). Mindkét sejttípus lassan növő mutánsait genetikus károsodás érte, amely a TK lókusz közelében elhelyezkedő, feltételezetten növekedést szabályozó gén(eke)t érinti, és amely kiváltja a megduplázódási idő elhúzódását, azaz a lassan megjelenő vagy kis telepek létrejöttét (18). A lassan növő mutánsok megjelenését alapvető szerkezeti kromoszóma-rendellenességeket előidéző vegyi anyagokkal hozták összefüggésbe. Azok a sejtek, amelyeknél a mutáció nem érinti a TK lókusz közelében elhelyezkedő, feltételezhetően növekedést szabályozó gén(eke)t, a szülői sejtekhez hasonló ütemben nőnek és normális sebességgel növő mutánsokká válnak. A kezdetben normális növekedési sebességű mutánsoknál a vegyi anyagok elsődlegesen pontmutációkat okozó mutagének. Ebből következően mind a lassan növő, mind a normális növekedési sebességű mutánsokat meg kell számolni ahhoz, hogy számba vehessék az összes mutánst, és támpontokat lehessen szerezni arra nézve, hogy a vizsgálati vegyi anyag milyen típusú károsodás(oka)t idéz elő (mutagén vs. klasztogén) (10) (12) (18) (19).

5. A vizsgálati módszert úgy építették fel, hogy egyaránt biztosítson mindkét vizsgálatra (egérlimfóma-vizsgálat és TK6) érvényes általános információkat, és egyedi iránymutatást az egyes vizsgálatokhoz.

6. Az alkalmazott fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatók.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

7. Az *in vitro* végrehajtott vizsgálatok rendszerint külső forrásból származó metabolikus aktiváció alkalmazását teszik szükségessé. Az exogén metabolikus aktivációs rendszer nem utánozza teljesen az *in vivo* körülményeket.

8. Ügyelni kell arra, hogy ne álljanak elő olyan körülmények, amelyek álpozitív – tehát nem a vizsgálati vegyi anyag és a sejt genetikus anyagának kölcsönhatásából származó – eredményhez (hanem a vizsgálati rendszerrel való esetleges kölcsönhatáshoz) vezethetnének; ilyen körülmény többek között a pH-érték vagy az ozmolalitás változása, a tápfolyadék összetevőivel való kölcsönhatás (20) (21) vagy a túlzott mértékű citotoxicitás (22) (23) (24). Az egérlimfóma-vizsgálat és a TK6 vizsgálat szempontjából a 28. pontban meghatározott, ajánlott citotoxicitási felső határértékeket meghaladó citotoxicitás minősül túlzott mértékűnek. Emellett a timidin bázisanalóg, vagy timidin bázisanalógként viselkedő vizsgálati vegyi anyagok növelhetik a mutánsok gyakoriságát azáltal, hogy a sejtkezelés alatt elősegítik a spontán háttérmutánsok szelektív növekedését, így a megfelelő értékelés biztosítása érdekében további vizsgálati módszerek használatát teszik szükségessé (25).

9. A mesterséges nanoanyagok esetében e vizsgálati módszer egyedi adaptálására lehet szükség, amelyet azonban ez a vizsgálati módszer nem ismertet.

10. E vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény.

11. Azok a mutáns sejtek, amelyek a $TK^{+/-} > TK^{-/-}$ mutáció miatt nem mutatnak timidinkináz-enzimaktivitást, rezisztensek a pirimidin bázisanalóg trifluoro-timidin (TFT) citotoxikus hatásaival szemben. A *TK* proficiens sejtek érzékenyek a TFT-re, ami a celluláris metabolizmus gátlását okozza, és megállítja a további sejtosztódást. Így tehát a mutáns sejtek TFT jelenlétében képesek sejtburjánzásra és látható telepek létrehozására, míg a timidin-kinázt tartalmazó sejtek nem képesek erre.

A VIZSGÁLAT ELVE

12. Szuszpenzióban növő sejteket megfelelő időtartamig (lásd a 33. pontot) külső forrásból származó metabolikus aktivációval és anélkül (lásd a 19. pontot) kezelik a vizsgálati vegyi anyaggal, majd a sejtkultúrát átültetik, hogy meghatározzák a citotoxicitást és lehetővé tegyék a fenotípus expressziót a mutáns kiválasztása előtt. A citotoxicitást az egérlimfóma-vizsgálat esetében a relatív teljes növekedés (RTG – lásd a 25. pontot), a TK6 esetében pedig a relatív túlélés (RS – lásd a 26. pontot) alapján határozzák meg. A kezelt tenyészeteket tápoldatban tartják, az egyes sejttípusokra jellemző megfelelő ideig (lásd a 37. pontot), hogy lehetővé váljon az indukált mutációk közel optimális fenotípus expressziója. A fenotípus expressziót követően a mutációs gyakoriságot úgy határozzák meg, hogy leültetnek ismert számú sejtet a szelekciós ágenst tartalmazó tápoldatba a mutáns telepek kimutatására, valamint a szelekciós ágenst nem tartalmazó tápoldatba a kolóniaképző képesség (életképesség) meghatározására. Megfelelő inkubációs idő után megszámolják a telepeket. A mutációs gyakoriság kiszámításának alapja a mutáns telepek száma, kiigazítva a mutáns kiválasztásának idején mért kolóniaképző képességgel.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Előkészületek

Sejtek

13. Az egérlimfóma-vizsgálat esetén: Mivel az egérlimfóma-vizsgálat kidolgozását és jellemzését az L5178Y sejtek $TK^{+/-}$−3.7.2C alvonalára alapozták, az egérlimfóma-vizsgálathoz ezt az alvonalat kell használni. Az L5178Y sejtvonal a DBA/2 egér vonalból származó, metilkolantrénnel indukált csecsemőmirigy limfómából származik (26). Clive és

munkatársai az L5178Y (Clive-féle jelöléssel $TK^{+/+}$ −3) sejteket etil-metán-szulfonáttal kezelték, majd bróm-dezoxi-uridint szelekciós ágensként használva izolálták a $TK^{-/-}$ (Clive-féle jelöléssel $TK^{-/-}$ −3.7) klónt. A $TK^{-/-}$ klónból egy spontán keletkezett $TK^{+/-}$ klónt (Clive-féle jelöléssel $TK^{+/-}$ −3.7.2.) és egy alklónt (Clive-féle jelöléssel $TK^{+/-}$−3.7.2C) izoláltak és jellemeztek az egérlimfóma-vizsgálathoz (27). A sejtvonal kariotípusát közzétették (28) (29) (30) (31). Modális kromoszómaszáma 40. A sejtvonal tartalmaz egy metacentrikus kromoszómát (t12;13), amely egy kromoszómának tekintendő. Az egér timidin-kináz lókusza a 11. kromoszóma távoli végén helyezkedik el. Az L5178Y $TK^{+/-}$ −3.7.2C sejtvonal mindkét p53 allélján mutáció figyelhető meg, és mutáns p53 fehérjét hoz létre (32) (33). Valószínűleg a $TK^{+/-}$−3.7.2C sejtvonal p53 státusza felelős azért, hogy a vizsgálat képes észlelni a nagymérvű károsodásokat (17).

14. A TK6 esetében A TK6 egy humán limfoblasztoid sejtvonal. A kiinduló sejtvonal egy Epstein-Barr vírussal transzformált sejtvonal, a WI-L2, amely eredetileg egy örökletes szferocitózisban szenvedő 5 éves fiútól származik. A sejtvonal első izolált klónját, a HH4-et ICR191-gyel mutagenizálták, majd létrehozták a heterozigóta timidin-kináz sejtvonalat, a TK6-ot (34). A TK6 sejtek szinte diploid állapotúak, kromoszómakészletük jellemzői a következők: 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). A humán timidin-kináz lókusza a 17. kromoszóma hosszú karján helyezkedik el. A TK6 p53-kompetens sejtvonal, mivel mindkét allélon vad típusú p53-szekvenciával rendelkezik, és csak vad típusú p53 fehérjét fejez ki (36).

15. Mind az egér-limfóma, mind a TK6 vizsgálatra érvényes, hogy az induló sejtkészlet létrehozása vagy lefagyasztása előtt ajánlatos a laboratóriumnak meggyőződnie a sejtek mikoplazmafertőzés-mentességéről, meghatároznia a sejtek kariotípusát vagy megfestenie azokat a kromoszómákat, amelyek a timidin-kináz lókuszt hordozzák és ellenőriznie a sejtpopuláció megduplázódási idejét. A laboratóriumban használt sejteknél meg kell állapítani a normál sejtciklus-időtartamot, és annak összhangban kell lennie a publikált jellemzőkkel (16) (19) (37). A mester törzskészletet -150 °C-on vagy az alatti hőmérsékleten kell tárolni, és minden munkakészletet ebből kell elkészíteni.

16. Nagy mennyiségű fagyasztott munkakészlet létrehozását megelőzően, vagy közvetlenül a munkakészletek kísérleti felhasználása előtt szükség lehet arra, hogy a tenyészetet megtisztítsák a jelen lévő mutáns sejtektől [kivéve, ha az oldószeres kontroll mutációs gyakorisága (MF) már az elfogadható tartományon belül van – lásd az egérlimfóma-vizsgálat 2. táblázatát)]. Ehhez metotrexáttal (aminopterinnel) szelektálják a timidinkináz-hiányos sejteket, majd timidint, hipoxantint és glicint (L5178Y) vagy 2'-deoxicitidint (TK6) adagolnak a sejtkultúrához, hogy biztosítsák a TK-kompetens sejtek (19) (38) (39) és a TK6 (40) optimális növekedését. A sejttenyészetek fenntartásához általános gyakorlati tanácsok, valamint konkrétan az L5178Y és a TK6 sejtekre vonatkozó tanácsok a (19) (31) (37) (39) (41) szakirodalmi hivatkozásban találhatók. Azoknak a laboratóriumoknak, amelyek mester törzskészletet igényelnek az egérlimfóma- vagy a TK6 vizsgálat elvégzéséhez, illetve új törzskészletet kívánnak beszerezni, rendelkezésére áll egy megfelelően jellemzett sejteket tartalmazó törzsgyűjtemény (37).

Tápfolyadék és tenyésztési körülmények

17. Mindkét vizsgálatban megfelelő tápfolyadékot és inkubációs feltételeket kell biztosítani a tenyészetek fenntartásához (pl. tenyésztőedények, 5 %-os CO_2-koncentrációjú, vízgőzzel telített levegő és 37 °C-os inkubációs hőmérséklet). A sejttenyészeteket mindig olyan körülmények között kell tartani, amelyek biztosítják az exponenciális növekedési szakaszt. Különösen fontos, hogy a tápfolyadékot és a tenyésztési körülményeket úgy válasszák meg, hogy azok biztosítsák az optimális növekedési feltételeket az expressziós időszak alatt, és mind a mutáns, mind a vad típusú sejtvonalak kolóniaképző készsége optimális legyen. Az egérlimfóma- és a TK6 vizsgálatban egyaránt fontos az is, hogy a tenyésztési körülmények biztosítsák mind a nagy telepmutánsok/gyorsan megjelenő timidin kináz mutánsok, mind a kis telepmutánsok/lassan megjelenő timidin kináz mutánsok optimális fejlődését. A sejttenyésztés további részleteiről – egyebek mellett a lószérum megfelelő iválásának szükségességéről, ha a mutánsok kiválasztása során RPMI tápfolyadékot használnak – a (19) (31) (38) (39) (40) (42) szakirodalmi hivatkozás nyújt tájékoztatást.

A tenyészetek előkészítése

18. A sejteket tárolt törzskultúrákból indítva tápfolyadékba oltják le olyan sejtszámmal, hogy a szuszpenzióban növő sejtek a teljes kezelési és expressziós időszakban exponenciálisan növekedjenek.

Metabolikus aktiválás

19. L5178Y és TK6 sejtek használata esetén exogén metabolikus aktivációs rendszereket kell alkalmazni, mivel ezek a sejtek nem rendelkeznek megfelelő endogén metabolikus képességgel. Amennyiben az ettől való eltérés nem indokolt, az alapértelmezetten ajánlott, legáltalánosabban használt rendszer a rágcsálók (általában patkányok) enzimind-uktorral (ilyen például az Aroclor 1254 (43) (44) (45) vagy fenobarbitál és ß-naftoflavon kombinációjával (46) (47) (48) (49) (50) (51)) kezelt májából preparált, kofaktor-kiegészítésű posztmitokondriális frakció (S9). Ez utóbbi

kombináció nem ütközik a környezetben tartósan megmaradó szerves szennyező anyagokról szóló stockholmi egyezménnyel (52), és kiderült róla, hogy olyan hatékony, mint az Aroclor 1254 a vegyes funkciójú oxidázok indukálásához (45) (46) (47) (48) (49). Az S9 frakció jellemzően 1–2 térfogatszázalék koncentrációban használatos, de a végső vizsgálati tápfolyadékban mennyisége 10 térfogatszázalékra növelhető. Az alkalmazott exogén metabolikus aktivációs rendszer vagy metabolikus induktor típusának és koncentrációjának megválasztását befolyásolhatja a vizsgálati vegyi anyagok osztálya.

A vizsgálati vegyi anyagok előkészítése

20. A szilárd halmazállapotú vizsgálati vegyi anyagokat a sejtek kezelése előtt megfelelő oldószerrel elő kell kezelni, és szükség esetén hígítani kell (lásd a 21. pontot). A folyékony halmazállapotú vizsgálati vegyi anyagok közvetlenül hozzáadhatók a vizsgálati rendszerhez és/vagy hígíthatók a vizsgálati rendszer kezelése előtt. A gáz halmazállapotú vagy illékony vizsgálati vegyi anyagokat a standard protokollok megfelelő módosításával, például légmentesen lezárt tenyésztőedényekben történő kezeléssel kell vizsgálni (53) (54) (55). A vizsgálati vegyi anyagot tartalmazó készítményeket közvetlenül a kezelés előtt kell előállítani, kivéve, ha a stabilitási adatok a tárolhatóságot bizonyítják.

VIZSGÁLATI KÖRÜLMÉNYEK

Oldószerek

21. Az oldószert oly módon kell kiválasztani, hogy optimális oldhatóságot biztosítson a vizsgálati vegyi anyagnak, ugyanakkor ne befolyásolja hátrányosan a vizsgálat lebonyolítását, vagyis ne változtassa meg a sejtek növekedését, ne befolyásolja a vizsgálati vegyi anyag integritását, ne lépjen reakcióba a tenyésztőedénnyel, és ne károsítsa a metabolikus aktivációs rendszert. Amennyiben lehetséges, először valamilyen vizes oldószer (vagy tápfolyadék) használatát érdemes megfontolni. Jól bevált oldószer a víz vagy a dimetil-szulfoxid. A végleges kezelési közegben a szerves oldószerek koncentrációja általában ne haladja meg az 1 térfogatszázalékot, a vizes oldószereké (só oldat vagy víz) pedig a 10 térfogatszázalékot. A jól bevált szerves oldószerektől eltérő oldószerek (például etanol vagy aceton) használatakor a vizsgálati vegyi anyaggal és a vizsgálati rendszerrel való összeegyeztethetőségükre utaló adatokkal kell alátámasztani használatukat, és azt, hogy a használt koncentrációnál nem genotoxikusak. Alátámasztó adatok hiányában szükséges nem kezelt kontrollok alkalmazása (lásd a fogalommeghatározásokat az 1. függelékben) annak bizonyítására, hogy a kiválasztott oldószer nem vált ki káros vagy mutagén hatást.

A CITOTOXICITÁS MÉRÉSE ÉS A KEZELÉS SORÁN ALKALMAZOTT KONCENTRÁCIÓSZINTEK KIVÁLASZTÁSA

22. A vizsgálati vegyi anyag legmagasabb koncentrációjának meghatározása során kerülendő az olyan koncentráció, amely hamis pozitív válaszreakciókat válthat ki, ilyen a túlzott citotoxicitást okozó koncentráció (lásd a 28. pontot), a tápfolyadékban történő kicsapódást okozó koncentráció (lásd a 29. pontot), illetve a pH vagy az ozmolalitás jelentős változását okozó koncentráció (lásd a 8. pontot). Ha a vizsgálati vegyi anyag a hozzáadásakor jelentős változást okoz a tápfolyadék pH-jában, a pH a kezelésre szolgáló végleges tápfolyadék pufferelésével kiigazítható, hogy elkerülhetők legyenek a hamis pozitív eredmények és megfelelő tenyésztési feltételeket lehessen fenntartani.

23. A koncentráció kiválasztása a citotoxicitás és egyéb megfontolások alapján történik (lásd a 27–30. pontot). Bár a fő vizsgálatban alkalmazandó koncentrációk jobb meghatározásához egy előzetes vizsgálatban érdemes meghatározni a citotoxicitást, az előzetes vizsgálat nem követelmény. Még ha sor is kerül a citotoxicitás előzetes meghatározására, a fő vizsgálat során minden kultúrára el kell végezni a citotoxicitás mérését. Amennyiben koncentrációtartomány-behatároló kísérletet végeznek, a kísérletnek le kell fednie a koncentrációk széles körét, a kísérlet pedig lezárható a kezelést követő 1. napon, vagy folytatható a 2. napon történő expresszióig és a mutánsok kiválasztásáig (ha bebizonyosodik, hogy a használt koncentrációértékek megfelelők).

24. A citotoxicitást minden vizsgálati és kontrollként szolgáló sejtkultúra esetében meg kell határozni: az egérlimfóma- (2) és a TK6 (15) vizsgálatban alkalmazott módszert a nemzetközileg elfogadott gyakorlat alapján dolgozták ki.

25. Az egérlimfóma-vizsgálat esetében mind az agarlemezen, mind a mikrotiterlemezen való tenyésztés során a citotoxicitást a relatív teljes növekedés (RTG) alapján kell értékelni, amelyet eredetileg Clive és Spector határozott meg 1975-ben (2). Ez a mérés magában foglalja a sejtek kezelése során tapasztalt relatív szuszpenziós növekedést (RSG: a vizsgálati kultúra összevetése az oldószeres kontrollal), az expressziós időt és a mutánsok kiválasztásának idején megfigyelt relatív kolóniaképző képességet (RCE: a vizsgálati kultúra összevetése az oldószeres kontrollal) (2). Megjegyzendő, hogy a relatív szuszpenziós növekedés számol a vizsgálati kultúrában a kezelés alatt bekövetkezett sejtpusztulással (a képletet lásd a 2. függelékben).

26. A TK6 esetében a citotoxicitást a relatív túlélés alapján kell értékelni, ami a közvetlenül a kezelést követően leültetett sejtek kolóniaképző képessége, kiigazítva a kezelés során végbement sejtpusztulással, majd a kapott sejtszám összevetve a negatív kontrollal (amelynek túlélési aránya 100 %-nak tekintendő) (a képletet lásd a 2. mellékletben).

27. Legalább négy, az elfogadhatósági kritériumokat (megfelelő citotoxicitás, sejtszám stb.) teljesítő kísérleti koncentráció eredményét kell értékelni (az oldószeres és a pozitív kontrollokon túl). Bár két párhuzamos tenyészet használata ajánlott, az egyes vizsgált koncentrációknál párhuzamos vagy szimpla kezelt tenyészetek használhatók. A párhuzamos tenyészetekben adott koncentráció mellett kapott eredményeket külön kell dokumentálni, az adatelemzéshez azonban összevonhatók (55). Az alacsony citotoxicitást vagy a citotoxicitás hiányát mutató vizsgálati vegyi anyagok esetében rendszerint megközelítőleg kétszeres-háromszoros koncentrációs intervallumok helyénvalóak. Citotoxicitás esetén olyan koncentrációkat kell választani, amelyek lefedik a 28. pontban ismertetett, citotoxicitást okozó koncentrációtól azokig a koncentrációkig terjedő tartományt, ahol mérsékelt vagy alacsony a citotoxicitás, illetve nem jelentkezik citotoxicitás. Számos vizsgálati vegyi anyagnak meredek a koncentráció-válasz görbéje, és annak érdekében, hogy a citotoxicitás teljes tartományát le lehessen fedni, vagy részletesen meg lehessen vizsgálni a koncentráció-válasz összefüggést, szükség lehet egymáshoz közelebbi koncentrációk és négynél több koncentráció használatára, különösen olyan helyzetekben, ahol megismételt kísérlet szükséges (lásd a 70. pontot). Négynél több koncentráció alkalmazásának különösen egyedi tenyészet alkalmazása esetében lehet jelentősége.

28. Ha a legnagyobb koncentráció a citotoxicitáson alapul, a legmagasabb koncentrációval 10 és 20 % közötti relatív teljes növekedést kell megcélozni az egérlimfóma-vizsgálat , és 10 és 20 % közötti relatív túlélést a TK6 vizsgálat esetén (67. pont).

29. A legalacsonyabb oldhatatlan koncentrációnál alacsonyabb koncentrációk mellett nem citotoxikus, nehezen oldható vizsgálati vegyi anyagok esetében a legmagasabb analizált koncentrációnak a vizsgálati vegyi anyaggal történő kezelés végén szemmel vagy inverz mikroszkóp segítségével látható zavarosságot vagy kicsapódást kell okoznia. Még abban az esetben is, ha citotoxicitás a legalacsonyabb oldhatatlan koncentráció felett jön létre, ajánlatos egyetlen egy, zavarosságot vagy látható kicsapódást okozó koncentrációt vizsgálni, mivel a kicsapódás fals hatásokat eredményezhet. Mivel az egérlimfóma- és a TK6 vizsgálat szuszpenzióban növő kultúrákat használ, különösen ügyelni kell annak biztosítására, hogy a kicsapódás ne zavarja a vizsgálat lebonyolítását. Hasznos lehet emellett a tápfolyadékban való oldhatóság meghatározása a kísérlet előtt.

30. Ha nem figyelhető meg kicsapódás vagy korlátozó citotoxicitás, a legmagasabb vizsgálati koncentrációnak 10 mM-nek, 2 mg/ml-nek vagy 2 µl/ml-nek kell megfelelnie, melyek közül a legalacsonyabb a mérvadó (57) (58). Ha a vizsgálati vegyi anyag nem meghatározott összetételű, például ismeretlen vagy változó összetételű anyag, komplex reakciótermék vagy biológiai anyag [vagyis úgynevezett ismeretlen vagy változó összetételű vegyi anyag (UVCB)], környezeti extraktum stb., előfordulhat, hogy kellő citotoxicitás hiányában a legmagasabb koncentrációnak magasabbnak (például 5 mg/ml-nek) kell lennie ahhoz, hogy növekedjen az egyes összetevők koncentrációja. Megjegyzendő azonban, hogy ezek a követelmények eltérőek lehetnek a humán gyógyszerek esetében (59).

Kontrollok

31. Minden kísérleti körülménynél párhuzamos negatív kontrollokat kell használni (lásd a 21. pontot), amelyeknél csak oldószert alkalmaznak a kezelt közegben, és a kezelésük ugyanolyan módon történik, mint a kezelt tenyészeteké.

32. Párhuzamos pozitív kontrollok szükségesek annak igazolására, hogy a laboratórium képes az alkalmazott vizsgálati protokoll feltételei mellett mutagének azonosítására, hogy (adott esetben) az exogén metabolikus aktivációs rendszer eredményes, továbbá hogy megfelelően detektálhatók mind a kis telepmutánsok/lassan megjelenő TK6-mutánsok, mind a nagy telepmutánsok/gyorsan megjelenő TK6-mutánsok. Pozitív kontrollokra vonatkozó példák az alábbi 1. táblázatban találhatók. Indokolt esetben pozitív kontrollként alternatív anyagok használhatók. Mivel az emlőssejtek genetikai toxicitás szempontjából metabolikus aktiválással és anélkül végzett *in vitro* vizsgálatai a párhuzamosan lefolytatott, azonos időtartamú, rövid távú (3–4 órás) kezelések esetében kellően szabványosítottak, a pozitív kontrollok használata a metabolikus aktiválást igénylő mutagénekre korlátozódhat. Ebben az esetben egyetlen pozitív kontroll válaszreakciója a metabolikus aktiváló rendszer aktivitását és a vizsgálati rendszer reagálóképességét is bizonyítja. Hosszú távú (vagyis 24 órás, S9 nélküli) kezelés esetén azonban saját pozitív kontrollt kell végezni, mivel a kezelés időtartama eltér a metabolikus aktiválás alkalmazása mellett végzett vizsgálatétól. Mindegyik pozitív kontrollt egy vagy több olyan koncentrációban kell alkalmazni, amely a háttérértékekhez viszonyítva reprodukálható és kimutatható növekedést okoz, hogy bizonyítani lehessen a vizsgálati rendszer érzékenységét, és a választ nem veszélyeztetheti a vizsgálati módszerben meghatározott határértékeket meghaladó citotoxicitás (lásd a 28. pontot).

1. táblázat

A laboratóriumok jártasságának értékeléséhez és a pozitív kontrollok kiválasztásához ajánlott referenciaanyagok

Kategória	Anyag	CAS-szám
1. Metabolikus aktiválás nélkül is aktív mutagének		
	Metil-metánszulfonát	66-27-3
	Mitomicin-C	50-07-7
	4-Nitro-kinolin-N-oxid	56-57-5
2. Metabolikus aktiválást igénylő mutagének		
	Benzo(a)pirén	50-32-8
	Ciklofoszfamid monohidrát	50-18-0 (6055-19-2)
	7,12-Dimetil-benz[a]antracén	57-97-6
	3-metilkolantrén	56-49-5

ELJÁRÁS

Kezelés a vizsgálati vegyi anyaggal

33. A proliferáló sejteket metabolikus aktivációs rendszer jelenlétében és hiányában kezelik a vizsgálati vegyi anyaggal. Az expozíciónak megfelelő időtartamig kell tartania (ez rendszerint 3–4 óra). Megjegyzendő azonban, hogy ezek a követelmények eltérőek lehetnek a humán gyógyszerek esetében (59). Amennyiben az egérlimfóma-vizsgálatban a rövid távú kezelés negatív eredményre vezet, és léteznek a hosszabb kísérlet szükségességét alátámasztó adatok [pl. nukleozidanalógok, nehezen oldható vegyi anyagok esetében (5) (59)], fontolóra kell venni a vizsgálat hosszabb – vagyis 24 órás, S9 kiegészítők nélküli – kezeléssel járó elvégzését.

34. Az egyes vizsgálati (kontroll és kezelt) tenyészetekhez a vizsgálat bármely szakaszában alkalmazott minimális sejtszámnak a spontán mutációs gyakoriságon kell alapulnia. Az általános iránymutatás szerint minden kísérleti tenyészetben elegendő sejtet kell kezelni és passzálni ahhoz, hogy a vizsgálat minden szakaszában (kezelés, fenotípusos expresszió és mutánsok kiválasztása) előforduljon legalább 10, ideális esetben azonban 100 spontán mutáció (56).

35. Az egérlimfóma-vizsgálatban az ajánlott elfogadható spontán mutációs gyakoriság $35^{-140} \times 10^{-6}$ (agarlemezen) és $50^{-170} \times 10^{-6}$ (mikrotiterlemezen) között van (lásd a 2. táblázatot). Ahhoz, hogy minden vizsgálati sejtkultúrában legyen legalább 10, de ideális esetben 100, a kezelést túlélő spontán mutáns, legalább 6×10^6 sejt kezelése szükséges. Ilyen mennyiségű sejt kezelése, valamint a kifejeződés és a mutánsok kiválasztását lehetővé tévő kolóniaképzés során a megfelelő sejtszám fenntartása a kísérlet minden szakaszában garantálja a spontán mutánsok megfelelő számát (10 vagy több), még a 90 %-os citotoxicitást (vagyis 10 %-os relatív teljes növekedést) okozó koncentrációkkal kezelt tenyészetek esetében is (19) (38) (39).

36. A TK6 vizsgálatban a spontán mutációs gyakoriság rendszerint 2 és 10×10^{-6} közé esik. Ahhoz, hogy minden sejtkultúrában legyen legalább 10, a kezelést túlélő spontán mutáns, legalább 20×10^6 sejt kezelése szükséges. Ilyen mennyiségű sejt kezelése még a 90 %-os citotoxicitást (10 %-os relatív túlélést) kiváltó koncentrációkkal kezelt tenyészetek esetében is megfelelő számú (10 vagy több) spontán mutánst biztosít. Emellett az expressziós időszak során elegendő számú sejtet kell tenyészteni, majd kiszéleszteni a mutánsok kiválasztásához (60).

A fenotípusos expresszió ideje, valamint a citotoxicitás és a mutációs gyakoriság mérése

37. A kezelési időszak végén a sejteket meghatározott – az egyes sejtvonalakra jellemző – ideig fenntartják, hogy lehetővé tegyék az újonnan indukált mutánsok fenotípusának közel optimális expresszióját. Az egérlimfóma-vizsgálatban a fenotípusos expressziós időszak 2 nap. A TK6 vizsgálatban a fenotípusos expressziós időszak 3–4 nap. 24 órás kezelési időszak esetén az expressziós időszak a kezelés végét követően veszi kezdetét.

38. A fenotípusos expressziós időszakban a sejteket naponta megszámlálják. Az egérlimfóma-vizsgálatban a naponta mért sejtszám alapján számítják ki a napi szuszpenziós növekedést (SG). A 2 napos expressziós időszakot követően a sejteket szuszpendálják szelekciós ágenst tartalmazó, illetve szelekciós ágens nélküli tápfolyadékban, hogy meghatározzák a mutánsok számát (a szelekciós lemezeken) és a kolóniaképző képességet (az életképességet mérő lemezeken). Az egérlimfóma-vizsgálatban két egyenértékű módszer létezik a mutánsok kiválasztását célzó kolóniaképzésre: az egyik lágyagar, a másik 96 lyukú lemezbe helyezett tápfolyadék használatán alapul (19) (38) (39). A TK6 vizsgálatban a kolóniaképzés 96 lyukú lemezbe helyezett tápfolyadékban zajlik (16).

39. A trifluor-timidin (TFT) a timidin kináz mutánsok egyetlen ajánlott szelekciós ágense (61).

40. Az egérlimfóma-vizsgálatban az agarlemezeken és a mikrotiterlemezeken 10–12 napi inkubálást követően végzik el a számlálást. A TK6 vizsgálatban a mikrotiterlemezeken fejlődő telepeken 10–14 nap elteltével számlálják meg a gyorsan megjelenő mutánsokat. A lassan növő (lassan megjelenő) TK6-mutánsok kinyeréséhez a gyorsan megjelenő mutánsok számba vételét követően a sejtekhez ismét tápfolyadékot és TFT-t kell adni, majd a lemezeket további 7–10 napon keresztül inkubálni kell (62). A lassú és normál fejlődésű timidin kináz mutánsok megszámlálására vonatkozó szempontokat lásd a 42–44. pontban.

41. A két vizsgálat, azon belül az egérlimfóma-vizsgálat két módszerének (agarlemez és mikrotiterlemez) megfelelő számlálási módját a 2. függelék tartalmazza. Az egérlimfóma-vizsgálat agarlemezes módszerénél a mutációs gyakoriság meghatározásához megszámlálják a telepeket, és a mutáns telepek számát kiigazítják a kolóniaképző képességgel. Az egérlimfóma-vizsgálat mikrotiterlemezes módszerénél és a TK6 vizsgálatnál a kolóniaképző képességet mind a mutánsok kiválasztására, mind a kolóniaképző képesség mérésére szolgáló lemezeken Poisson-elosztással állapítják meg (63). A mutációs gyakoriságot a két lemezen tapasztalt kolóniaképző készség alapján határozzák meg.

Mutáns telepek jellemzése

42. Amennyiben az egérlimfóma-vizsgálatban a vizsgálati vegyi anyag pozitív eredményt ad (lásd a 62–63. pontot), a telep méretének vagy növekedésének meghatározásával jellemezni kell a telepeket a vizsgált tenyészetek közül legalább egynél (általában a legnagyobb elfogadható pozitív koncentrációnál), valamint a negatív és a pozitív kontrolloknál. Ha a vizsgálati vegyi anyag negatívnak bizonyul (lásd a 64. pontot), a mutáns telepek jellemzését a negatív és a pozitív kontrollokon kell elvégezni. Az egérlimfóma-vizsgálat mikrotiterlemezes módszere esetén a kis telepmutánsok azok, amelyek a lyuk átmérőjének kevesebb mint 25 %-át fedik be, a nagy telepmutánsok pedig azok, amelyek a lyuk átmérőjének több mint 25 %-át fedik be. Az agarlemezes módszerben automatikus telepszámlálással határozzák meg a mutáns telepek számát és méretét. A telepméret mérésének módjairól a szakirodalom nyújt részletes tájékoztatást (19) (38) (40). A negatív és a pozitív kontrollok esetén a telepek jellemzései arra szolgálnak, hogy igazolják a vizsgálatok megfelelő végrehajtását.

43. A vizsgálati vegyi anyag nem minősíthető negatívnak, ha sem a nagy, sem a kis telepmutánsokat nem észlelik megfelelően a pozitív kontrollban. A telepek jellemzése általános tájékoztatást nyújthat arról, hogy a vizsgálati vegyi anyag képes-e pontmutációkat és/vagy kromoszomális eseményeket előidézni (4. pont).

44. TK6: a normális növekedési sebességű és a lassan növő mutánsok elkülönítésének alapja az eltérő inkubációs idő (lásd a 40. pontot). A TK6 vizsgálatban általában minden tenyészetnél – így a negatív és a pozitív kontrolloknál is – számba veszik mind a gyorsan, mind a lassan megjelenő mutánsokat. A negatív és a pozitív kontroll telepjellemzései arra szolgálnak, hogy igazolják a vizsgálatok megfelelő végrehajtását. A vizsgálati vegyi anyag nem minősíthető negatívnak, ha sem a gyorsan, sem a lassan megjelenő mutánsokat nem észleli megfelelően a pozitív kontroll. A telepek jellemzése általános tájékoztatást nyújthat arról, hogy a vizsgálati vegyi anyag képes-e pontmutációkat és/vagy kromoszomális eseményeket előidézni (4. pont).

A laboratórium jártassága

45. A laboratóriumoknak a vizsgálat rutinszerű alkalmazása előtti elegendő tapasztalat igazolása érdekében kísérletsorozatot kell végrehajtaniuk referenciaként szolgáló, különböző mechanizmussal ható pozitív anyagokkal (legalább egy metabolikus aktiválással és legalább egy metabolikus aktiválás nélkül ható, az 1. táblázatban felsoroltak közül kiválasztott anyaggal), és különböző negatív kontrollokkal (nem kezelt tenyészetek és különféle oldószerek/vivőanyagok használatával). E pozitív és negatív kontrollok válaszreakcióinak összhangban kell lenniük a szakirodalommal. Ez nem vonatkozik azokra a laboratóriumokra, amelyek tapasztalattal rendelkeznek, azaz amelyeknek a rendelkezésére áll a 47–50. pontban meghatározott, dokumentált adatbázis. Az egérlimfóma-vizsgálatban a pozitív és a negatív kontrollból nyert adatoknak összhangban kell lenniük a genotoxicitás vizsgálatával foglalkozó nemzetközi műhely ajánlásaival (lásd a 2. táblázatot).

46. A pozitív kontrollként kiválasztott anyagokat (lásd az 1. táblázatot) meg kell vizsgálni metabolikus aktiválás nélkül rövid és hosszú kezelési idővel (ha végeznek hosszú időtartalmú kezelést) és metabolikus aktiválást alkalmazó rövid kezelési idővel is, a laboratórium mutagén hatású vegyi anyagok kimutatásában és a metabolikus aktivációs rendszer hatékonyságának meghatározásában való jártasságának bizonyítására, valamint be kell mutatni, hogy a laboratórium megfelelően végzi a kezelés alatt a sejttenyésztést, a fenotípusos expressziót és a mutánsok kiválasztását, továbbá, hogy a kiértékelési eljárások is megfelelőek. A vizsgálati rendszer érzékenységének és dinamikus tartományának bizonyítása érdekében a kiválasztott anyagok koncentrációtartományát úgy kell megválasztani, hogy reprodukálható és koncentrációval összefüggő növekedést biztosítson a háttérértékekhez viszonyítva.

Történeti kontrolladatok

47. A laboratóriumnak meg kell állapítania a következőket:

— a pozitív történeti kontrollok tartománya és eloszlása,

— a negatív (nem kezelt, oldószeres) történeti kontrollok tartománya és eloszlása.

48. A negatív történeti kontrollok dokumentált eloszlásához kapcsolódó első adatgyűjtés során a párhuzamos negatív kontrolloknak összhangban kell lenniük a negatív kontrollokra vonatkozóan közzétett adatokkal. Amint több kísérleti adat adódik a kontrollok eloszlásához, a párhuzamos negatív kontrolloknak ideális esetben az eloszlás 95 %-os ellenőrzési határértékén belül kell lenniük (64) (65).

49. A laboratórium negatív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisát első lépésként legalább 10 kísérlettel kell kiépíteni, de az adatbázisnak lehetőség szerint legalább 20, összehasonlítható kísérleti körülmények között végzett kísérletet kell tartalmaznia. A laboratóriumoknak minőségellenőrzési módszereket, például ellenőrzési diagramokat (C-diagramokat vagy X-bar diagramokat (65)) kell alkalmazniuk annak meghatározására, hogy a pozitív és a negatív kontrollokra vonatkozó adataik mennyire változóak, valamint annak bizonyítására, hogy náluk a módszertan „ellenőrzés alatt" áll (66). A dokumentált adatok gyűjtésére és használatára vonatkozó további részletek és ajánlások megtalálhatók a szakirodalomban (64).

50. A negatív kontrollokra vonatkozó adatoknak tartalmazniuk kell a szimpla tenyészetből vagy lehetőség szerint a párhuzamos tenyészetekből származó mutációs gyakoriságot, ahogyan az a 27. pontban szerepel. A párhuzamos negatív kontrolloknak ideális esetben a laboratórium negatív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisa szerinti eloszlás 95 %-os ellenőrzési határértékén belül kell lenniük. Amennyiben a negatív kontrollokra vonatkozó adatok a 95 %-os ellenőrzési határértéken kívül esnek, akkor számíthatók be a kontrollok dokumentált eloszlásába, ha ezek az adatok nem szélsőségesen kiugró értékek, továbbá bizonyíték van arra, hogy a vizsgálati rendszer „ellenőrzés alatt áll" (lásd a 49. pontot), valamint arra, hogy nem áll fenn szakmai vagy emberi mulasztás.

51. A kísérleti protokoll bármely módosítását meg kell vizsgálni abból a szempontból, hogy az adatok összhangban vannak-e a laboratórium meglévő történeti kontrolladatbázisaival. Jelentősebb következetlenségek fennállása esetén új történeti kontrolladatbázist kell létrehozni.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Az eredmények értékelése

52. Az adatok ismertetésének az egérlimfóma és a TK6 vizsgálat esetében is ki kell terjednie a kezelt és a kontrollként szolgáló tenyészetekre, a citotoxicitás (relatív teljes növekedés vagy relatív túlélés) kiszámításához szükséges adatokra és a mutációs gyakoriságra, az alábbiakban meghatározottak szerint.

53. Az egérlimfóma-vizsgálatban az egyes tenyészetekre vonatkozólag meg kell adni a relatív szuszpenziós növekedést, a relatív teljes növekedést, a mutánsok kiválasztásának idején mért kolóniaképző képességet és a mutáns telepek számát (agarlemez használata esetén), illetve az üres lyukak számát (mikrotiterlemez használata esetén). A mutációs gyakoriságot a mutáns sejtek száma és 1 millió túlélő sejt hányadosaként kell kifejezni. Pozitív válasz esetén meg kell adni a kis és a nagy telepek mutációs gyakoriságát (és/vagy a teljes mutációs gyakoriság arányát) a vizsgálati vegyi anyag legalább egy koncentrációjánál (általában a legnagyobb pozitív koncentrációnál), valamint a negatív és a pozitív kontrolloknál. Negatív válasz esetén a negatív és a pozitív kontroll kis és nagy telepeinek mutációs gyakoriságát kell megadni.

54. A TK6 vizsgálatban az egyes tenyészetekre vonatkozólag meg kell adni a relatív túlélést, a mutánsok kiválasztásának idején mért kolóniaképző képességet, valamint a gyorsan és a lassan megjelenő mutánsoknál megfigyelt üres lyukak számát. A mutációs gyakoriságot a mutáns sejtek számának és a túlélő sejtek számának hányadosaként kell meghatározni, továbbá meg kell adni a teljes mutációs gyakoriságot, valamint a gyorsan és a lassan megjelenő mutánsok mutációs gyakoriságát (és/vagy a teljes mutációs gyakoriság arányát).

Elfogadhatósági kritériumok

55. Egy adott vizsgálati vegyi anyag összesített eredményeinek meghatározása előtt mind az egérlimfóma, mind a TK6 vizsgálatban teljesíteni kell az alábbi kritériumokat:

— Két kísérleti körülmény (rövid időtartamú kezelés metabolikus aktiválással és metabolikus aktiválás nélkül – lásd a 33. pontot) vizsgálatára került sor, kivéve, ha az egyik pozitív eredményeket hozott.

— Megfelelő számú sejt és koncentrációérték elemezhető (lásd a 27. és a 34–36. pontot).

— A legmagasabb koncentráció kiválasztására vonatkozó kritériumok összhangban vannak a 28–30. pontban ismertetett legmagasabb koncentrációkkal.

Negatív és pozitív kontrollok elfogadhatósági kritériumai

56. Miután az IWGT mlA szakértői munkacsoportja az egérlimfóma-vizsgálat ból származó adatok széles körét elemezte, nemzetközi konszenzus jött létre az egérlimfóma-vizsgálat ra vonatkozó konkrét elfogadhatósági kritériumokról (1) (2) (3) (4) (5). Ezért ez a vizsgálati módszer konkrét ajánlásokat fogalmaz meg a negatív és a pozitív kontrollok elfogadhatóságára, valamint az egérlimfóma-vizsgálatban tesztelt anyagok eredményeinek kiértékelésére vonatkozólag. A TK6 vizsgálat jelentősen kisebb adatbázissal rendelkezik, amelyet nem értékelt munkacsoport.

57. Az egérlimfóma-vizsgálat minden kísérletét értékelni kell abból a szempontból, hogy a kezeletlen/oldószeres kontroll teljesíti-e az IWGT mlA munkacsoportja által felállított elfogadhatósági kritériumokat ((4) és az alábbi 2. táblázat) a következő mutatók tekintetében: (1) mutációs gyakoriság (az IWGT eltérő mutációs gyakoriságot minősített elfogadhatónak az egérlimfóma-vizsgálat agarlemezes és mikrotiterlemezes vizsgálatánál), (2) a mutánsok kiválasztásának idején mért kolóniaképző képesség (CE) és (3) az oldószeres kontroll során tapasztalt szuszpenziós növekedés (SG) (a képleteket lásd a 2. függelékben).

2. táblázat

Az egérlimfóma-vizsgálat elfogadhatósági kritériumai

Paraméter	Lágyagar módszer	Mikrotiter módszer
Mutációs gyakoriság	$35–140 \times 10^{-6}$	$50–170 \times 10^{-6}$
Kolóniaképző képesség	65–120 %	65–120 %
Szuszpenziós növekedés	8–32-szeres (3–4 órás kezelés) 32–180-szoros (24 órás kezelés, ha végeztek ilyet)	8–32-szeres (3–4 órás kezelés) 32–180-szoros (24 órás kezelés, ha végeztek ilyet)

58. Az egérlimfóma-vizsgálatban minden kísérletet értékelni kell abból a szempontból is, hogy a pozitív kontroll(ok) teljesíti(k)-e az IWGT munkacsoport által kidolgozott két alábbi elfogadhatósági kritérium legalább egyikét:

— A pozitív kontrollnak elő kell idéznie a teljes mutációs gyakoriság abszolút növekedését, vagyis a spontán háttér mutációs gyakoriságot legalább 300×10^{-6} mértékben meghaladó növekedést kell kiváltania [indukált MF (IMF)]. A kis kolóniáknál megfigyelt mutációs gyakoriságnak legalább 40 %-ban indukált mutációs gyakoriságnak kell lennie.

— A pozitív kontrollnál a kis kolóniák mutációs gyakorisága legalább 150×10^{-6} mértékben haladja meg a párhuzamos kezeletlen/oldószeres kontrollnál tapasztalt mutációs gyakoriságot (azaz a kis kolóniák indukált mutációs gyakorisága 150×10^{-6}).

59. A TK6 vizsgálatban akkor elfogadhatók a kísérletek, amikor a párhuzamos negatív kontroll a 48–49. pont szerint belefoglalható a laboratórium negatív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisába. Ezenfelül a párhuzamos pozitív kontrolloknak (lásd a 32. pontot) a pozitív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisban generált válaszokkal összeegyeztethető válaszreakciókat, valamint a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva statisztikailag szignifikáns növekedést kell előidézniük.

60. Mindkét vizsgálat esetében a pozitív kontrolltenyészetnél megfigyelt citotoxicitás felső határának meg kell egyeznie a vizsgált kultúráknál tapasztalt citotoxicitás felső határával. Ez azt jelenti, hogy a relatív teljes növekedés/relatív túlélés nem csökkenhet 10 % alá. Elegendő egyetlen koncentrációt (több koncentrációérték használata esetén a pozitív kontrolltenyészetek egyik koncentrációját) vizsgálni annak igazolására, hogy a pozitív kontroll elfogadhatósági kritériumai teljesülnek. Emellett szükséges az is, hogy a pozitív kontroll mutációs gyakorisága a laboratórium által meghatározott elfogadhatósági tartományon belül legyen.

Az eredmények értékelése és értelmezése

61. Az IWGT egérlimfóma szakértői munkacsoportja jelentős munka keretében megállapította az egérlimfóma-vizsgálat pozitív válaszának biológiai relevanciáját és kritériumait (4). Ezért ez a vizsgálati módszer konkrét ajánlásokat fogalmaz meg az egérlimfóma-vizsgálatban tesztelt vizsgálati vegyi anyagok eredményeinek kiértékelésére vonatkozólag (lásd a 62–64. pontot). A TK6 vizsgálat jelentősen kisebb adatbázissal rendelkezik, amelyet nem értékelt munkacsoport. Ebből adódóan a TK6 vizsgálatból származó adatok értelmezésére vonatkozó ajánlások általánosabban fogalmaznak (lásd a 65–66. pontot). Mindkét vizsgálatra nézve megfogalmaztak kiegészítő ajánlásokat (lásd a 67–71. pontot).

EGÉRLIMFÓMA-VIZSGÁLAT

62. Ajánlatos egységes megközelítést alkalmazni a pozitív és negatív válaszok meghatározására, mert ez biztosítja a megnövekedett mutációs gyakoriság biológiai relevanciáját. A más vizsgálatoknál általánosan alkalmazott statisztikai elemzés helyett az egérlimfóma-vizsgálat egy előre meghatározott indukált mutációs gyakoriságot (vagyis a mutációs gyakoriság párhuzamos kontrollal összevetett növekedését) veszi alapul, az úgynevezett globális értékelési faktort (GEF), amely a részt vevő laboratóriumok által elvégzett negatív kontrollokból nyert mutációs gyakorisági adatok eloszlásának elemzése alapján került meghatározásra (4). A GEF az egérlimfóma-vizsgálat agarlemezes változata esetén 90×10^{-6}, mikrotiterlemezes változata esetén pedig 126×10^{-6}.

63. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen pozitívnak minősül, ha a vizsgált kísérleti körülmények bármelyikében (lásd a 33. pontot) a mutációs gyakoriság párhuzamos háttérértékhez viszonyított növekedése meghaladja a GEF-et, és a növekedés (pl. egy trendpróbával) koncentrációfüggést mutat. Ezt követően úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag képes mutációt előidézni ebben a vizsgálati rendszerben.

64. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen negatívnak minősül, ha a vizsgált kísérleti körülmények (lásd a 33. pontot) egyikében sem figyeltek meg koncentrációfüggő választ, illetve ha növekedett is a mutációs gyakoriság, a növekedés mértéke nem haladja meg a GEF-et. Ezt követően úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag ebben a vizsgálati rendszerben nem képes mutációt előidézni.

TK6

65. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen pozitívnak minősül, ha a vizsgált kísérleti körülmények bármelyikében (lásd a 33. pontot):

— legalább az egyik vizsgálati koncentráció statisztikailag szignifikáns növekedést mutat a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva,

— a megfelelő trendpróbával történő értékelés arra utal, hogy a növekedés koncentrációfüggő (lásd a 33. pontot),

— ezen eredmények bármelyike a negatív történeti kontrolladatok eloszlásán (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértéken) kívül esik; lásd a 48. pontot).

Mindezen kritériumok teljesülése esetén úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag képes mutációt előidézni ebben a vizsgálati rendszerben. A legmegfelelőbb statisztikai módszerekre vonatkozó ajánlások megtalálhatók a szakirodalomban (66) (67).

66. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen negatívnak minősül, ha valamennyi vizsgált kísérleti körülmény mellett (lásd a 33. pontot):

— a vizsgálati koncentrációk egyike sem mutat statisztikailag szignifikáns növekedést a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva,

— a megfelelő trendpróbával végzett értékelés nem mutat koncentrációfüggő növekedést,

— valamennyi eredmény a negatív történeti kontrolladatok eloszlásán (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértéken) belül van; lásd a 48. pontot).

Ezt követően úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag ebben a vizsgálati rendszerben nem képes mutációt előidézni.

Az egérlimfóma- és a TK6 vizsgálatra egyaránt vonatkozó szempontok:

67. Ha a legnagyobb koncentráció a citotoxicitáson alapul, a legmagasabb koncentrációval 10 és 20 % közötti relatív teljes növekedést/relatív túlélést kell megcélozni. Megegyezés szerint körültekintően kell eljárni a 10 és 20 % közötti relatív teljes növekedésnél/relatív túlélésnél jelentkező pozitív eredmények értékelése során, és az eredmények nem tekinthetők pozitívnak, ha a mutációs gyakoriság növekedése csak 10 %-os vagy az alatti relatív teljes növekedésnél/relatív túlélésnél tapasztalható (ha ez értékelt) (2) (59).

68. Bizonyos körülmények között további információk segítséget nyújthatnak egy adott vizsgálati vegyi anyag nem mutagén jellegének meghatározásához, amikor egyik tenyészetnél sem mutatható ki 10–20 %-os relatív teljes növekedés/relatív túlélés közé eső relatív teljes növekedés. Az alábbi helyzetek tartoznak ide: (1) A 100 % és 20 % közötti relatív teljes növekedési/relatív túlélési tartományba eső adatpontoknál nincsenek mutagenitásra utaló jelek (pl. nincs dózisfüggő válasz, a mutációs gyakoriság nem haladja meg a párhuzamos negatív kontrollét vagy a dokumentált háttérérték-tartományt stb.), és legalább egy adatpont a 20 % és 25 % közötti relatív teljes növekedési/relatív túlélési tartományba esik. (2) A 100 % és 25 % közötti relatív teljes növekedési/relatív túlélési tartományba eső adatpontoknál nincsenek mutagenitásra utaló jelek (pl. nincs dózisfüggő válasz, a mutációs gyakoriság nem haladja meg a párhuzamos negatív kontrollét vagy a dokumentált háttérérték-tartományt stb.), és egy negatív adatpont kissé a 10 %-os relatív teljes növekedés/relatív túlélés alatt helyezkedik el. A vizsgálati vegyi anyag mindkét helyzetben negatívnak minősíthető.

69. Az egyértelműen pozitív vagy negatív válasz igazolása nem követelmény.

70. Olyan esetekben, amikor a válaszreakció – a fentiekben leírtak szerint – nem egyértelműen negatív vagy pozitív, illetve egy adott eredmény biológiai relevanciája megállapításának alátámasztása érdekében az adatokat szakértői vélemény és/vagy további vizsgálatok alapján kell értékelni. Hasznos lehet egy megismételt kísérlet lehetőleg módosított kísérleti körülmények melletti elvégzése [pl. a koncentrációk felosztásának módosításával megnövelni a valószínűségét annak, hogy az adatpontok a 10–20 %-os relatív teljes növekedési/relatív túlélési tartományba esnek, más metabolikus aktiválási feltételek (S9 koncentrációjának vagy forrásának megváltoztatása) vagy más kezelési időtartam alkalmazása).

71. Ritka esetekben az adatkészlet – még további vizsgálatok után is – eleve kizárja a pozitív vagy negatív eredményekre vonatkozó következtetést. Ezért a vizsgálati vegyi anyag válaszreakcióját kétértelműnek kell minősíteni (amit úgy kell értelmezni, hogy egyenlő valószínűséggel tekinthető pozitívnak és negatívnak).

VIZSGÁLATI JELENTÉS

72. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag:

— eredet, gyártási szám, felhasználási határidő, ha rendelkezésre áll;

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, ha ismert;

— a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben, ha ismert;

— adott esetben a pH-érték, az ozmolalitás és a kicsapódás mérése abban a tápfolyadékban, amelyhez a vizsgálati vegyi anyagot hozzáadták.

Egy összetevőből álló anyag:

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai révén jellemezve.

Oldószer:

— az oldószer kiválasztásának indokolása;

— az oldószernek a végleges tápfolyadékon belüli aránya.

Sejtek:

Laboratóriumi törzstenyészetek esetén:

— a sejtek típusa és eredete, valamint a vizsgálólaboratóriumban rendelkezésre álló dokumentált adataik;

— kariotípus jellemzői és/vagy modális kromoszómaszám;

— a sejttenyészetek fenntartásának módszerei.

— a mikoplazmamentesség;

— sejt megduplázódási ideje.

Vizsgálati körülmények:

— a koncentrációk kiválasztásának és a sejttenyészetek számának indokolása; beleértve például a citotoxicitási adatokat és az oldhatóságra vonatkozó korlátokat;

— a közeg összetétele, CO_2-koncentráció, páratartalom;

— a vizsgálati vegyi anyag koncentrációja a tápfolyadékon belüli végső koncentrációjaként kifejezve (például µg vagy mg/a tápfolyadék ml-e vagy mM-ja);

— a tápfolyadékhoz adott oldószer és vizsgálati vegyi anyag koncentrációja (és/vagy térfogata);

— inkubációs hőmérséklet;

— inkubációs idő;

— a kezelés időtartama;

— sejtsűrűség a kezelés időtartama alatt;

— a metabolikus aktivációs rendszer típusa és összetétele (az S9 eredete, az S9 keverék elkészítési módszerei, az S9 keverék és az S9 koncentrációja vagy térfogata a végleges tápfolyadékban, az S9 minőségellenőrzése);

— pozitív és negatív kontrollként szolgáló anyagok, végső koncentráció az egyes kezelési körülmények esetén;

— az expressziós időszak hossza (beleértve a leültetett sejtek számát, a szubkultúrákat és a tápfolyadékok cseréjét, ha szükséges);

— a szelekciós ágens neve és koncentrációja;

— egérlimfóma-vizsgálat esetén jelezni kell az alkalmazott vizsgálat típusát (agarlemezes vagy mikrotiterlemezes);

— a vizsgálatok elfogadhatóságának kritériumai;

— az életképes és mutáns sejtek számának megállapítására használt módszerek;

— a citotoxicitás mérésére alkalmazott módszerek;

— a citotoxicitás és az alkalmazott módszer szempontjából lényeges kiegészítő információk;

— a leültetést követően végzett inkubálás időtartama;

— azon telepek meghatározása, amelyek méretét és típusát figyelembe vették (beleértve a „kis” és „nagy” telepekre vonatkozó kritériumokat is);

— azok a kritériumok, amelyek meghatározzák, hogy a vizsgálatok pozitívnak, negatívnak vagy többféleképpen értelmezhetőnek tekintendők-e;

— adott esetben a pH-érték, az ozmolalitás és a kicsapódás meghatározására alkalmazott módszerek.

Eredmények:

— az egyes tenyészetek esetében kezelt sejtek és átültetett sejtek száma;

— citotoxicitási paraméterek (egérlimfóma-vizsgálat esetében a relatív teljes növekedés, a TK6 esetében a relatív túlélés);

— a kicsapódás jelei és a meghatározás időpontja;

— a szelektív és nem szelektív folyadékba leültetett sejtek száma;

— a telepek száma a nem szelektív közegben és a rezisztens telepek száma a szelektív közegben, valamint az ezeknél tapasztalható mutációs gyakoriság;

— a negatív és pozitív kontrollok telepeinek mérete, és ha a vizsgálati vegyi anyag pozitív, legalább egy koncentráció és a hozzá kapcsolódó mutációs gyakoriság;

— amennyiben lehetséges, a koncentráció-válasz összefüggés;

— a párhuzamos negatív (oldószeres) és pozitív kontrollokra vonatkozó adatok (koncentrációk és oldószerek);

— történeti negatív (oldószeres) és pozitív kontroll adatok (koncentrációk és oldószerek), tartományokkal, átlagértékekkel és standard eltérésekkel; a dokumentált kontrolladatok alapjául szolgáló vizsgálatok száma;

— statisztikai elemzések (az egyes tenyészetek és adott esetben összevont párhuzamos tenyészetek tekintetében), valamint p-értékek, ha meghatározásra kerültek; és az egérlimfóma-vizsgálat esetében a GEF értékelése.

Az eredmények értékelése

Következtetések

SZAKIRODALOM

(1) Moore, M.M., Honma, M. Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, Environ. Mol. Mutagen., 35 (3): 185-190.

(2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), Environ. Mol. Mutagen., 40 (4): 292-299.

(3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, Mutation Res., 540: 127-140.

(4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, Environ. Mol. Mutagen., 47 (1): 1-5.

(5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. and Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, Mutation. Res., 627 (1): 36-40.

(6) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Párizs.

(7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. and O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. Mutation, Res., 746 (1): 21-28.

(8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. Mutation Res., 493 (1-2): 101-114.

(9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. and Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol*. Sci.., 109 (1): 96-105.

(10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. National. Academy. Sci. USA, 87 (1): 51-55.

(11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. and Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/$TK^{+/-}$ Leads to $TK^{-/-}$ Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, Mutation Res., 84 (1): 169-181.

(12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. and Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y $TK^{-/-}$ Mutants Early in their Clonal History, Mutation Res., 147 (5): 237-242.

(13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151 (1): 161-174.

(14) Liber H.L., Call K.M. and Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. Mutation Res., 178 (1): 143-153.

(15) Li C.Y., Yandell D.W. and Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In vitro*. Somat. Cell Mol. Genet., 18 (1): 77-87.

(16) Honma M., Hayashi M. and Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. Mutation. Res., 374 (1): 89-98.

(17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. Mol. Carcinogen., 28 (4): 203-14.

(18) Amundson S.A. and Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. Mutation Res., 267 (1): 89-95.

(19) Schisler M.R., Moore M.M. and Gollapudi B.B. (2013). *In vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$ −3.7.2C) Forward Mutation Assay. In Protocols in Genotoxicity Assessment A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27-50.

(20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. and Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634 (1-2): 177-183.

(21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. and Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutagen., 49 (6): 439-452.

(22) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. Environ. Mutagen., 8 (6): 879-886.

(23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268 (2): 297-305.

(24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257: 147-204.

(25) Wang J., Heflich R.H. and Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. Mutation Res., 626 (1-2): 185-190.

(26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In vitro*. Ann. N.Y. Academy Sci., 76: 673-680.

(27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/– Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutation Res., 59(1): 61-108.

(28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. and Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 147 (5): 243-253.

(29) Sawyer J.R., Moore M.M. and Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 214 (2): 181-193.

(30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. and Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y $TK^{+/-}$−3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Environ. Mol. Mutagen., 47 (2): 127-131.

(31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. and Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y $TK^{+}/^{-}$ Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, Environ. Mol. Mutagen., 55 (1): 35-42.

(32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. and DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y $TK^{+/-}$ Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. Mutation. Res., 373 (2): 157-165.

(33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. and Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. Mutagen., 19 (4): 263-268.

(34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. and Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. Biochem. Biophys. Res. Commun., 84 (2): 411-416.

(35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 45 (2-3): 162-176.

(36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. and Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. Cancer. Res., 55 (1): 12-15.

(37) Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscript in preparation).

(38) Lloyd M. and Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.

(39) Mei N., Guo X. and Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. In: Optimization in Drug Discover: *In vitro* Methods: Yan Z and Caldwell(Eds) , 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.

(40) Liber H.L. and Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. Mutation Res., 94 (2): 467-485.

(41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. and Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. ATLA, 33 (3): 261-287.

(42) Moore M.M. and Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, Mutation Res., 104 (4-5): 287-294.

(43) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31 (6): 347-364.

(44) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113 (3-4): 173-215.

(45) Natarajan, A.T., Tates, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. and De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37 (1): 83-90.

(46) Matsuoka A., Hayashi M. and Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In vitro*. Mutation Res., 66 (3): 277-290.

(47) Ong T.M., *et al.* (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. *Pathol. Toxicol.*, 4 (1): 55-65

(48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen., 7 (3): 175-177.

(49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(50) Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312 (3): 241-261.

(51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28 (1): 51-59.

(52) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP).

(53) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Genotoxic Effects of Airborne Agents Tice R.R., Costa D.L.and Schaich K.M. (Eds.). New York, Plenum, pp. 91-103.

(54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen., 5 (6): 795-801.

(55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. and Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. Mutation Res., 652 (2): 122-130.

(56) Arlett C.F., *et al*. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), CambridgeUniversity Press, pp. 66-101.

(57) Morita T., Honma M. and Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. Mutation Res., 741 (1-2): 32-56.

(58) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In vitro* Chromosome Aberrations Assay. Environ. Mol. Mutagen., 54 (1): 36-43.

(59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Elérhető a következő címen:[https://www.federalregister.gov/a/2012-13774].

(60) Honma M. and Hayashi M. (2011). Comparison of *In vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 52 (5): 373-384.

(61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. and Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient ($TK^{-/-}$) Mutants from L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res., 85 (5): 363-378.

(62) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. Mutation Res., 216 (1): 9-17.

(63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. and Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. Anal. Biochem., 110 (1): 1-8.

(64) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723 (2): 87-90.

(65) Ryan T.P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.

(66) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 199.), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(67) Fleiss J.L., Levin B. and Paik M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Aneugén: olyan vegyi anyag vagy folyamat, amely a mitózissal vagy meiózissal történő sejtosztódási ciklus elemeivel kölcsönhatásba lépve a sejtek vagy organizmusok aneuploidiáját eredményezi.

Aneuploidia: a normális diploid (vagy haploid) kromoszómaszámtól egyetlen kromoszómával vagy egynél több, szám feletti kromoszómával, de nem teljes kromoszómakészlettel (kromoszómakészletekkel) (poliploidia) való bármely eltérés.

Báziscserét okozó mutagének: azok a vegyi anyagok, amelyek a bázispárok szubsztitúcióját okozzák a DNS-ben.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Kolóniaképző képesség: azon alacsony sűrűséggel leültetett sejtek százalékaránya, amelyek képesek megszámolható teleppé fejlődni.

Klasztogén: bármely olyan vegyi anyag vagy folyamat, amely sejtek vagy szervezetek populációjában szerkezeti kromoszóma-rendellenességeket okoz.

Citotoxicitás: az e vizsgálati módszerbe tartozó vizsgálatok esetében a citotoxicitás az egérlimfóma-vizsgálat esetében a relatív teljes növekedés (RTG), a TK6 vizsgálat esetében a relatív túlélés (RS) csökkenését jelenti.

Forward (előremutató) mutáció: a mutáns alak szülőktől származó típusától eltérő olyan génmutáció, amely a kódolt protein enzimaktivitásának vagy funkciójának változását vagy elvesztését eredményezi.

Frameshiftet okozó mutagének: azok a vegyi anyagok, amelyek egy vagy több bázispár addícióját vagy delícióját okozzák a DNS-ben.

Genotoxikus: általános kifejezés, amely magába foglalja a DNS- vagy kromoszómakárosodás valamennyi típusát, köztük a DNS-töréseket, adduktok képződését, átrendeződéseket, mutációkat, kromoszómaaberrációkat és aneuploidiát. A genotoxikus hatások nem minden típusa eredményez mutációkat vagy stabil kromoszómakárosodást.

Mitotikus rekombináció: a mitózis során a homológ kromatidok rekombinációja, ami kettős szálú DNS-töréseket vagy a heterozigótaság elvesztését okozhatja.

Mutagén: örökletes elváltozást idéz elő a génekben lévő DNS-bázispár-szekvenciá(k)ban vagy a kromoszómák szerkezetében (kromoszómaaberrációk).

Mutációs gyakoriság: a megfigyelt mutáns sejtek száma elosztva az életképes sejtek számával.

Fenotípusos expresszió ideje: a kezelést követő időtartam, amely során a genetikai változás rögzül a genomban, és a korábban meglévő géntermékek olyan mértékben kiürülnek, hogy a fenotípus-tulajdonság megváltozik.

Relatív túlélés: A relatív túlélést a kezelés okozta citotoxicitás mutatójaként használják a TK6 vizsgálatban. A relatív túlélés a közvetlenül a sejtkezelést követően leültetett sejtek relatív kolóniaképző képessége (CE) kiigazítva a kezelés során a sejtszámban bekövetkezett veszteséggel, és összevetve a negatív kontroll kolóniaképző képességével.

Relatív szuszpenziós növekedés (RSG): Az egérlimfóma-vizsgálatban a vizsgált sejtkultúra relatív teljes kétnapos szuszpenziós növekedése összevetve a negatív/oldószeres kontroll teljes kétnapos szuszpenziós növekedésével (Clive and Spector, 1975). A relatív szuszpenziós növekedésnek magában kell foglalnia a vizsgált kultúra által a kezelési időszakban a negatív/oldószeres kontrollhoz viszonyítva elért relatív növekedést.

Relatív teljes növekedés (RTG): Az egérlimfóma-vizsgálat esetében a relatív teljes növekedést a kezelés okozta citotoxicitás mutatójaként használják. A relatív teljes növekedés a vizsgált kultúrák relatív (a vivőanyagos kontrollhoz viszonyított) növekedését méri a vizsgálat kezelési, kétnapos kifejeződési és a mutánsok kiválasztására szolgáló kolóniaképzési szakaszában. Az egyes vizsgált kultúrák relatív teljes növekedését megszorozzák a vizsgált kultúra mutánsok kiválasztásának idején mért relatív kolóniaképző képességével, és a negatív/oldószeres kontroll kolóniaképző képességének arányában fejezik ki (Clive and Spector, 1975).

S9 májfrakciók: 9 000 g centrifugálás utáni májhomogenátum felülúszója, azaz a nyers májextraktum.

S9 keverék: az S9 májfrakció és a metabolikus enzimaktivitáshoz szükséges kofaktorok keveréke.

Szuszpenziós növekedés: A sejtek számának növekedési faktora az egérlimfóma-vizsgálat kezelési és kifejeződési szakaszában. A szuszpenziós növekedés meghatározásához rövid idejű (3–4 órás) kezelésnél megszorozzák az 1. napon tapasztalt növekedési faktort a 2. napon észlelt növekedési faktorral. 24 órás kezelés alkalmazása esetén a szuszpenziós növekedés a 24 órás kezelés során mért növekedési faktor és az 1. és 2. expressziós napon mért növekedési faktorok szorzata.

Oldószeres kontroll: a csak a vizsgálati vegyi anyag feloldására használatos oldószert tartalmazó kontrolltenyészetek meghatározására szolgáló általános kifejezés.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Nem kezelt kontrollok: nem kezelt (azaz sem a vizsgálati vegyi anyaggal, sem oldószerrel nem kezelt), de a vizsgálati vegyi anyagot befogadó tenyészetekkel azonos módon feldolgozott tenyészetek.

2. függelék

KÉPLETEK

Citotoxicitás

Az egérlimfóma-vizsgálat mindkét (agarlemezes és mikrotiterlemezes) változatánál

A citotoxicitást a relatív teljes növekedés (RTG) alapján határozzák meg, amely magában foglalja a kétnapos expressziós időszak során elért relatív szuszpenziós növekedést (RSG) és a mutánsok kiválasztásának idején meghatározott relatív kolóniaképző képességet (RCE). Az RTG, az RSG és az RCE értékét százalékos arányszámként fejezik ki.

A relatív szuszpenziós növekedés (RSG) kiszámítása: Az 1. szuszpenziós növekedés (SG_1) az 1. napon a 0. naphoz képest megfigyelt növekedési sebesség (1. napi sejtkoncentráció/0. napi sejtkoncentráció), a 2. szuszpenziós növekedés (SG_2) pedig a 2. napon az 1. naphoz képest tapasztalt növekedési sebesség (2. napi sejtkoncentráció/1. napi sejtkoncentráció). Az RSG a kezelt kultúra teljes szuszpenziós növekedése ($SG_1 \times SG_2$) a kezeletlen/oldószeres kontrollhoz viszonyítva. Azaz: $RSG = [SG_{1(vizsgált)} \times SG_{2(vizsgált)}] / [SG_{1(kontroll)} \times SG_{2(kontroll)}]$ Az SG_1 értékét a sejtkezelés kezdetén használt induló sejtkoncentráció alapján kell meghatározni. Ezzel megállapíthatók a vizsgált kultúrá(k)ban a sejtkezelés során a citotoxicitás terén bekövetkezett változások.

Az RCE a vizsgált kultúra relatív kolóniaképző képességének és a kezeletlen/oldószeres kontroll relatív kolóniaképző képességének aránya, amelyet a mutánsok kiválasztásának időpontjában határoznak meg.

Relatív teljes növekedés (RTG): $RTG=RSG \times RCE$

TK6

Relatív túlélés (RS):

A citotoxicitást a relatív túlélés alapján értékelik, ami a közvetlenül a kezelést követően leültetett sejtek kolóniaképző képessége (CE), kiigazítva a kezelés során a sejtszámban bekövetkezett veszteséggel, és összevetve a negatív kontrollok (túlélési arányuk 100 %-nak tekintendő) kolóniaképző képességével. A kezelés során végbement sejtpusztulás miatt szükséges kiigazítás az alábbi módon számítható ki:

$$\text{Kiigazított CE} = \text{CE} \times \frac{\textit{A sejtek száma a kezelés kezdetén}}{\textit{A sejtek száma a kezelés végén}}$$

A vizsgálati vegyi anyaggal kezelt tenyészetek relatív túlélése az alábbi módon határozható meg:

$$\textit{Relatív túlélés} = \frac{\textit{Kiigazított kolóniaképző készség kezelt tenyészetben}}{\textit{Kiigazított kolóniaképző készség oldószeres kontrollban}} \times 100$$

Mutációs gyakoriság az egérlimfóma- és a TK6 vizsgálat esetében

A mutációs gyakoriság (MF) a szelektív közegben növő mutáns telepek kolóniaképző képességének (CE_M) és a nem szelektív közegben fejlődő telepek kolóniaképző képességének (CE_V) aránya, amelyet a mutánsok kiválasztásának időpontjában határoznak meg. Azaz: $MF=CE_M/CE_V$. E két kolóniaképző készséget az agarlemezes és a mikrotiterlemezes kolóniaképző módszer esetén az alábbiakban leírtak szerint kell meghatározni.

***Az egérlimfóma-vizsgálat agarlemezes változata*:** Az egérlimfóma-vizsgálat lágyagarlemezes változatában a szelekciós lemezen lévő telepek száma (C_M) és a nem szelekciós, vagyis a kolóniaképző képesség (életképesség) meghatározására szolgáló lemezen lévő telepek száma (C_V) a kolóniák közvetlen megszámlálásával állapítható meg. Amikor 600 sejtet ültetnek le a szelekciós lemezek (C_M) és a nem szelekciós, vagyis a kolóniaképző képesség (életképesség) meghatározására szolgáló lemezek (C_V) kolóniaképző képességének (CE) meghatározásához, és 3×10^6 sejtet használnak a mutánsok kiválasztására, akkor:

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

Mikrotiterlemezes egérlimfóma- és a TK6 vizsgálat: Az egérlimfóma-vizsgálat mikrotiterlemezes változatában a C_M és a C_V értékét a mikrotiterlemezek teljes lyukszámának (TW) és a lyukankénti telepek feltételezhető számának (P) szorzataként határozzák meg.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

A Poisson-elosztás nulla valószínűségi változójából kiindulva (Furth és munkatársai, 1981) a P-t a következő módon kapjuk meg:

$$P = - \ln (EW / TW)$$

Ahol az EW az üres lyukak, a TW pedig az összes lyuk száma. Ebből következően:

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

Az egérlimfóma-vizsgálat mikrotiterlemezes változatában a kis és nagy telepek mutációs gyakoriságát azonos módon határozzák meg, a kis és nagy telepek üres lyukainak száma alapján.

A TK6 vizsgálatban a kis és nagy telepek mutációs gyakoriságát a gyorsan és a lassan megjelenő mutánsok száma alapján állapítják meg.

B.68. RÖVID EXPOZÍCIÓS IDEJŰ IN VITRO VIZSGÁLATI MÓDSZER i. A SÚLYOS SZEMKÁROSODÁST OKOZÓ VEGYI ANYAGOK ÉS ii. A SZEMIRRITÁCIÓ VAGY A SÚLYOS SZEMKÁROSODÁS TEKINTETÉBEN BESOROLÁST NEM IGÉNYLŐ VEGYI ANYAGOK AZONOSÍTÁSÁRA

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 491. vizsgálati iránymutatásában (2017) leírt módszerrel. A rövid expozíciós idejű (STE) vizsgálati módszer egy *in vitro* eljárás, amely bizonyos helyzetekben és meghatározott korlátok mellett alkalmazható a súlyos szemkárosodást okozó, valamint a súlyos szemkárosodás vagy szemirritáció tekintetében besorolást nem igénylő vegyi anyagok (anyagok és keverékek) veszélyességi osztályba sorolására és címkézésére, az Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) által kidolgozott, vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszerében (GHS) (1), valamint az Európai Unió (EU) anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendeletében (CLP-rendelet) ([1]) meghatározottak szerint.

2. A vegyi anyagok szemet érintő veszélyességi potenciáljának értékelése évek óta elsősorban egy nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálattal (az OECD 405. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű B.5. vizsgálati módszerrel (8)) történik. Általánosan elfogadott, hogy az előre látható jövőben egyetlen alternatívaként használható *in vitro* vizsgálat sem tudja majd teljes körűen helyettesíteni a nyulakon végzett szemvizsgálatot a különböző kémiai osztályoknál felmerülő súlyos szemkárosodási/szemirritációs válaszreakciók teljes skálájának előrejelzésében. Előfordulhat azonban, hogy egy-egy (többszintű) vizsgálati stratégián belüli alternatív vizsgálati módszerek stratégiai kombinációja teljes körűen helyettesíteni tudja a nyulakon végzett szemvizsgálatot (2). A felülről építkező megközelítést olyan vegyi anyagok vizsgálatához dolgozták ki, amelyek a rendelkezésre álló információk alapján várhatóan rendkívül irritáló hatásúak lehetnek, vagy súlyos szemkárosodást idézhetnek elő. Ezzel szemben az alulról építkező megközelítés olyan vegyi anyagok vizsgálatához alkalmazandó, amelyek a meglévő információk alapján várhatóan nem okoznak a besorolás szükségességéhez elegendő szemirritációt. Bár a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer nem helyettesíti teljes körűen a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálatot, többszintű vizsgálati stratégia – például felülről vagy alulról építkező megközelítés – részeként, szabályozói követelmények szerinti osztályozásra és címkézésre alkalmazva azonban használható arra, hogy további vizsgálatok szükségessége nélkül azonosítsa i. a súlyos szemkárosodást okozó (vagyis az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozó) vegyi anyagokat és ii. a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő (azaz az ENSZ-GHS/CLP-rendelet „Kategória nélküli” csoportjába tartozó) vegyi anyagokat (kivéve a rendkívül illékony anyagokat és a felületaktív anyagoktól eltérő szilárd vegyi anyagokat) (1) (2). Azok a vegyi anyagok azonban, amelyek a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer alapján előreláthatólag nem okoznak súlyos szemkárosodást (ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategória), vagy az ENSZ-GHS/CLP-rendelet „Kategória nélküli” csoportjába tartoznak (nem váltanak ki sem szemirritációt, sem súlyos szemkárosodást), a végleges osztályba sorolásukhoz további vizsgálatot tesznek szükségessé. Ezenfelül a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszernek az ENSZ-GHS/CLP-rendelettől eltérő osztályozási rendszeren belüli, alulról építkező megközelítés keretében történő alkalmazásáról egyeztetni kell a megfelelő szabályozó hatóságokkal. A legmegfelelőbb vizsgálati módszer kiválasztásához és e vizsgálati módszer alkalmazásához a súlyos szemkárosodási és bőrirritációs vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről szóló OECD-iránymutatás nyújt támpontokat (14).

3. E vizsgálati módszer ismerteti azokat az eljárásokat, amelyek felhasználhatók a vizsgálati vegyi anyagok szemet érintő veszélyességi potenciáljának értékelésére az alapján, hogy képesek-e a rövid expozíciós idejű vizsgálati rendszerben citotoxicitást kiváltani. A vegyi anyagoknak a szaruhártya felhámsejtjeire gyakorolt citotoxikus hatása fontos hatásmechanizmus, ami a szaruhártya felhámjának károsodásához és szemirritációhoz vezet. A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszerben a sejtek életképességét az alapján mérik, hogy az MTT (3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid), más néven tiazolil kék tetrazólium-bromid vitális festéket élő sejtek enzimatikus úton kék formazán kristállyá alakítják, amelynek mennyiségét a sejtekből történő kivonás után meghatározzák (3). Az ily módon megállapított sejtéletképességet összevetik az oldószeres kontrollnál mért életképességgel (ez a relatív életképesség), majd ennek alapján megbecsülik a vizsgálati vegyi anyag szemet érintő veszélyességi potenciálját. Egy adott vizsgálati vegyi anyagot akkor sorolnak az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába, ha 5 %-os és 0,05 %-os koncentrációja egyaránt 70 %-os vagy az alatti (≤ 70 %) sejtéletképességet idéz elő. Ezzel szemben akkor jelzik előre, hogy valamely vizsgálati vegyi anyag az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerint „Kategória nélküli”, ha 5 %-os és 0,05 %-os koncentrációja egyaránt 70 %-ot meghaladó (> 70 %) sejtéletképességet eredményez.

4. E vizsgálati módszer esetében a „vizsgálati vegyi anyag” kifejezés a vizsgálat tárgyát képező vegyi anyagra vonatkozik, és nem a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer anyagok és/vagy keverékek vizsgálatára való alkalmazhatóságához kapcsolódik. A fogalmak meghatározása a függelékben található.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

5. Ez a vizsgálati módszer a Kao Corporation által kidolgozott protokollon alapul (4), amelyen két különböző validálási vizsgálatot végeztek el: az egyiket a japán állatkísérletek alternatív módszereivel foglalkozó társaság validálásért felelős

([1]) Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról (HL L 353/1., 2008.12.31.).

bizottsága (JSAAE) (5), a másikat pedig a japán alternatív módszerek validálásával foglalkozó központ (JaCVAM) (6) hajtotta végre. A validálási tanulmány jelentései és vizsgálati módszer felülvizsgálatára vonatkozó háttérdokumentumok alapján a NICEATM/ICCVAM szakértői vizsgálatot végzett (7).

6. A súlyos szemkárosodást okozó (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozó) (1) vegyi anyagok (anyagok és keverékek) azonosítására történő alkalmazásakor a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer 125 (anyagokat és keverékeket is tartalmazó) vegyi anyag vizsgálata során nyert adatainak általános pontossága 83 % (104/125), álpozitív aránya 1 % (1/86), álnegatív aránya pedig 51 % (20/39) a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálat adataival való összevetéskor (7). Az álnegatív eredmények aránya ebben az összefüggésben nem kritikus jelentőségű, mivel minden 5 %-os koncentrációban legfeljebb 70 %-os, és 0,05 %-os koncentrációban 70 %-nál nagyobb sejtéletképességet kiváltó vizsgálati vegyi anyag vizsgálatára sor kerülne más, megfelelően validált *in vitro* vizsgálati módszerekkel, vagy – a szabályozási követelményektől függően, és a jelenleg ajánlott lépcsőzetes vizsgálati stratégiával és bizonyítékok súlyozásán alapuló megközelítéssel összhangban (1) (8) – utolsó lehetőségként nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálattal. Elsősorban egy összetevőből álló anyagok vizsgálatára került sor, bár a keverékek vizsgálatára vonatkozóan is rendelkezésre áll korlátozott mennyiségű információ. A vizsgálati módszer mindazonáltal a több összetevőből álló anyagok és keverékek vizsgálatára technikailag alkalmazható. E vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt azonban meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény. A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer nem mutat egyéb hiányosságokat az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozó vizsgálati vegyi anyagok azonosítására történő alkalmazásakor. A vizsgálók mérlegelhetik e vizsgálati módszer vizsgálati vegyi anyagon való alkalmazását, amely esetben az 5 %-os és 0,05 %-os koncentrációban egyaránt legfeljebb 70 %-os sejtéletképességet további vizsgálat nélkül az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába sorolandó súlyos szemkárosodást okozó reakcióra utaló jelként kell elfogadni.

7. A szemirritáció és a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet „Kategória nélküli" csoportjába tartozó) vegyi anyagok (anyagok és keverékek) azonosítására történő alkalmazásakor a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer 130 (anyagokat és keverékeket is tartalmazó) vegyi anyag vizsgálata során nyert adatainak általános pontossága 85 % (110/130), álnegatív aránya 12 % (9/73), álpozitív aránya pedig 19 % (11/57) a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálat adataival való összevetéskor (7). Amikor a rendkívül illékony anyagok és a felületaktív anyagoktól eltérő szilárd vegyi anyagok nem szerepelnek az adatbázisban, a vizsgálati módszer általános pontossága 90 %-ra (92/102), álnegatív aránya 2 %-ra (1/54), álpozitív aránya pedig 19 %-ra (9/48) javul (7). Ebből következően a szemirritáció és a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet „Kategória nélküli" csoportjába tartozó) vizsgálati vegyi anyagok azonosítására történő alkalmazásakor a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer potenciális hiányossága az álnegatív eredmények magas aránya i. a 6 kPa-t meghaladó gőznyomású rendkívül illékony anyagok, valamint ii. a felületaktív anyagoktól eltérő szilárd vegyi anyagok (anyagok és keverékek) és a kizárólag felületaktív anyagokból álló keverékek körében. Ezeket a vegyi anyagokat kizárják a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer alkalmazási köréből (7).

8. A 6. és a 7. pontban említett vegyi anyagokon túlmenően a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer adatbázisa magában foglalja 40 keverék belső vizsgálatokból származó adatait is, amelyek pontossága 88 % (35/40), álpozitív aránya 50 % (5/10), álnegatív aránya pedig 0 % (0/30) a Draize-féle *in vivo* szemvizsgálathoz képest, az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti osztályozási rendszerben besorolást nem igénylő keverékek előrejelzése terén (9). Ezért a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer alulról építkező megközelítés részeként alkalmazható az ENSZ-GHS/CLP-rendelet „Kategória nélküli" csoportjába tartozó keverékek azonosítására, kivételt képeznek ez alól – a szilárd anyagokra vonatkozó korlátozás kiterjesztésével – a csak felületaktív anyagokból álló keverékektől eltérő szilárd keverékek. Ezenfelül a 6 kPa-t meghaladó gőznyomású anyagokat tartalmazó keverékeket az esetleges alulkategorizálás elkerülése érdekében körültekintően kell értékelni, és előrejelzett besorolásukat eseti alapon kell megindokolni.

9. Az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozó, de a 2., 2A. vagy 2B. kategóriába alulosztályozott vegyi anyagok, valamint az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti „Kategória nélküli" csoportba tartozó, de a 2., 2A. vagy 2B. kategóriába felülosztályozott vegyi anyagok jelentős száma miatt a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer nem alkalmazható a vizsgálati vegyi anyagok ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 2. kategóriába tartozóként, illetve ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 2A. kategóriába (szemirritáló hatású) vagy 2B. kategóriába (enyhén szemirritáló hatású) tartozóként történő azonosítására (7). E célból egy másik megfelelő módszerrel végzett további vizsgálatra lehet szükség.

10. A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer olyan vizsgálati vegyi anyagokhoz alkalmazható, amelyek oldhatók vagy legalább 5 perc alatt egyenletesen felszuszpendálhatók fiziológiás sóoldatban, 5 % dimetil-szulfoxidot (DMSO) tartalmazó sóoldatban vagy ásványolajban. A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer nem alkalmazható olyan vizsgálati vegyi anyagokhoz, amelyek nem oldhatók vagy egyenletesen nem szuszpendálhatók legalább 5 perc alatt fiziológiás sóoldatban, 5 % DMSO-t tartalmazó sóoldatban vagy ásványolajban. A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszerben az ásványolaj használatát a rövid expozíciós idő teszi lehetővé. Ennek köszönhetően a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer alkalmas vízben oldhatatlan vizsgálati vegyi anyagok (pl. hosszú láncú zsíralkoholok vagy ketonok) szemet érintő veszélyességi potenciáljának előrejelzésére, amennyiben azok elegyednek legalább a három fent javasolt oldószer egyikében (4).

11. E vizsgálati módszer esetében a „vizsgálati vegyi anyag" kifejezés a vizsgálat tárgyát képező vegyi anyagra vonatkozik ([1]) és nem a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer anyagok és/vagy keverékek vizsgálatára való alkalmazhatóságához kapcsolódik.

A VIZSGÁLAT ELVE

12. A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer egy citotoxicitáson alapuló *in vitro* vizsgálat, amelyet 96 lyukú polikarbonát mikrolemezen tenyésztett, konfluens egyrétegű SIRC-sejteken (a Statens Serum Institut által előállított nyúl szaruhártya sejteken) hajtanak végre (4). A sejteket öt percen át kezelik a vizsgálati vegyi anyaggal, majd MTT-vizsgálattal mennyiségileg meghatározzák a citotoxicitást, amit a SIRC-sejtek relatív életképességeként fejeznek ki (4). A sejtéletképesség csökkenése alapján jelzik előre a szemkárosodáshoz vezető potenciális káros hatásokat.

13. A vizsgálati jelentés szerint a nyúl szemébe csepegtetett oldatok 80 %-a három–négy percen belül kiürül a kötőhártyazsákon keresztül, míg az emberi szembe csepegtetett oldatok több mint 80 %-a egy–két percen belül kiürül (10). A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer igyekszik közelíteni egymáshoz ezeket az expozíciós időket, és a citotoxicitás mint végpont révén értékeli, hogy a vizsgálati vegyi anyaggal történő ötperces kezelésüket követően milyen mértékű károsodás keletkezett a SIRC-sejtekben.

A JÁRTASSÁG BIZONYÍTÁSA

14. A vizsgálati módszerben ismertetett rövid expozíciós idejű eljárás rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak az 1. táblázatban ajánlott tizenegy anyag megfelelő besorolásával igazolniuk kell szakmai jártasságukat. Ezeket az anyagokat úgy választották ki, hogy a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálat (405. vizsgálati iránymutatás) eredményei és az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti osztályozási rendszer (1) alapján a súlyos szemkárosodási vagy szemirritációs válaszreakciók teljes tartománya szempontjából reprezentatívak legyenek. A kiválasztás másik kritériuma az volt, hogy az anyagok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők legyenek, azokra vonatkozóan magas minőségű *in vivo* referenciaadatok álljanak rendelkezésre, és a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszerből származó, magas minőségű *in vitro* adatok álljanak rendelkezésre (3). Ha a jegyzékben szereplő valamely anyag nem áll rendelkezésre, illetve ha indokolható, megfelelő *in vivo* és *in vitro* referenciaadatokkal rendelkező más anyag is használható, amennyiben kiválasztása az itt ismertetett kritériumok szerint történik.

1. táblázat

A jártassági tesztanyagok jegyzéke

Anyag	CAS-szám	Kémiai osztály ([1])	Halmazállapot	*In vivo* ENSZ-GHS/CLP kat. ([2])	Rövid expozíciós idejű vizsgálat oldószere	Rövid expozíciós idejű vizsgálat ENSZ-GHS/CLP kat.
Benzalkónium-klorid (10 %, vizes oldat)	8001-54-5	Óniumvegyület	Folyadék	1. kategória	Sóoldat	1. kategória

([1]) 2013 júniusában az OECD együttes ülése megállapodott abban, hogy ahol csak lehetséges, az új és átdolgozott vizsgálati módszerekben következetesebben alkalmazzák a „vizsgálati vegyi anyag" kifejezést a vizsgálat tárgyát képező vegyi anyagra.

Anyag	CAS-szám	Kémiai osztály ([1])	Halmazállapot	*In vivo* ENSZ-GHS/CLP kat. ([2])	Rövid expozíciós idejű vizsgálat oldószere	Rövid expozíciós idejű vizsgálat ENSZ-GHS/CLP kat.
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Éter	Folyadék	1. kategória	Sóoldat	1. kategória
Acid Red 92	18472-87-2	Heterociklikus vegyület; Brómvegyület; Klórvegyület	Szilárd	1. kategória	Sóoldat	1. kategória
Nátrium-hidroxid	1310-73-2	Lúg; Szervetlen vegyi anyag	Szilárd	1. kategória ([3])	Sóoldat	1. kategória
Butirolakton	96-48-0	Lakton; Heterociklikus vegyület	Folyadék	2A. kategória (CLP szerinti 2. kategória)	Sóoldat	Előrejelzés nem végezhető
1-oktanol	111-87-5	Alkohol	Folyadék	2A./B. ([4]) kategória (CLP szerinti 2. kategória)	Ásványolaj	Előrejelzés nem végezhető
Ciklopentanol	96-41-3	Alkohol; Szénhidrogén, ciklikus	Folyadék	2A./B. ([5]) kategória (CLP szerinti 2. kategória)	Sóoldat	Előrejelzés nem végezhető
2-etoxietil-acetát	111-15-9	Alkohol; Éter	Folyadék	Kategória nélküli	Sóoldat	Kategória nélküli
Dodekán	112-40-3	Szénhidrogén, aciklikus	Folyadék	Kategória nélküli	Ásványolaj	Kategória nélküli
Metil-izobutil-keton	108-10-1	Keton	Folyadék	Kategória nélküli	Ásványolaj	Kategória nélküli

Anyag	CAS-szám	Kémiai osztály ([1])	Halmazállapot	*In vivo* ENSZ-GHS/CLP kat. ([2])	Rövid expozíciós idejű vizsgálat oldószere	Rövid expozíciós idejű vizsgálat ENSZ-GHS/CLP kat.
1,1-Dimetil-guanidin-szulfát	598-65-2	Amidin; Kénvegyület	Szilárd	Kategória nélküli	Sóoldat	Kategória nélküli

([1]) A kémiai osztályba sorolásra a NICEATM korábbi publikációiban szereplő információk alapján került sor, illetve ilyen információk hiányában a Medicine's Medical Subject Headings (MeSH®) nemzeti könyvtárának adatai alapján (a ChemIDplus®-on [Nemzeti Orvostudományi Könyvtár] keresztül, elérhető a http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/ címen), az anyagok szerkezete pedig a NICEATM alapján került meghatározásra.

([2]) A nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálat (az OECD 405. vizsgálati iránymutatása) eredményei alapján és az ENSZ-GHS/CLP-rendelet (1) felhasználásával.

([3]) Az 1. kategóriába sorolásának alapja a 100 %-os nátrium-hidroxid bőrkorróziós hatása (bőrkorróziós hatású jártassági tesztanyagként szerepel az OECD 435. vizsgálati iránymutatásában) és az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategória kritériumai (1).

([4]) A 2A. vagy 2B. kategóriába sorolás az ENSZ-GHS rendszerének a két kategória megkülönböztetésére szolgáló kritériuma értelmezésétől függ, azaz hat állatból kettőnél, illetve hat állatból négynél a hetedik napig fennmaradó hatások szükségesek a 2A. kategóriába soroláshoz. Az *in vivo* adatbázis 2 tanulmányon alapul, amelyek mindegyikét három állaton végezték el. Az egyik tanulmányban háromból két állaton a 7. napon is tapasztalhatók voltak a hatások, ami igazolta a 2A. kategóriába sorolást (11), míg a második tanulmányban mindhárom állatnál minden végpont teljesen meggyógyult (a hatást értékelő pontszám nulla volt), így az anyagot a 2B. kategóriába sorolták (12).

([5]) A 2A. vagy 2B. kategóriába sorolás az ENSZ-GHS rendszerének a két kategória megkülönböztetésére szolgáló kritériuma értelmezésétől függ, azaz három állatból egynél, illetve három állatból kettőnél a hetedik napig fennmaradó hatások szükségesek a 2A. kategóriába soroláshoz. Az *in vivo* vizsgálatot három állaton végezték. Az egy állaton megfigyelt szaruhártya-opálosodástól és kötőhártya-vörösségtől eltekintve minden végpont a 7. napra vagy már korábban teljesen begyógyult (a hatást értékelő pontszáma nulla volt). Annak az egy állatnak, amely nem gyógyult meg teljesen a hetedik napra, mind a szaruhártya opálosodását, mind a kötőhártya vörösségét értékelő pontszáma 1 volt (a 7. napon), majd a 14. napra teljesen meggyógyult (11).

Rövidítések: CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám.

ELJÁRÁS

Egyrétegű sejttenyészet elkészítése

15. A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszerhez nyúl szaruhártya eredetű sejtvonalat, SIRC-et kell használni. Ajánlatos a SIRC-sejteket egy megfelelő minősítéssel rendelkező sejtbankból, például az Amerikai Fajtakultúra Gyűjteményből (CCL60) beszerezni.

16. A SIRC-sejteket 10 % magzati borjú szérummal (FBS), 2 mM L-glutaminnal, 50–100 egység/ml penicillinnel és 50–100 µg/ml sztreptomicinnel kiegészített Eagle-féle minimum esszenciális tápfolyadékot (MEM) tartalmazó sejttenyésztő edényben, valamint 37 °C-os, 5 %-os CO_2-tartalmú és vízgőzzel telített környezetben kell tenyészteni. A sejttenyésztő edényben konfluenssé vált sejteket tripszin-etilén-diamin-tetraecetsavas oldattal fel kell szuszpendálni, sejtkaparó használatával vagy anélkül. A rutinszerű vizsgálat megkezdése előtt a sejteket (2–3 passzálással) felszaporítják a sejttenyésztő edényben, felolvasztás után azonban legfeljebb 25 passzálásig tartják fenn.

17. Ezt követően a rövid expozíciós idejű vizsgálatban való felhasználásra kész sejteket megfelelő sűrűségben előkészítik, majd kiszélesztik 96 lyukú lemezekbe. A sejtek ajánlott kiszélesztési sűrűsége lyukanként $6{,}0 \times 10^3$ sejt, ha a sejtek a kiszélesztést követő negyedik napon kerülnek felhasználásra, illetve lyukanként $3{,}0 \times 10^3$ sejt, ha a sejteket a kiszélesztést követő ötödik napon használják fel, a tenyésztéshez használt térfogat 200 µl. A rövid expozíciós idejű vizsgálathoz használt, megfelelő sűrűségben kiszélesztett sejtek a vizsgálat idejére, vagyis az átoltást követő negyedik vagy ötödik napra 80 %-ot meghaladó konfluenciával rendelkeznek majd.

A vizsgálati vegyi anyagok és a kontrollanyagok alkalmazása

18. A vizsgálati vegyi anyagok feloldásához vagy szuszpendálásához alkalmazott oldószer tekintetében a fiziológiás sóoldat legyen az első választás. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag rosszul oldódik, vagy legalább öt percig nem lehet egyenletesen szuszpendálni a sóoldatban, akkor az 5 % DMSO-t (CAS-száma: 67-68-5) tartalmazó sóoldat legyen a második választás. Azon vizsgálati vegyi anyagok esetében, amelyek sem sóoldatban, sem 5 % DMSO-t tartalmazó sóoldatban nem oldhatók vagy nem szuszpendálhatók egyenletesen legalább öt percig, az ásványolaj (CAS-száma: 8042-47-5) legyen a harmadik választás.

19. A vizsgálati vegyi anyagot 5 tömegszázalékos koncentrációban feloldják vagy egyenletesen szuszpendálják a választott oldószerben, majd tízszeres oldatsorozatot létrehozva további hígítással elkészítik 0,5 %-os és 0,05 %-os koncentrációját. Minden vizsgálati vegyi anyagot tesztelni kell 5 %-os és 0,05 %-os koncentrációban is. A 96 lyukú lemezen fenntartott sejtkultúrákat szobahőmérsékleten öt percen át kezelik a lyukanként 200 µl mennyiségű vizsgálati vegyi anyag 5 %-os vagy 0,05 %-os koncentrációjú oldatával (vagy szuszpenziójával). A vizsgálati vegyi anyagok (egy vagy több összetevőből álló anyagok, illetve keverékek) nagyjából tisztának tekintendők, ha a vizsgálati módszerben meghatározottak szerint hígítják vagy szuszpendálják őket, függetlenül a valós tisztaságuktól.

20. A 16. pontban ismertetett tápoldatot kell vivőanyagos kontrollként használni az összes ismétlés valamennyi lemezén. Emellett a sejteket az összes ismétlés minden lemezén vizsgálni kell oldószeres kontrollmintákban is. A 18. pontban felsorolt oldószerekről bizonyítást nyert, hogy nem befolyásolják károsan a SIRC-sejtek életképességét.

21. A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszerben az összes ismétlés valamennyi lemezén 0,01 % nátrium-lauril-szulfátot (SLS) tartalmazó sóoldatot kell használni pozitív kontrollként. A pozitív kontroll sejtéletképességének meghatározása érdekében minden ismétlés összes lemezének tartalmaznia kell egy sóoldatos oldószeres kontrollt is.

22. Egy vakpróbára is szükség van az optikai sűrűség kompenzálásának meghatározásához, a vakpróbához használt lyukak csak foszfátpuffert tartalmazó sóoldatot tartalmaznak, nincs bennük se kalcium és magnézium (PBS-), se sejt.

23. Minden egyes mintát (az 5 %-os és 0,05 %-os koncentrációjú vizsgálati vegyi anyagot, a tápoldatos kontrollt, az oldószeres kontrollt és a pozitív kontrollt) minden ismétlés során triplikátumban kell vizsgálni úgy, hogy a sejteket szobahőmérsékleten öt percig kezelik a megfelelő vizsgálati vagy kontrollanyag 200 µl-ével.

24. A referenciaanyagok jól használhatók egy adott vegyianyag- vagy termékosztályba tartozó ismeretlen vegyi anyagok szemirritációs hatásának értékelésére vagy valamely szemirritációs anyag relatív irritatív hatásának az irritatív hatás egy adott tartományán belüli értékelésére.

A sejtek életképességének mérése

25. A kezelést követően a sejteket kétszer átmossák 200 µl foszfátpuffert tartalmazó sóoldattal, majd hozzáadnak 200 µl MTT-oldatot (0,5 mg MTT/ml tápoldat). Két óra inkubációt (37 °C, 5 % CO_2) követően az MTT-oldatot leszűrik, majd az MTT-formazán kivonásához 200 µl 0,04 N izopropanolos sósavval 60 percen át kezelik sötétben és szobahőmérsékleten, végül 570 nm-en mikrotiterlemez-olvasóval megmérik az MTT-formazán oldat abszorbanciáját. A vizsgálati vegyi anyagok csak abban az esetben befolyásolják az MTT-vizsgálat eredményét (színező vagy közvetlen MTT-redukáló hatásuk révén), ha a kezelést követő átmosás után jelentős mennyiségű vizsgálati vegyi anyag marad a vizsgálati rendszerben, ami előfordul a 3D-s rekonstruált emberi szaruhártya modell vagy a rekonstruált emberi felhámmodell szövetei esetén, azonban a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszerben használt 2D-s sejtkultúrákra nem jellemző.

Az eredmények értelmezése és az előrejelzési modell

26. Ezt követően az egyes vizsgálati vegyi anyagokra vonatkozó optikai sűrűség (OD) értéket kell felhasználni a 100 %-nak vett oldószeres kontrollhoz viszonyított sejtéletképesség kiszámításához. A százalékban kifejezett relatív sejtéletképességet úgy számolják ki, hogy a vizsgálati vegyi anyag OD-értékét elosztják az oldószeres kontroll OD-értékével, miután mindkét értékből kivonták a vakpróba OD-értékét.

$$\textit{Sejtéletképesség}(\%) = \frac{(\textit{a vizsgálati vegyi anyag } OD_{570}\textit{értéke}) - (\textit{a vakpróba } OD_{570}\textit{értéke})}{(\textit{az oldószeres kontroll } OD_{570}\textit{értéke}) - (\textit{a vakpróba } OD_{570}\textit{értéke})} \times 100$$

Hasonlóképpen határozzák meg az egyes oldószeres kontrollok százalékban kifejezett relatív sejtéletképességét is: minden oldószeres kontroll OD-értékét elosztják a tápoldatos kontroll OD-értékével, miután mindkét értékből kivonták a vakpróba OD-értékét.

27. Három egymástól független ismétlést kell végezni, mindhármat triplikátum lyukkal (vagyis n=9). Az egyes független ismétléseken belül minden vizsgálati vegyi anyaghoz és oldószeres kontrollhoz tartozó három lyuk számtani átlaga alapján számítják ki a relatív sejtéletképesség számtani átlagát. A sejtéletképesség végső számtani átlagát a három független ismétlésből határozzák meg.

28. A vizsgálati vegyi anyagok súlyos szemkárosodást okozóként (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozóként), valamint a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerint kategória nélküli) vegyi anyagokként történő meghatározására szolgáló sejtéletképességi határértékek az alábbiakban szerepelnek.

2. táblázat

A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer előrejelzési modellje

Sejtéletképesség		ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti besorolás	Alkalmazási kör
5 %-nál	0,05 %-nál		
> 70 %	> 70 %	Kategória nélküli	Anyagok és keverékek, kivéve: i. a 6 kPa-t meghaladó gőznyomású rendkívül illékony anyagok ([1]), és ii. a felületaktív anyagoktól eltérő szilárd vegyi anyagok (anyagok és keverékek) és a kizárólag felületaktív anyagokból álló keverékek.
≤ 70 %	> 70 %	Előrejelzés nem végezhető	Nem alkalmazandó
≤ 70 %	≤ 70 %	1. kategória	Anyagok és keverékek ([2])

([1]) A 6 kPa-t meghaladó gőznyomású anyagokat tartalmazó keverékeket az esetleges alulkategorizálás elkerülése érdekében körültekintően kell értékelni, és előrejelzett besorolásukat eseti alapon kell megindokolni.

([2]) Elsősorban egy összetevőből álló anyagok vizsgálatából nyert eredmények alapján, bár a keverékek vizsgálatára vonatkozóan is rendelkezésre állnak korlátozott mennyiségű adatok. A vizsgálati módszer mindazonáltal a több összetevőből álló anyagok és keverékek vizsgálatára technikailag alkalmazható. E vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény.

Elfogadhatósági kritériumok

29. A vizsgálat eredményei akkor ítélhetők elfogadhatónak, amikor az alábbi kritériumok mindegyike teljesül:

a) A tápfolyadék (sejtekről leszívott tápoldat) kontroll optikai sűrűsége a vakpróba optikai sűrűségének kivonása után legalább 0,3.

b) Az oldószeres kontroll tápoldatos kontollhoz viszonyított életképessége legalább 80 %. Amennyiben az egyes ismétlésekben több oldószeres kontrollt végeznek, minden kontrollnak 80 %-ot meghaladó sejtéletképességet kell eredményeznie ahhoz, hogy minősíteni lehessen az adott oldószerrel tesztelt vizsgálati vegyi anyagokat.

c) A pozitív kontroll (0,01 % SLS) sejtéletképessége a dokumentált adatok átlaga körüli két szóráson belül van. A pozitív kontroll alsó és felső elfogadhatósági határértékét rendszeresen, vagyis háromhavonta, illetőleg a vizsgálatokat rendszertelenül, azaz havi egy alkalomnál ritkábban végző laboratóriumok esetében minden elfogadható vizsgálat után aktualizálni kell. Amennyiben valamely laboratórium nem végez elegendő számú kísérletet a pozitív kontrollok statisztikailag megbízható eloszlásának megállapítására, akkor elfogadható, hogy amíg az első rutinszerűen végzett belső vizsgálatok alapján meghatározzák az eloszlást, a módszer kidolgozói által megállapított alsó és felső elfogadhatósági határértékeket használják, amelyek laboratóriumuk dokumentált adatai szerint 21,1 % és 62,3 %.

d) A három független ismétlés alapján meghatározott végső sejtéletképesség szórása sem a vizsgálati vegyi anyag 5 %-os, sem a 0,05 %-os koncentrációjánál nem érheti el a 15 %-ot.

Ha e kritériumok közül egy vagy több nem teljesül, az eredményeket érvénytelennek kell nyilvánítani, és másik három független ismétlést kell végezni.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

30. Minden ismétlés tekintetében az egyes lyukakra vonatkozó adatokat (pl. a sejtéletképességi értékeket), az összesített átlagot, a szórást és a besorolást bele kell foglalni a vizsgálati jelentésbe.

Vizsgálati jelentés

31. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag és kontrollként szolgáló anyagok

— Egy összetevőből álló anyag: kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;

— több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek: amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosságával (lásd fent), tisztaságával, mennyiségi előfordulásával és releváns fizikai-kémiai tulajdonságaival (lásd fent) jellemezve; amennyiben rendelkezésre állnak;

— fizikai megjelenés, illékonyság, pH-érték, LogP-érték, molekulatömeg, kémiai osztály, valamint a vizsgálat elvégzése szempontjából releváns további fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;

— tisztaság, adott és a gyakorlatban megvalósítható esetben a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;

— vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak.

Vizsgálati módszer körülményei és eljárásai

— a megbízó, a vizsgálatot végző laboratórium és a vizsgálatvezető neve és címe;

— az alkalmazott vizsgálati módszer leírása;

— az alkalmazott sejtvonal, annak eredete, valamint a vizsgálathoz használt sejtek passzálásainak száma és konfluenciájának mértéke;

— az alkalmazott vizsgálati eljárás részletei;

— az alkalmazott ismétlések és replikátumok száma;

— a vizsgálati vegyi anyag alkalmazott koncentrációi (ha eltér az ajánlottaktól);

— az oldószer kiválasztásának indoklása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében;

— a vizsgálati vegyi anyagnak való expozíció időtartama (ha eltér az ajánlottól);

— a vizsgálati eljárás bármilyen változtatásának leírása;

— az alkalmazott értékelési és döntési kritériumok leírása;

— hivatkozás a pozitív történeti kontrollok átlagértékére és szórásaira;

— - a vizsgálati módszer végrehajtásában való laboratóriumi jártasság bizonyítása (például jártassági tesztanyagok vizsgálatával) vagy a vizsgálati módszer idővel reprodukálható végrehajtásának bizonyítása.

Eredmények

— A replikátum lyukankénti OD-értékek, az egyes független ismétlések OD-értékeinek számtani átlaga, az egyes független ismétlések sejtéletképességi aránya és a három ismétlés alapján meghatározott átlagos sejtéletképességi arány és szórás táblázatba foglalása az összes vizsgálati vegyi anyagra és kontrollanyagra, valamint minden vizsgált koncentrációra vonatkozólag;

— a tápoldatos, az oldószeres és a pozitív kontroll eredményei, amelyek igazolják a vizsgálat elfogadhatósági kritériumainak való megfelelést;

— a megfigyelt egyéb hatások leírása;

— az alkalmazott előrejelzési modellel/döntési kritériumokkal összhangban, az összesített eredmények alapján kialakított osztályozás.

Az eredmények értékelése

Következtetések

SZAKIRODALOM

(1) Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Elérhető a következő címen:http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Scott L, *et al.* (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In vitro* 24, 1-9.

(3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(4) Takahashi Y, *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In vitro* 22, 760-770.

(5) Sakaguchi H, *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In vitro* 25, 796-809.

(6) Kojima H, *et al.* (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In vitro* 27, pp.1 855-1 869.

(7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Elérhető a következő címen:[http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

(8) E melléklet B.5., Akut szemirritáció/szemkorrózió című fejezete.

(9) Saito K, *et al.* (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.

(10) Mikkelson TJ, Chrai SS and Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm.* Sci.1 648-1 653.

(11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Brussels, Belgium.

(12) Gautheron P, *et al.* (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In vitro* Assay of Ocular Irritancy. Fundam Appl *Toxicol.* 18, 442-449.

(13) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34). Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(14) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 263). Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

Függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: a vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. E kifejezést gyakran használják az egyezés megfelelőjeként, amely egy adott vizsgálati módszer alkalmazásakor az azonos eredmények arányát fejezi ki (13).

Referencia-vegyianyag: a vizsgálati vegyi anyaggal való összevetéshez referenciaként használt anyag. A referencia-vegyianyagnak a következő tulajdonságokkal kell rendelkeznie: i. állandó és megbízható forrás(ok)ból kell származnia; ii. a vizsgálati vegyi anyagok osztályához hasonló szerkezettel és funkcionalitással kell rendelkeznie; iii. ismert fizikai-kémiai tulajdonságokkal kell rendelkeznie; iv. rendelkezésre kell állnia az ismert hatásait alátámasztó adatoknak; és v.. a kívánt hatástartományban ismert hatásúnak kell lennie.

Alulról építkező megközelítés: a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében feltehetőleg besorolást nem igénylő vizsgálati vegyi anyag esetén alkalmazott lépcsőzetes megközelítés, amely a besorolást nem igénylő vegyi anyagok (negatív eredmény) más vegyi anyagokhoz (pozitív eredmény) viszonyított meghatározásával kezdődik.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Szemirritáció: a vizsgálati vegyi anyagnak a szem elülső felszínén történő alkalmazását követően megjelenő és az alkalmazástól számított 21 napon belül teljes mértékben visszafordítható szemelváltozás. Megfelel a „reverzibilis szemkárosodás” fogalmának és az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 2. kategóriának.

Álnegatív arány: a vizsgálati módszer alkalmazása során tévesen negatívnak minősített pozitív vegyi anyagok részaránya. A vizsgálati módszer teljesítőképességének egyik mutatója.

Álpozitív arány: a vizsgálati módszer alkalmazása során tévesen pozitívnak minősített negatív vegyi anyagok részaránya. A vizsgálati módszer teljesítőképességének egyik mutatója.

Veszély: valamely anyag vagy helyzet azon sajátossága, hogy káros hatásokat képes előidézni az élő szervezet, rendszer vagy (al)populáció anyagnak való expozíciójakor.

Tápoldatos kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó kezeletlen replikátum. Ezt a mintát a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt mintákkal és más kontrollmintákkal együtt kell feldolgozni annak megállapításához, hogy az oldószer kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati rendszerrel.

Keverék: két vagy több anyagot tartalmazó elegy vagy oldat.

Egy összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben az egyik fő összetevő legalább 80 tömegszázalékban van jelen.

MTT: 3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid; tiazolil kék tetrazólium-bromid.

Több összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben egynél több fő összetevő legalább 10 tömegszázalékban, de 80 tömegszázalékot nem meghaladó koncentrációban van jelen. A több összetevőből álló anyag gyártási folyamat eredménye. A keverék és a több összetevőből álló anyag között az a különbség, hogy a keverék két vagy több anyag összekeverésével, kémiai reakció nélkül jön létre. A több összetevőből álló anyag kémiai reakció eredménye.

OD: optikai sűrűség.

Pozitív kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó anyaggal kezelt replikátum. Annak biztosítása érdekében, hogy a pozitív kontrollban jelentkező hatás időbeli változását fel lehessen mérni, a pozitív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Relevancia: a vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálati módszer pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (10).

Megbízhatóság: a vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. Megállapítása a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság, valamint a laboratóriumon belüli megismételhetőség kiszámításával történik (13).

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálat helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (10).

Súlyos szemkárosodás: a vizsgálati vegyi anyagnak a szem külső felületére való juttatását követően olyan szövetkárosodás kialakulása vagy a látás olyan súlyos fizikai romlása, amely a beadást követően 21 napon belül nem fordítható vissza teljes mértékben. Megfelel az „irreverzibilis szemkárosodás” fogalmának és az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriának.

Oldószeres/vivőanyagos kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét az oldószerrel vagy vivőanyaggal együtt tartalmazó nem kezelt minta, amelyet a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt mintákkal és más kontrollmintákkal együtt kell feldolgozni az ugyanazon oldószerben feloldott vagy ugyanazon vivőanyaggal felvitt vizsgálati vegyi anyaggal kezelt minták kiindulási értékeinek megállapítása érdekében. Párhuzamos tápoldatos kontrollal elvégzett vizsgálata esetén ez a minta azt is bizonyítja, hogy az oldószer vagy vivőanyag kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati rendszerrel.

Specificitás: a vizsgálat elvégzésével helyesen besorolt összes negatív/inaktív vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (13).

Anyag: olyan természetes állapotban előforduló vagy gyártási eljárásból származó kémiai elem és vegyületei, amely a stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagot és az alkalmazott eljárásból származó szennyező anyagokat is tartalmazhat, de nem tartalmaz olyan oldószert, amely az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltoztatása nélkül elkülöníthető.

Felületaktív anyag: olyan vegyi anyag (például mosószer), amely csökkentheti a folyadékok felületi feszültségét, és így lehetővé teszi, hogy habozzanak vagy áthatoljanak szilárd anyagokon; nedvesítőszerként is ismert.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Többszintű vizsgálati stratégia: olyan lépcsőzetes vizsgálati stratégia, amelynek keretében a vizsgálati vegyi anyagra vonatkozó valamennyi információt meghatározott sorrendben áttekintik, és az egyes szinteken az adatok bizonyító erejének elemzésével meghatározzák, hogy a következő szintre való továbblépés előtt a veszélyességi osztályozásra vonatkozó döntéshez elegendő információ áll-e rendelkezésre. Ha a vizsgálati vegyi anyag irritatív hatása a rendelkezésre álló információk alapján megállapítható, további vizsgálatra nincs szükség. Ha a vizsgálati vegyi anyag irritatív hatása a rendelkezésre álló információk alapján nem állapítható meg, több lépcsőben egymás után állatkísérleteket kell végezni mindaddig, amíg az egyértelmű besorolás meg nem állapítható.

Felülről építkező megközelítés: a feltehetőleg súlyos szemkárosodást okozó vizsgálati vegyi anyag esetén alkalmazott lépcsőzetes megközelítés, amely a súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyagok (pozitív eredmény) más vegyi anyagokhoz (negatív eredmény) viszonyított meghatározásával kezdődik.

A vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete által globálisan harmonizált rendszere (ENSZ-GHS): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (1).

ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategória: lásd: „Súlyos szemkárosodás”.

ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 2. kategória: lásd: „Szemirritáció”.

ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerint kategória nélküli: az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. és 2. kategóriába (illetve az ENSZ-GHS 2A. vagy 2B. kategóriába) nem besorolt vegyi anyagok.

UVCB: ismeretlen vagy változó összetételű anyagok, valamint komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok.

B.69. AZ EMBERI SZARUHÁRTYÁHOZ HASONLÓ REKONSTRUÁLT FELHÁMON (RhCE) ALAPULÓ VIZSGÁLATI MÓDSZER A SZEMIRRITÁCIÓ VAGY A SÚLYOS SZEMKÁROSODÁS TEKINTETÉBEN BESOROLÁST NEM IGÉNYLŐ VEGYI ANYAGOK AZONOSÍTÁSÁRA

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 492. vizsgálati iránymutatásában (2017) leírt módszerrel. A *súlyos szemkárosodás* az Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) által kidolgozott, vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszerében (GHS) (1), valamint az Európai Unió (EU) anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendeletében (CLP-rendelet) ([1]) meghatározottak szerint a vizsgálati vegyi anyagnak a szem külső felületére való juttatását követően olyan szövetkárosodás kialakulása vagy a látás olyan súlyos fizikai romlása, amely a beadást követően 21 napon belül nem fordítható vissza teljes mértékben. Szintén az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet szerint a *szemirritáció* a vizsgálati vegyi anyagnak a szem elülső felszínén történő alkalmazását követően megjelenő és az alkalmazástól számított 21 napon belül teljes mértékben visszafordítható szemelváltozásokra utal. A súlyos szemkárosodást okozó vizsgálati vegyi anyagok az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába, míg a szemirritációt kiváltó vizsgálati vegyi anyagok az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet szerinti 2. kategóriába sorolandók. A szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében be nem sorolt vizsgálati vegyi anyagok olyan vegyi anyagok, amelyek nem tesznek eleget az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet szerinti 1. vagy 2. (2A. vagy 2B.) kategóriába való besorolás követelményeinek, vagyis azokra az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet szerint kategória nélküliként történik hivatkozás.

2. A súlyos szemkárosodás/szemirritáció vizsgálata jellemzően kísérleti állatokon történő vizsgálatot foglal magában (B.5. vizsgálati módszer (2)). A legmegfelelőbb vizsgálati módszer kiválasztásához és e vizsgálati módszer alkalmazásához a súlyos szemkárosodásra vonatkozó és bőrirritációs vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről szóló OECD-iránymutatás nyújt támpontokat (39).

3. Ez a vizsgálati módszer egy olyan *in vitro* eljárást ismertet, amely lehetővé teszi a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást és címkézést nem igénylő vegyi anyagok (anyagok és keverékek) ENSZ-GHS és CLP-rendelet szerinti azonosítását. A módszerben az emberi szaruhártyahámhoz hasonló rekonstruált felhámot (RhCE) alkalmaznak, amely nagy hasonlósággal modellezi az emberi szaruhártya felhámjának szövettani, morfológiai, biokémiai és fiziológiai tulajdonságait. Négy másik *in vitro* vizsgálati módszert validáltak, nyilvánítottak tudományosan megalapozottnak és fogadtak el, a B.47. (3), B.48. (4), B.61. (5) és B.68. (6) vizsgálati módszert, amelyek mindegyike a súlyos szemkárosodással/szemirritációval mint az emberi egészség károsodásának egyik végpontjával foglalkozik.

4. E vizsgálati módszer két validált, kereskedelmi forgalomban kapható RhCE-modellt alkalmazó vizsgálatot foglal magában. Az EpiOcular™ szemirritációs vizsgálat (EIT) és a SkinEthic™ emberi szaruhártya felhám (HCE) használatán alapuló szemirritációs vizsgálat (EIT) alkalmazásával elvégezték a szemirritáció/súlyos szemkárosodás felmérésének validálási tanulmányait (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13). Mindkét vizsgálat kereskedelmi forgalomban beszerezhető RhCE-szövetkonstrukciót alkalmaz vizsgálati rendszerként, amelyre az alábbiakban validált referenciamódszerként – mint VRM1 és VRM2 – történik hivatkozás. E validálási tanulmányok és független szakértői vizsgálatuk (9) (12) alapján megállapítást nyert, hogy az EpiOcular™ EIT és a SkinEthic™ HCE EIT képes megfelelően azonosítani az ENSZ-GHS szerint szemirritáció vagy súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást és címkézést nem igénylő vegyi anyagokat (anyagokat és keverékeket egyaránt), és a vizsgálatok e célra történő alkalmazását tudományosan megalapozottnak tekintik és ajánlják (13).

5. Jelenleg általánosan elfogadott, hogy az előre látható jövőben egyetlen *in vitro* vizsgálati módszer sem tudja majd teljes körűen helyettesíteni a Draize-féle *in vivo* szemvizsgálatot (2) (14) a különböző kémiai osztályoknál felmerülő szemkárosodási/szemirritációs válaszreakciók teljes skálájának előrejelzésében. Előfordulhat azonban, hogy egy-egy (többszintű) vizsgálati stratégián, például az alulról/felülről építkező megközelítésen belüli több alternatív vizsgálati módszer stratégiai kombinációja teljes körűen helyettesíteni tudja a Draize-féle szemvizsgálatot (15). Az alulról építkező megközelítés (15) akkor alkalmazandó, amikor a meglévő információk alapján valamely vegyi anyag várhatóan nem okoz a besorolás szükségességéhez elegendő szemirritációt, míg a felülről építkező megközelítés (15) akkor alkalmazandó, amikor a meglévő információk alapján valamely vegyi anyag várhatóan súlyos szemkárosodást idéz elő. Az EpiOcular™ EIT és a SkinEthic™ HCE EIT vizsgálat ajánlott az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerint a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igényelő (kategória nélküli) vegyi anyagok további vizsgálatot nem igénylő azonosítására, olyan vizsgálati stratégia keretében, mint a Scott és munkatársai által javasolt alulról/felülről építkező megközelítés, például az alulról építkező megközelítés első lépéseként, vagy a felülről

([1]) Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról (HL L 353/1., 2008.12.31.).

építkező megközelítés egyik utolsó lépéseként (15). Az EpiOcular™ EIT és a SkinEthic™ HCE EIT azonban nem alkalmas az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategória (súlyos szemkárosodás) és az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 2. kategória (szemirritáció) megkülönböztetésére. Ezt a különbségtételt a vizsgálati stratégiai egy másik szintjén kell megvalósítani (15). Azok a vizsgálati vegyi anyagok, amelyeket az EpiOcular™ EIT vagy a SkinEthic™ HCE EIT vizsgálattal szemirritáció/súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást igénylőként azonosítottak, végleges kategorizálásuk (ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti nem besorolt, 2. kategória vagy 1. kategória) érdekében további (*in vitro* és/vagy *in vivo*) vizsgálatokat tesznek szükségessé, például a B.47., B.48., B.61. vagy B.68. vizsgálati módszer alkalmazásával.

6. E vizsgálati módszer ismerteti azt az eljárást, amely felhasználható a vizsgálati vegyi anyagok szemet érintő veszélyességi potenciáljának értékelésére az alapján, hogy az MTT-vizsgálat mérései szerint (16) képesek-e RhCE szövetkonstrukcióban citotoxicitást kiváltani (lásd a 21. pontot). A vizsgálati vegyi anyaggal való kezelését követően az RhCE szövet életképességét a negatív kontrollanyaggal kezelt szövetekkel való összevetésben határozzák meg (életképességi arány), amelyet azután felhasználnak a vizsgálati vegyi anyag szemet érintő veszélyességi potenciáljának előrejelzéséhez.

7. Az EpiOcular™ EIT és a SkinEthic™ HCE EIT vizsgálathoz hasonló RhCE-alapú, új vagy módosított *in vitro* vizsgálatok validálásának megkönnyítéséhez rendelkezésre állnak az OECD 34. vizsgálati iránymutatásában (18) szereplő elvekkel összhangban kidolgozott teljesítményszabványok (17), amelyek lehetővé teszik az OECD 492. vizsgálati iránymutatásának időben történő módosítását az új vizsgálatok e vizsgálati iránymutatásba való beépítéséhez. Az adatok OECD-megállapodás szerinti kölcsönös elfogadása csak a teljesítményszabványoknak megfelelően validált vizsgálatok esetében lesz garantált, ha e vizsgálatokat az OECD felülvizsgálta és belefoglalta a megfelelő vizsgálati iránymutatásba.

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

8. A fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatók.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

9. Ez a vizsgálati módszer kereskedelmi forgalomban kapható, háromdimenziós RhCE-szövetkonstrukció használatán alapul, amelyet (az EpiOcular™ OCL-200 esetében) primér humán epidermális keratinocita sejtekből vagy (a SkinEthic™ HCE/S esetében) immortalizált humán szaruhártya felhámsejtekből állítottak elő. Az EpiOcular™ OCL-200 és a SkinEthic™ HCE/S RhCE szövetkonstrukciók hasonlatosak az *in vivo* szaruhártya felhám háromdimenziós felépítéséhez, és e szövetkonstrukciókat a vizsgált faj sejtjeiből állították elő (19) (20). Emellett a vizsgálatok közvetlenül mérik a citotoxicitást, a vegyi anyag szaruhártyán történő áthatolása és az általa előidézett sejt- és szövetkárosodás alapján; ez a citotoxicitási reakció határozza azután meg az *in vivo* súlyos szemkárosodási/szemirritációs vizsgálat összesített eredményét. A sejtkárosodás számos hatásmechanizmuson keresztül valósulhat meg (lásd a 20. pontot), de a citotoxicitás fontos, ha nem elsődleges szerepet játszik egy adott vegyi anyag által kiváltott általános súlyos szemkárosodási/szemirritációs reakció mechanisztikus meghatározásában, ami a szövetkárosodás hátterében álló fizikai-kémiai folyamatoktól függetlenül *in vivo* többnyire a szaruhártya opálosodásában, szivárványhártya-gyulladásban, a kötőhártya vörösségében és/vagy kötőhártya-vizenyőben nyilvánul meg.

10. A vizsgálati módszert alátámasztó validálási tanulmányban vegyi anyagok széles skáláját tesztelték, köztük számos, kémiai típus, kémiai osztály, molekulatömeg, LogP-érték, kémiai szerkezet stb. szempontjából eltérő anyagot. Az EpiOcular™ EIT validációs adatbázisa összesen 113 vegyi anyagot tartalmazott, amelyek – az OECD QSAR-eszköztár alapján végzett egyik elemzése szerint – 95 különböző szerves funkciós csoportba tartoznak (8). E vegyi anyagok többsége egykomponensű anyag, de a tanulmány kiterjedt néhány több összetevőből álló anyagra is (azon belül 3 homopolimerre, 5 kopolimerre és 10 kvázi polimerre). Halmazállapotuk és az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti kategóriák tekintetében a 113 vizsgálati vegyi anyag a következőképpen oszlik meg: 131. kategóriába tartozó folyadék, 151. kategóriába tartozó szilárd anyag, 6 2A. kategóriába tartozó folyadék, 102A kategóriába tartozó szilárd anyag, 7 2B. kategóriába tartozó folyadék, 7 2B. kategóriába tartozó szilárd anyag, 27 kategória nélküli folyadék és 28 kategória nélküli szilárd anyag (8). A SkinEthic™ HCE EIT validációs adatbázisa összesen 200 vegyi anyagot tartalmazott, amelyek 165 különféle szerves funkciós csoportba tartoznak (8) (10) (11). E vegyi anyagok többsége egy összetevőből álló anyag, de a tanulmány kiterjedt néhány több összetevőből álló anyagra is (azon belül 10 polimerre). Halmazállapotuk és az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti kategóriák tekintetében a 200 vizsgálati vegyi anyag a következőképpen oszlik meg: 271. kategóriába tartozó folyadék, 241. kategóriába tartozó szilárd anyag, 192A. kategóriába tartozó folyadék, 102A kategóriába tartozó szilárd anyag, 9 2B. kategóriába tartozó folyadék, 8 2B. kategóriába tartozó szilárd anyag, 50 kategória nélküli folyadék és 53 kategória nélküli szilárd anyag (10) (11).

11. A vizsgálati módszer alkalmazható anyagokra és keverékekre, valamint szilárd anyagokra, folyadékokra, félszilárd anyagokra és viaszos anyagokra. A folyadékok lehetnek vizesek vagy nem vizesek; a szilárd anyagok lehetnek vízben oldódóak vagy oldhatatlanok. Ahol megoldható, a szilárd anyagokat alkalmazásuk előtt finom porrá kell őrölni; a mintát előzetesen nem szükséges más módon kezelni. Gázokat és aeroszolokat validálási tanulmány keretében nem vizsgáltak. Bár elképzelhető, hogy ezek is vizsgálhatók az RhCE-technikával, a jelenlegi vizsgálati módszer nem engedi meg gázok és aeroszolok vizsgálatát.

12. Azok a vizsgálati vegyi anyagok, amelyek (jellegükből fakadóan vagy a kezelés után) ugyanabban a tartományban nyelik el a fényt, mint az MTT-formazán, és azok a vizsgálati vegyi anyagok, amelyek közvetlenül is képesek redukálni az MTT vitális festéket (MTT-formazánná), befolyásolhatják a szövet életképességének mérését, ennek korrigálása érdekében adaptált kontrollokra van szükség. Az esetlegesen szükséges adaptált kontrollok típusa függ a vizsgálati vegyi anyag által előidézett interferencia típusától és az MTT-formazán mennyiségének meghatározásához használt eljárástól (lásd a 36–42. pontot).

13. Az elővalidálási (21) (22) és a teljes körű validálási (8) (10) (11) tanulmányok eredményei igazolták, hogy az EpiOcular™ EIT és a SkinEthic™ HCE EIT egyaránt alkalmazható a vizsgálatok elvégzésében tapasztalattal nem rendelkező laboratóriumokban, továbbá a laboratóriumon belül és a laboratóriumok között is reprodukálható. E tanulmányok alapján az EpiOcular™ EIT vizsgálat 113 vegyi anyag adataira vonatkozó előrejelzéseinek egyezése alapján meghatározott várható reprodukálhatósági szintje a laboratóriumokon belül 95 %, a laboratóriumok között pedig 93 %. A SkinEthic™ HCE EIT vizsgálat 120 vegyi anyag adataira vonatkozó előrejelzéseinek egyezése alapján meghatározott várható reprodukálhatósági szintje a laboratóriumokon belül 92 %, a laboratóriumok között pedig 95 %.

14. Az EpiOcular™ EIT vizsgálat a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő vegyi anyagok ENSZ-GHS és CLP-rendelet osztályozási rendszere szerinti azonosítására alkalmazható. A validálási tanulmányban (8) gyűjtött adatok alapján az EpiOcular™ EIT általános pontossága 80 % (112 vegyi anyag alapján), érzékenysége 96 % (57 vegyi anyag alapján), álnegatív aránya 4 % (57 vegyi anyag alapján), specificitása 63 % (55 vegyi anyag alapján) és álpozitív aránya 37 % (55 vegyi anyag alapján) a referenciaként szolgáló nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálatból (B.5. vizsgálati módszer) származó (2) (14), az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet osztályozási rendszere szerint azonosított adatokkal való összevetésben. Abban a tanulmányban, amelyben az EpiOcular™ EIT vizsgálattal 97 folyékony mezőgazdasági vegyszerkészítményt teszteltek, a vizsgálati módszer e keveréktípus tekintetében hasonló teljesítményt nyújtott, mint a validálási tanulmány során (23). A 97 készítmény eloszlása a következő: 211. kategóriájú, 192A. kategóriájú, 142B. kategóriájú és 43 kategória nélküli anyag, amelyek besorolása a referenciaként szolgáló nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálatból (B.5. vizsgálati módszer) származó adatok alapján az ENSZ-GHS osztályozási rendszere szerint történt (2) (14). A besorolás általános pontossága 82 % (97 készítmény alapján), érzékenysége 91 % (54 készítmény alapján), álnegatív aránya 9 % (54 készítmény alapján), specificitása 72 % (43 készítmény alapján) és álpozitív aránya 28 % (43 készítmény alapján) volt (23).

15. A SkinEthic™ HCE EIT vizsgálat a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő vegyi anyagok ENSZ-GHS és CLP-rendelet osztályozási rendszere szerinti azonosítására alkalmazható. A validálási tanulmányban (10) (11) gyűjtött adatok alapján a SkinEthic™ HCE EIT általános pontossága 84 % (200 vegyi anyag alapján), érzékenysége 95 % (97 vegyi anyag alapján), álnegatív aránya 5 % (97 vegyi anyag alapján), specificitása 72 % (103 vegyi anyag alapján) és álpozitív aránya 28 % (103 vegyi anyag alapján) a referenciaként szolgáló nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálatból (B.5. vizsgálati módszer) származó (2) (14), az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet osztályozási rendszere szerint azonosított adatokkal való összevetésben.

16. A két RhCE vizsgálat anyagoknál vagy keverékeknél elért álnegatív aránya belül marad azon a 12 %-os általános valószínűségi arányon, amellyel a vegyi anyagokat az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet szerinti 2. kategóriájába vagy az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet kategória nélküli csoportjába sorolják a Draize-féle *in vivo* szemvizsgálatban, ismételt

vizsgálatok esetén; ez a módszerre jellemző vizsgálaton belüli variabilitásnak tudható be (24). A két RhCE vizsgálati módszer anyagoknál vagy keverékeknél mért álpozitív aránya e vizsgálati módszerben nem kritikus jelentőségű, mivel a (44. pontban szereplő) megállapított határértékkel megegyező vagy az alatti szövet-életképességet kiváltó vizsgálati vegyi anyagokon további vizsgálatokat kell végezni más *in vitro* vizsgálati módszerekkel, vagy utolsó lehetőségként – a szabályozási követelményektől függően, az adatok bizonyító erejének mérlegelésén alapuló megközelítés keretébe tartozó lépcsőzetes vizsgálati stratégia segítségével – nyulakon végzett vizsgálatokkal. Ezek a vizsgálati módszerek valamennyi típusú vegyi anyagra alkalmazhatók, az alkalmazásuk során kapott negatív eredményt a szemirritáció és a súlyos szemkárosodás tekintetében nem besorolandóként kell elfogadni (az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet kategória nélküli csoportja). Az EpiOcular™ EIT és a SkinEthic™ HCE EIT vizsgálat az ENSZ-GHS/CLP-rendelettől eltérő osztályozási rendszeren belüli alkalmazásáról egyeztetni kell a megfelelő szabályozó hatóságokkal.

17. E vizsgálati módszer korlátai közé tartozik, hogy nem teszi lehetővé a szemirritáció/reverzibilis szemkárosodás (2. kategória) és a súlyos szemkárosodás/irreverzibilis szemkárosodás (1. kategória) ENSZ-GHS és CLP-rendelet szerinti megkülönböztetését, sem a szemirritáló hatás (opcionális 2A. kategória) és enyhén szemirritáló hatás (opcionális 2B. kategória) ENSZ-GHS szerinti megkülönböztetését (1). E célokból más *in vitro* vizsgálati módszerekkel végzett további vizsgálatra van szükség.

18. E vizsgálati módszer esetében a „vizsgálati vegyi anyag" kifejezés a vizsgálat tárgyát képező vegyi anyagra vonatkozik ([2]) és nem az RhCE vizsgálati módszer anyagok és/vagy keverékek vizsgálatára való alkalmazhatóságához kapcsolódik.

A VIZSGÁLAT ELVE

19. A vizsgálati vegyi anyagot legalább két háromdimenziós RhCE szövetkonstrukcióra viszik fel topikálisan, majd a kezelést és a kezelés utáni inkubációs időszakot követően meghatározzák a szövet-életképességet. Az RhCE szöveteket primér humán epidermális keratinocita sejtekből vagy immortalizált humán szaruhártya felhámsejtekből rekonstruálták, amelyeket több napon keresztül tenyésztettek, hogy egy olyan többrétegű, erősen differenciált laphámszövetet alkossanak, amely morfológiáját tekintve hasonló az emberi szaruhártya hámszövetéhez. Az EpiOcular™ RhCE szövetkonstrukció legalább 3 réteg élő sejtből és egy nem keratinizált felszínből tevődik össze, szaruhártyaszerű felépítése analóg az *in vivo* megtalálhatóval. A SkinEthic™ HCE RhCE szövetkonstrukció legalább 4 réteg élő sejtből áll, a normál emberi szaruhártya felhámhoz hasonlóan magában foglalva a bazális hengerhámsejteket, a közbenső szárnyas sejteket és a felszíni laphámsejteket (20) (26).

20. A vegyi anyagok által kiváltott súlyos szemkárosodás/szemirritáció – amely *in vivo* főként a szaruhártya opálosodásában, szivárványhártya-gyulladásban, a kötőhártya vörösségében és/vagy kötőhártya-vizenyőben nyilvánul meg – egy kaszkád jellegű folyamat eredménye, amelynek első lépéseként a vegyi anyag a szaruhártyán és/vagy a kötőhártyán áthatolva sejtkárosodást idéz elő. Sejtkárosodás bekövetkezhet számos hatásmechanizmuson, többek között a következőkön keresztül: sejtmembrán lízis (pl. felületaktív anyagok, szerves oldószerek váltják ki); makromolekulák (különösen fehérjék) koagulációja (pl. felületaktív anyagok, szerves oldószerek, lúgok és savak váltják ki); lipidek szappanosodása (pl. lúgok váltják ki); és alkilációk, illetve a makromolekulákkal kialakított egyéb kovalens kapcsolatok (pl. fehérítők, peroxidok és alkiláló szerek váltják ki) (15) (27) (28). Kimutatták azonban, hogy a citotoxicitás a szövetkárosodás hátterében álló fizikai-kémiai folyamatoktól függetlenül fontos, ha nem elsődleges szerepet tölt be egy adott vegyi anyag által kiváltott általános súlyos szemkárosodási/szemirritációs reakció mechanisztikus meghatározásában (29) (30). Ezenkívül a vegyi anyagok súlyos szemkárosodási/szemirritációs potenciálját elsősorban a kezdeti sérülés mértéke határozza meg (31), amely korrelációt mutat a sejtpusztulás mértékével (29), valamint a kiváltott reakciók és a végső következmények nagyságrendjével (32). Ennek megfelelően a nagyon enyhén irritáló anyagok általában csak a szaruhártya felhámjának felszínén fejtenek ki hatást, az enyhén és mérsékelten irritáló anyagok többnyire a felhámot és a kötőszövet felszínét károsítják, míg a súlyosan irritáló anyagok a felhámban, a kötőszövet belső rétegeiben és esetenként a szaruhártya belhámjában tesznek kárt (30) (33). A vizsgálati vegyi anyaggal történő topikális kezelését követően az RhCE szövetkonstrukció életképességének – a súlyos szemkárosodás/szemirritáció tekintetében besorolást nem igénylő (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerint nem besorolt) vegyi anyagok azonosítása céljából történő – mérése azon a feltevésen alapul, hogy a súlyos szemkárosodást vagy szemirritációt okozó összes vegyi anyag citotoxicitást idéz elő a szaruhártya felhámjában és/vagy a kötőhártyában.

([2]) 2013 júniusában az OECD együttes ülése megállapodott abban, hogy ahol csak lehetséges, az OECD új és átdolgozott vizsgálati iránymutatásaiban következetesebben alkalmazzák a „vizsgálati vegyi anyag" kifejezést a vizsgálat tárgyát képező vegyi anyagra.

21. Az RhCE szövet életképességét hagyományosan az alapján mérik, hogy az MTT [3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid; tiazolil kék tetrazólium-bromid; CAS-száma: 298-93-1)] vitális festéket a szövet élő sejtjei enzimatikus úton kék MTT-formazán kristállyá átalakítják, amelyet a szövetből történő kivonás után mennyiségileg meghatároznak (16). Azok a vegyi anyagok azonosíthatók az ENSZ-GHS/CLP-rendelet (nem besorolt) kategóriájának megfelelően besorolást és címkézést nem igénylő vegyi anyagokként, amelyek nem csökkentik a szövet-életképességet egy meghatározott határérték alá (vagyis az EpiOcular™ EIT és a SkinEthic™ HCE EITL ([3]) vizsgálatban 60 % alá, a SkinEthic™ HCE EITS ([4]) vizsgálatban pedig 50 % alá) (lásd a 44. pontot).

A JÁRTASSÁG BIZONYÍTÁSA

22. Az RhCE vizsgálatok szabályozási célú rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak az 1. táblázatban felsorolt tizenöt jártassági tesztanyag besorolásának helyes előrejelzésével igazolniuk kell szakmai jártasságukat. Ezeket a vegyi anyagokat a vizsgálati referenciamódszereken végzett validálási tanulmányokban használt vegyi anyagok közül választották ki (8) (10) (11). A lehetőségekhez mérten olyan vegyi anyagok kerülnek kiválasztásra, amelyek: i. különféle halmazállapotúak; ii. a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálat (B.5. vizsgálati módszer) (2) (14) magas minőségű eredményei, az ENSZ-GHS osztályozási rendszer (1., 2A., 2B. vagy nem besorolt kategória) (1) és a CLP-rendelet szerinti osztályozási rendszer (1., 2. vagy nem besorolt kategória) alapján lefedik a súlyos szemkárosodás/szemirritáció *in vivo* reakcióinak teljes tartományát; iii. lefedik az *in vivo* besorolást befolyásoló különböző hatásokat (24) (25); iv. a validálási tanulmányban használt kémiai osztályok tekintetében reprezentatívak (8) (10) (11); v. lefedik a megfelelő szerves funkcionális csoportok széles körét (8) (10) (11); vi. jól meghatározott kémiai szerkezettel rendelkeznek (8) (10) (11); vii. színesek és/vagy közvetlen MTT-redukáló hatásúak; viii. megismételhető eredményeket hoztak az RhCE vizsgálati módszereken végzett validálási tanulmányok során; ix. besorolásukat helyesen jelezték előre az RhCE vizsgálati módszerek validálási tanulmánya során; x. az RhCE vizsgálati módszerekből származó kiváló minőségű adatok alapján lefedik az *in vitro* válaszreakciók teljes tartományát (0–100 %-os életképesség); xi. kereskedelmi forgalomban kaphatók; és xii. nem kapcsolódnak hozzájuk kiemelkedően magas beszerzési és/vagy ártalmatlanítási költségek. Amennyiben valamely felsorolt vegyi anyag nem áll rendelkezésre, illetve más megalapozott okból kifolyólag nem alkalmazható, akkor a fenti kritériumoknak megfelelő – például a vizsgálati referenciamódszer validálása során alkalmazott vegyi anyagok közül származó – vegyi anyag is használható. Az ilyen eltéréseket azonban meg kell indokolni.

1. táblázat

A jártassági tesztanyagok jegyzéke

Kémiai név	CAS-szám	Szerves funkciós csoport ([1])	Halmazállapot	VRM1 életképessége (%) ([2])	VRM2 életképessége (%) ([3])	VRM szerinti előrejelzés	MTT-redukciós hatás	Színinterferencia
***In vivo* 1. kategória** ([4])								
Metil-tioglikolát	2365-48-2	Karbonsavészter; Tioalkohol	F	10,9 ± 6,4	5,5 ± 7,4	Előrejelzés nem végezhető	I (erősen)	N
Hidroxietil-akrilát	818-61-1	Akrilát; Alkohol	F	7,5 ± 4,7 ([5])	1,6 ± 1,0	Előrejelzés nem végezhető	N	N
2,5-dimetil-2,5-hexándiol	110-03-2	Alkohol	Sz	2,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	Előrejelzés nem végezhető	N	N
Nátrium-oxalát	62-76-0	Oxokarboxilsav	Sz	29,0 ± 1,2	5,3 ± 4,1	Előrejelzés nem végezhető	N	N
***In vivo* 2A. kategória** ([4])								
2,4,11,13-tetraaza-tetradekándiimid-amid, N,N″-bisz(4-klórfenil)-3,12-diimino-, di-D-glükonát (20 %, vizes oldat) ([6])	18472-51-0	Aromás szénhidrogén halogenid; Aril-halogenid; Dihidroxilcsoport; Guanidin	F	4,0 ± 1,1	1,3 ± 0,6	Előrejelzés nem végezhető	N	I (enyhén)

([3]) EITL: a SkinEthic™ HCE folyadékokra alkalmazott szemirritációs vizsgálata.
([4]) EITS: a SkinEthic™ HCE szilárd anyagokra alkalmazott szemirritációs vizsgálata.

Kémiai név	CAS-szám	Szerves funkciós csoport ([1])	Halmazállapot	VRM1 életképessége (%) ([2])	VRM2 életképessége (%) ([3])	VRM szerinti előrejelzés	MTT-redukciós hatás	Színinterferencia
Nátrium-benzoát	532-32-1	Aril; Karbonsav	Sz	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	Előrejelzés nem végezhető	N	N
***In vivo* 2B. kategória** ([4])								
Dietil-toluamid	134-62-3	Benzamid	F	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	Előrejelzés nem végezhető	N	N
2,2-dimetil-3-metilén-biciklo [2.2.1] heptán	79-92-5	Alkán, tercier szenekhez sorolva; Alkén; Bicikloheptán; áthidalt gyűrűs karbociklusok; Cikloalkán	Sz	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	Előrejelzés nem végezhető	N	N
***In vivo* nem besorolt** ([4])								
1-etil-3-metilimidazolium-etil-szulfát	342573-75-5	Alkoxi; Ammóniumsó; Aril; Imidazol; Szulfát	F	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	Kat. nélküli	N	N
Dikaprilil-éter	629-82-3	Alkoxi; Éter	F	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	Kat. nélküli	N	N
Piperonil-butoxid	51-03-6	Alkoxi; Benzodioxol; benzil; Éter	F	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	Kat. nélküli	N	N
hidrogénezett ricinusolaj polietilénglikolja (PEG-40)	61788-85-0	Acilál; Alkohol; Allil; Éter	Viszkózus	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	Kat. nélküli	N	N
1-(4-Klorofenil)-3-(3,4-diklorofenil)-karbamid	101-20-2	Aromás szénhidrogén halogenid; Aril-halogenid; Karbamidszármazékok	Sz	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6-,6	Kat. nélküli	N	N
2,2′-metilén-bisz(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametil-butil)fenol)	103597-45-1	Alkán, kvaterner szenekhez sorolva; Fúziós aromás karbociklus; Fúziós telített heterociklusok; Kinoid vegyületek prekurzorai; Terc-butil	Sz	102,7 ± 13-,4	97,7 ± 5,6	Kat. nélküli	N	N

Kémiai név	CAS-szám	Szerves funkciós csoport ([1])	Halmazállapot	VRM1 életképessége (%) ([2])	VRM2 életképessége (%) ([3])	VRM szerinti előrejelzés	MTT-redukciós hatás	Színinterferencia
Kálium-tetrafluorborát	14075-53-7	Szervetlen só	Sz	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	Kat. nélküli	N	N

Rövidítések:

CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám; ENSZ-GHS = a vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete által globálisan harmonizált rendszere (1); VRM1 = az EpiOcular™ EIT validált referenciamódszer; VRM2 = a SkinEthic™ HCE EIT validált referenciamódszer; Színinterferencia = az MTT-formazán hagyományos abszorbancia (optikai sűrűség, OD) mérését zavaró színinterferencia.

([1]) Az OECD eszköztár 3.1. beágyazott elemzése szerinti szerves funkció csoport (8).

([2]) Az EURL ECVAM/Cosmetics Europe szemirritációs validálási tanulmánya (EIVS) során végzett EpiOcular™ EIT vizsgálatban kapott eredmények alapján (8).

([3]) A validálási tanulmány során végzett SkinEthic™ HCE EIT vizsgálatban kapott eredmények alapján (10) (11).

([4]) A nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálat (B.5. vizsgálati módszer/az OECD 405. vizsgálati iránymutatása) (2) (14) eredményei alapján és az ENSZ-GHS felhasználásával.

([5]) A CEFIC konzorcium *in vitro* szemirritációs vizsgálati stratégiájához (CON4EI) végzett tanulmány eredményei alapján.

([6]) A 2A. vagy 2B. kategóriába sorolás az ENSZ-GHS rendszerének a két kategória megkülönböztetésére szolgáló kritériuma értelmezésétől függ, azaz három állatból egynél, illetve három állatból kettőnél a hetedik napig fennmaradó hatások szükségesek a 2A. kategóriába soroláshoz. Az *in vivo* vizsgálatot három állaton végezték. Az egy állaton megfigyelt szaruhártya-opálosodástól eltekintve minden végpont a 7. napra vagy már korábban teljesen begyógyult (a hatást értékelő pontszáma nulla volt). Annak az egy állatnak, amely nem gyógyult meg teljesen a hetedik napra, a szaruhártya opálosodását értékelő pontszáma 1 volt (a hetedik napon), majd a 9. napra teljesen meggyógyult.

23. A jártassági vizsgálat részeként ajánlott, hogy a felhasználók az RhCE szövetkonstrukció gyártója által meghatározottak szerint, átvétel után ellenőrizzék a szövetek barrierjellemzőit (lásd a 25., 27. és 30. pontot). Ez különösen fontos, ha a szöveteket nagy távolságra/hosszú ideig szállították. Ha egy vizsgálatot már sikeresen igazoltak, valamint jártasságot szereztek az alkalmazásában és bizonyították azt, ilyen jellegű ellenőrzéseket nem szükséges rutinszerűen végezni. Ha azonban egy vizsgálatot rutinszerűen alkalmaznak, a barrierjellemzőket javasolt továbbra is rendszeres időközönként ellenőrizni. ELJÁRÁS

24. E vizsgálati módszerhez jelenleg a tudományosan megalapozottnak nyilvánított EpiOcular™ EIT és SkinEthic™ HCE EIT vizsgálat tartozik (9) (12) (13), amelyekre a szöveg validált referenciamódszerként is hivatkozik (az előbbi sorrend szerint VRM1 és VRM2). Az RhCE vizsgálati módszerekhez rendelkezésre állnak szabványműveleti eljárások, amelyeket alkalmazni kell e vizsgálati módszerek laboratóriumi végrehajtása és igénybevétele során (34) (35). A következő pontok és a 2. függelék ismertetik az RhCE vizsgálatok főbb összetevőit és eljárásait.

AZ RHCE VIZSGÁLATI MÓDSZER ÖSSZETEVŐI

Általános feltételek

25. A megfelelő emberi eredetű sejtekből rekonstruált szaruhártyaszerű háromdimenziós felhámszövetet fokozatosan rétegzett, de nem elszarusodott sejtekből kell előállítani. Az RhCE szövetkonstrukciót úgy készítik, hogy porózus szintetikus membránt inzertálnak, amelyen keresztül a tápanyagok eljutnak a sejtekhez. A rekonstruált szaruhártyaszerű felhámban élő, nem keratinizált epitélsejtek több rétegének kell jelen lennie. Az RhCE szövetkonstrukció felhámjának felszíne közvetlenül érintkezzen a levegővel, hogy a szaruhártya felhámjának *in vivo* kezeléséhez hasonló módon közvetlenül kezelni lehessen topikálisan a vizsgálati vegyi anyaggal. Az RhCE szövetkonstrukciónak megfelelő ellenálló képességgel rendelkező funkcionális barriert kell képeznie a citotoxikus referencia-vegyianyagok, pl. a Triton X-100 vagy a nátrium-dodecil-szulfát (SDS) gyors áthatolása ellen. A barrierfunkciót bizonyítani kell, ennek értékeléséhez meghatározható az az expozíciós idő, amely alatt egy adott, állandó koncentrációjú referencia-vegyianyag (pl. 100 µl mennyiségű 0,3 térfogatszázalékos Triton X-100) hatására a szövetek életképessége 50 %-kal csökken (ET_{50}), vagy az a referencia-vegyianyag koncentráció, amely meghatározott idejű expozíciót (pl. 30 perces kezelés 50 µl SDS-sel) követően 50 %-kal csökkenti a szövetek életképességét (IC_{50}) (lásd a 30. pontot). Az RhCE szövetkonstrukció folyadékzáró tulajdonságainak meg kell akadályozniuk, hogy a vizsgálati vegyi anyag passzáljon az élő szövet szélei körül, amely a szaruhártya expozíciójának rossz modellezését eredményezné. Az RhCE szövetkonstrukció előállításához használt emberi eredetű sejteknek baktérium-, vírus-, mikoplazma- és gombafertőzéstől mentesnek kell lenniük. A forgalmazónak ellenőriznie kell, hogy a szövetkonstrukció steril, gomba- és baktériumfertőzéstől mentes.

Funkcionális feltételek

Életképesség

26. A szövetek életképességének számszerű mérése MTT-vizsgálattal történik (16). Az RhCE szövetkonstrukció élő sejtjei az MTT vitális festéket kék MTT-formazán kicsapódássá redukálják, amelyet azután izopropanol (vagy hasonló oldószer) használatával kivonnak a szövetből. A kivont MTT-formazán mennyisége meghatározható hagyományos

abszorbancia (optikai sűrűség, OD) méréssel vagy HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárással (36). Az extraháló oldószer optikai sűrűségének (OD) eléggé alacsonynak, azaz 0,1 alattinak kell lennie. Az RhCE szövetkonstrukció felhasználóinak biztosítaniuk kell, hogy az alkalmazott RhCE szövetkonstrukció minden egyes tétele megfeleljen a negatív kontrollra vonatkozóan meghatározott kritériumoknak. A vizsgálati referenciamódszerek negatív kontrolljaira vonatkozó OD-értékek elfogadhatósági tartományát a 2. táblázat ismerteti. A HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárás alkalmazása esetén a negatív kontroll elfogadhatósági feltételeként a 2. táblázatban szereplő negatív kontrollra vonatkozó OD-tartományok szolgálnak. A vizsgálati jelentésben dokumentálni kell, hogy a negatív kontrollanyaggal kezelt szövetek stabilak a tenyészetben (hasonló szövet-életképességi értékeket adnak) a vizsgálat során alkalmazott expozíciós időszak alatt. A szövet gyártójának a szövet készítés során hasonló eljárást kell lefolytatnia a szövettételek jóváhagyása előtti minőség-ellenőrzéskor, erre az esetre azonban a 2. táblázatban szereplőktől eltérő elfogadhatósági kritériumok alkalmazhatók. Az RhCE szövetkonstrukció előállítójának/forgalmazójának meg kell határoznia a negatív kontroll során nyert OD-értékek (a vizsgálati módszer minőség-ellenőrzési körülményei mellett érvényes) elfogadhatósági tartományát (alsó és felső határértékeket).

2. táblázat

A negatív kontroll OD-értékének elfogadhatósági tartománya (a vizsgálat felhasználói számára)

Vizsgálat	Alsó elfogadási határ	Felső elfogadási határ
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (mind a folyadékok, mind a szilárd anyagok protokolljánál)	> 0,8 ([1])	< 2,5
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (mind a folyadékok, mind a szilárd anyagok protokolljánál)	> 1,0	≤ 2,5

([1]) Ez az elfogadhatósági határérték figyelembe veszi az esetlegesen hosszabbra nyúló (pl. 4 napot meghaladó) szállítási/tárolási időt, amelyről kimutatták, hogy nem befolyásolja a vizsgálati módszer teljesítményét (37).

Barrierfunkció

27. Az RhCE szövetkonstrukciónak megfelelő vastagsággal és ellenálló képességgel kell rendelkeznie ahhoz, hogy például az ET_{50} alapján végzett becslések szerint (Triton X-100 esetében) vagy az IC_{50} alapján végzett becslések szerint (SDS esetén) (3. táblázat) meg tudja akadályozni a citotoxikus referencia-vegyianyagok gyors áthatolását. Az RhCE szövetkonstrukció előállítójának/forgalmazójának, a szövetek végfelhasználóhoz történő kiszállításakor bizonyítania kell az alkalmazott RhCE szövetkonstrukció minden egyes tételének barrierfunkcióját (lásd a 30. pontot).

Morfológia

28. Az RhCE szövetkonstrukció szövettani vizsgálatának igazolnia kell az emberi szaruhártyáéhoz hasonló felhámfelépítést (legalább 3 élő epitélsejtekből álló réteg és egy nem keratinizált felszín). A validált referenciamódszerek tekintetében az előállítónak/forgalmazónak gondoskodnia kell a szövetkonstrukció megfelelő morfológiájáról, ezért ezt a vizsgálati módszer felhasználójának az egyes alkalmazott szövettételeknél nem szükséges ismételten igazolnia.

Reprodukálhatóság

29. A vizsgálati módszer alkalmazása során végzett pozitív és negatív kontrollok eredményeinek igazolniuk kell a módszer időbeni megismételhetőségét.

Minőség-ellenőrzés

30. Az RhCE szövetkonstrukció csak abban az esetben használható, ha előállítója/forgalmazója igazolja, hogy az alkalmazott RhCE szövetkonstrukció minden egyes tétele megfelel a gyártás utáni jóváhagyásra vonatkozóan meghatározott feltételeknek, amelyek közül az életképességre (26. pont) és a barrierfunkcióra (27. pont) vonatkozó kritériumok a leglényegesebbek. Az ET_{50} vagy IC_{50} érték által mért (lásd a 25. és a 26. pontot) barrierfunkció elfogadhatósági tartományát (alsó és felső határértékét) az RhCE szövetkonstrukció előállítójának/forgalmazójának kell meghatároznia. A 3. táblázat ismerteti az ET_{50} és az IC_{50} érték azon elfogadhatósági tartományát, amelyet (a validált referenciamódszerekben) az RhCE szövetkonstrukciók előállítója/forgalmazója a tételjóváhagyás előtti minőség-ellenőrzés során alkalmaz. A gyártás utáni jóváhagyásra vonatkozóan meghatározott feltételeknek való megfelelést igazoló adatokat az RhCE szövetkonstrukció előállítójának/forgalmazójának a vizsgálati módszer felhasználóinak rendelkezésére kell bocsátania, hogy ezeket az információkat fel tudják tüntetni a vizsgálati jelentésben. Kizárólag a gyártás utáni felszabadításra vonatkozóan meghatározott összes feltételnek megfelelő szövetekkel elért eredmények fogadhatók el a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást és címkézést nem igénylő vegyi anyagok ENSZ-GHS és CLP-rendelet szerinti besorolásának megbízható előrejelzéseként.

3. táblázat

Tételjóváhagyás előtti minőség-ellenőrzés kritériumai

Vizsgálat	Alsó elfogadási határ	Felső elfogadási határ
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (100 µl 0,3 térfogatszázalékos Triton X-100)	ET_{50} = 12,2 perc	ET_{50} = 37,5 perc
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (30 perces kezelés 50 µl SDS-sel)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

A vizsgálati vegyi anyag és a kontrollanyagok alkalmazása

31. Minden vizsgálatmenetben valamennyi vizsgálati vegyi anyaghoz és kontrollanyaghoz legalább két szövetreplikátumot kell használni. Két különböző kezelési protokoll alkalmazható, az egyik folyékony, a másik szilárd vizsgálati vegyi anyagokhoz (34) (35). Mindkét módszer és protokoll esetében a vizsgálati vegyi anyaggal történő kezelés előtt a szövetkonstrukció felületét be kell nedvesíteni kalcium- és magnéziummentes Dulbecco-féle foszfátpuffert tartalmazó sóoldattal (Ca^{2+}/Mg^{2+}-mentes DPBS), megteremtve ezzel az emberi szemre jellemző nedves feltételeket. A szövetek kezelése a vizsgálati vegyi anyag(ok)nak és a kontrollanyagoknak való expozícióval veszi kezdetét. Mindkét validált referenciamódszer mindkét kezelési protokolljában a vizsgálati vegyi anyagot és a kontrollanyagot megfelelő mennyiségben kell alkalmazni ahhoz, hogy az egyenletesen fedje a felhám felszínét, ugyanakkor el kell kerülni a végtelen dózis alkalmazását (lásd a 32. és 33. pontot) (2. függelék).

32. A validált referenciamódszerekben a 37 °C-on vagy alacsonyabb hőmérsékleten (szükség esetén finnpipettával) pipettázható vizsgálati vegyi anyagokat folyadékként kell kezelni, ellenkező esetben szilárd anyagokként kezelendők (lásd a 33. pontot). A validált referenciamódszerekben a folyékony vizsgálati vegyi anyagokat egyenletesen kell eloszlatni a szövet felszínén (ehhez legalább 60 µl/cm^2 mennyiség szükséges) (lásd a 2. függeléket (33) (34)). A szövet megfelelő dózissal történő kezelése érdekében a lehetőségekhez mérten kerülni kell, hogy az inzertre (a szövet felszínére) felvitt vizsgálati vegyi anyag kis térfogata miatt kapilláris hatás (hajszálcsövesség) alakuljon ki. A folyékony vizsgálati vegyi anyaggal kezelt szöveteket a szokásos tenyésztési körülmények mellett (37 ±2 °C, 5 ±1 %-os CO_2, legalább 95 %-os relatív páratartalom) 30 percig inkubálni kell. Az inkubációs idő lejártával a folyékony vizsgálati vegyi anyagot és a kontrollanyagokat óvatosan el kell távolítani a szövet felszínéről, ehhez szobahőmérsékleten Ca^{2+}/Mg^{2+}-mentes DPBS-sel alaposan át kell mosni a szövetet. Az átmosást követően a szövetet az alkalmazott validált referenciamódszertől függően változó, előre meghatározott időtartamig frissen készített, szobahőmérsékletű tápoldatba kell meríteni (ezáltal eltávolíthatók a szövetbe abszorbeált vizsgálati vegyi anyagok). Kizárólag a VMR1 esetén az MTT-vizsgálat végrehajtása előtt a szövetet frissen készített tápoldatban, szokásos tenyésztési körülmények között expozíció utáni inkubációnak kell alávetni (lásd a 2. függeléket (34) (35)).

33. A validált referenciamódszerekben a 37 °C-os hőmérsékletig nem pipettázható vizsgálati vegyi anyagokat szilárd anyagokként kell kezelni. A vizsgálati vegyi anyagokat olyan mennyiségben kell alkalmazni, amely képes befedni a szövet teljes felületét, ehhez legalább 60 mg/cm^2 mennyiségre van szükség (lásd a 2. függeléket). A szilárd anyagokat, amikor csak lehetséges finom por alakban kell vizsgálni. A szilárd vizsgálati vegyi anyaggal kezelt szöveteket egy előre meghatározott (az alkalmazott validált referenciamódszertől függő) időszakon keresztül a szokásos tenyésztési körülmények közepette inkubálják (lásd a 2. függeléket (34) (35)). Az expozíciós idő lejártával a szilárd vizsgálati vegyi anyagot és a kontrollanyagokat óvatosan el kell távolítani a szövet felszínéről, ehhez szobahőmérsékleten Ca^{2+}/Mg^{2+}-mentes DPBS-sel alaposan át kell mosni a szövetet. Az átmosást követően kerül sor az expozíció utáni merítésre, amikor a szövetet az alkalmazott validált referenciamódszertől függően változó, előre meghatározott időtartamig frissen készített, szobahőmérsékletű tápoldatba merítik (ezáltal eltávolíthatók a szövetbe abszorbeált vizsgálati vegyi anyagok), majd az MTT-vizsgálatot megelőzően frissen készített tápoldatban, szokásos tenyésztési körülmények között expozíció utáni inkubálásra kerül sor (lásd a 2. függeléket (34) (35)).

34. Minden vizsgálatmenetben párhuzamos negatív és pozitív kontrollokkal bizonyítani kell, hogy a szövetek (negatív kontroll alapján meghatározott) életképessége és (pozitív kontroll alapján meghatározott) érzékenysége a dokumentált adatok alapján meghatározott elfogadhatósági tartományba esik. A párhuzamos negatív kontroll szolgáltatja emellett az alapvonalat (a 100 %-os szövet-életképességet) a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt szövetek relatív életképességi arányának ((életképesség$_{vizsgált}$ aránya) kiszámításához. A validált referenciamódszerekhez ajánlott pozitív kontroll-anyag a tiszta metil-acetát (CAS-száma: 79-20-9, forgalmazza például a Sigma-Aldrich, katalógusszáma: 45997; folyadék). A VRM1, illetve a VRM2 vizsgálathoz alkalmazandó ajánlott negatív kontrollanyag az ultra nagytisztaságú víz, illetve a Ca^{2+}/Mg^{2+}-mentes DPBS. Ezeket a kontrollanyagokat használták a validált referenciamódszereken végzett validálási tanulmányokban, és ezekhez áll rendelkezésre a legtöbb ismert adat. A megfelelő alternatív pozitív vagy negatív kontrollanyagok alkalmazását tudományosan és kellő mértékben alá kell támasztani. A negatív és pozitív kontrollanyagokat ugyanazon protokoll(ok) alapján kell tesztelni, mint a vizsgálatmenetben részt vevő vizsgálati vegyi anyagokat (vagyis a folyadékokhoz és/vagy a szilárd anyagokhoz készült protokollal). A folyékony vizsgálati vegyi anyagok tesztelésével párhuzamosan végzett kontrollok (lásd a 32. pontot) vagy a szilárd vizsgálati vegyi anyagok tesztelésével párhuzamosan végzett kontrollok (lásd a 33. pontot) leírása szerint a kijuttatást követően és még az MTT-vizsgálatot megelőzően sor kerül az expozícióra, az átmosásra, az expozíciót követő merítésre és adott esetben az expozíciót követő inkubálásra (lásd a 35. pontot) (34) (35). Az azonos vizsgálatmenetben tesztelt azonos halmaz-állapotú (folyékony vagy szilárd) vizsgálati vegyi anyagok esetében elegendő egyetlen negatív és pozitív kontrollt vizsgálni.

A szövetek életképességének mérése

35. Az MTT-vizsgálat egy szabványosított kvantitatív eljárás (16), amelyet e vizsgálati módszer során a szövetek életképességének méréséhez kell alkalmazni. A vizsgálat kompatibilis a háromdimenziós szövetkonstrukcióban történő használattal. Az MTT-vizsgálatot közvetlenül az expozíció utáni inkubációs időszakot követően hajtják végre. A validált referenciamódszerekben az RhCE szövetkonstrukciót a szokásos tenyésztési körülmények mellett 180 percre (±15 perc) 0,3 ml mennyiségű, 1 mg/ml koncentrációjú MTT-oldatba helyezik. Az MTT vitális festéket az RhCE szövetkonstrukció élő sejtjei kék MTT-formazán kicsapódássá redukálják. Ezt követően a kicsapódott kék MTT-formazán terméket megfelelő mennyiségű izopropanol (vagy hasonló oldószer) használatával kivonják a szövetből (34) (35). A folyékony vizsgálati vegyi anyaggal tesztelt szövetek esetében a szövetek tetejéről és aljáról is ki kell vonni az MTT-t, míg a szilárd vizsgálati vegyi anyagokkal és színes folyadékokkal tesztelt szöveteknél csak a szövet aljáról kell kivonni az MTT-t (ezáltal minimalizálni lehet az izopropanol extraháló oldat esetleges átszennyezését a szöveten maradt vizsgálati vegyi anyaggal). A nehezen lemosható folyékony vizsgálati vegyi anyaggal tesztelt szöveteknél szintén megengedhető, hogy a terméket csak a szövet aljáról vonják ki. A párhuzamosan vizsgált negatív és pozitív kontrollanyagokat a vizsgálati vegyi anyaggal azonos módon kell kezelni. A kivont MTT-formazán mennyisége meghatározható hagyományos abszorbancia (OD) méréssel egy sávszűrő alkalmazásával 570 nm hullámhosszon (maximum ±30 nm-es eltérés megengedett), vagy egy HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárás útján (lásd a 42. pontot) (11) (36).

36. A vizsgálati vegyi anyag optikai tulajdonságai vagy az MTT-re gyakorolt kémiai hatása folytán befolyásolhatja az MTT-formazán mérését, ami a szövet-életképesség helytelen megbecsüléséhez vezet. A vizsgálati vegyi anyagok befolyásolhatják az MTT-formazán mérését azáltal, hogy közvetlenül kék MTT-formazánná redukálják az MTT-t és/vagy azáltal, hogy színinterferenciát okoznak, ha a vizsgálati vegyi anyag jellegénél fogva vagy a kezelési eljárás következtében az MTT-formazánnal azonos OD-tartományban (vagyis kb. 570 nm-en) nyeli el a fényt. A vizsgálat előtt előzetes méréseket kell végezni, amelyek lehetővé teszik a potenciálisan közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező és/vagy színinterferenciát okozó vegyi anyagok azonosítását, és további kontrollokat kell alkalmazni e vizsgálati vegyi anyagok potenciális zavaró hatásának észleléséhez és korrekciójához (lásd a 37–41. pontot). Ez különösen fontos abban az esetben, amikor egy adott vizsgálati vegyi anyagot nem távolítottak el teljesen az RhCE szövetkonstrukcióból a mosás során, vagy amikor az anyag áthatol a szaruhártyaszerű felhámon, és így az MTT-vizsgálat elvégzése során jelen van az RhCE szövetkonstrukcióban. Azon vizsgálati vegyi anyagok esetében, amelyek (jellegüknél fogva vagy a kezelés következtében) az MTT-formazánnal azonos tartományban nyelik el a fényt, és amelyek túlságosan zavaró hatásúak, vagyis erőteljes adszorpciót mutatnak 570 ±30 nm-en, ezért az MTT-formazán hagyományos abszorbancia (OD) mérésével nem vizsgálhatók, az MTT-formazán HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárással történő meghatározását lehet alkalmazni (lásd a 41. és 42. pontot) (11) (36). A validált referenciamódszerek szabványműveleti eljárásai részletes leírással szolgálnak arról, hogyan lehet észlelni és korrigálni a közvetlen MTT-redukáló hatást és a színezőanyagok okozta zavaró hatást (34) (35). A VRM1, illetve a VRM2 vizsgálathoz rendelkezésre álló, a III., illetve IV. függelékben közzétett szemléltető folyamatábrák iránymutatást nyújtanak ahhoz, hogyan lehet azonosítani és kezelni a közvetlen MTT-redukáló és/vagy színinterferenciát okozó vegyi anyagokat.

37. Annak érdekében, hogy azonosítani lehessen azon vizsgálati vegyi anyagok potenciális zavaró hatását, amelyek (jellegüknél fogva vagy a kezelés következtében) az MTT-formazánnal azonos tartományban nyelik el a fényt, és dönteni lehessen a további kontrollok szükségességéről, a vizsgálati vegyi anyagot vízbe és/vagy izopropanolba helyezik, és megfelelő ideig szobahőmérsékleten inkubálják (lásd a 2. függeléket (34) (35)). Ha a VRM1 vizsgálatban (lásd a 3. függeléket) a vízbe és/vagy izopropanolba helyezett vizsgálati vegyi anyag 570 ± 20 nm-es tartományban kellő mennyiségű fényt nyeli el, vagy ha a VRM2 vizsgálatban (lásd a 4. függeléket) a vizsgálati vegyi anyag vízzel történő elegyítése során színes oldat keletkezik, a vizsgálati vegyi anyag feltehetően befolyásolja az MTT-formazán hagyományos abszorbancia (OD) mérését és további színezőanyag-kontrollokra van szükség, illetve alternatív megoldásként HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárást lehet végezni, amelynek alkalmazásakor ezek a kontrollok nem szükségesek (lásd a 41. és 42. pontot, valamint a III. és IV. függeléket) (34) (35). Hagyományos abszorbancia (OD) mérés esetén az egyes zavaró hatású vizsgálati vegyi anyagokkal legalább két élő szövetreplikátumot kezelnek, amelyeken elvégzik a teljes vizsgálatot, de az MTT inkubációs fázis során MTT-mentes oldatba helyezik azokat, hogy létrehozzanak egy élő szöveteken végzett nem specifikus elszíneződés ($NSC_{élő}$) kontrollt (34) (35). Az élő szövetekre jellemző biológiai változékonyságból kifolyólag az $NSC_{élő}$ kontrollt a színes vizsgálati vegyi anyag vizsgálatával párhuzamosan kell elvégezni, több vizsgálat esetén pedig (minden egyes vizsgálatmenetnél) minden vizsgálattal egyidejűleg független $NSC_{élő}$ kontrollt kell végezni. Ezután meghatározzák a szövetek valódi életképességét, ehhez a zavaró hatású vizsgálati vegyi anyaggal kezelt és MTT-oldatban inkubált élő szövetek életképességi arányából (Életképesség$_{vizsgált}$ arány) levonják a zavaró hatású vizsgálati vegyi anyagnak kitett és MTT-mentes közegben inkubált élő szövetek nem specifikus elszíneződésének arányát, amelyet a korrigálandó vizsgálattal párhuzamosan vizsgáltak ($NSC_{élő}$ arány), tehát a szövetek valódi életképessége = [Életképesség$_{vizsgált}$ arány] - [$NSC_{élő}$ arány].

38. A közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező anyagok azonosítása érdekében minden vizsgálati vegyi anyagot friss MTT-oldatba kell helyezni. Az MTT-oldathoz megfelelő mennyiségű vizsgálati vegyi anyagot adagolnak, majd a keveréket mintegy 3 órán keresztül a szokásos tenyésztési körülmények közepette inkubálják (lásd a III. és a IV. függeléket) (34) (35). Amennyiben a vizsgálati vegyi anyagot tartalmazó MTT-keverék (illetve oldhatatlan vizsgálati vegyi anyag esetén szuszpenzió) színe kékre/lilára változik, a vizsgálati vegyi anyag feltételezhetően közvetlenül redukálja az MTT-t, ezért kiegészítő funkcionális ellenőrzést kell végezni elhalt RhCE szövetkonstrukciókon, független vizsgálat keretében, hagyományos abszorbancia (OD) mérés, illetve HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárás útján. E kiegészítő funkcionális ellenőrzés során elhalt szöveteket használnak, amelyek reziduális metabolikus aktivitással rendelkeznek csupán, ugyanakkor az élő szövetekhez hasonló módon abszorbeálják és magukban tartják a vizsgálati vegyi anyagot. A VRM1 elhalt szöveteit úgy állítják elő, hogy a szöveteket alacsony hőmérsékletnek teszik ki („fagyasztással elölt szövet"). A VRM2 elhalt szöveteit pedig úgy állítják elő, hogy a szöveteket hosszabb ideig (legalább 24 ±1 órán keresztül) vízben inkubálják, majd alacsony hőmérsékleten tárolják („vízben elölt" szövet). Az egyes MTT-redukáló hatású vizsgálati vegyi anyagokkal legalább két elhalt szövetreplikátumot kezelnek, amelyeken elvégzik a teljes vizsgálatot azzal a céllal, hogy egy nem specifikus MTT-redukciós (NSMTT) kontrollt hozzanak létre (34) (35). A független vizsgálatok/vizsgálatmenetek számától függetlenül vizsgálati vegyi anyagonként elegendő egyetlen NSMTT-kontrollt végezni. Ezután meghatározzák a szövetek valódi életképességét, ehhez az MTT-redukáló anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott életképességi arányból (Életképesség$_{vizsgált}$ arány) levonják az ugyanazon MTT-redukáló anyaggal kezelt elhalt szövetekkel kapott nem specifikus MTT-redukció arányát, amelyet a korrigálandó vizsgálattal párhuzamosan végzett negatív kontrollhoz viszonyítva számítanak ki (NSMTT-arány), tehát a szövetek valódi életképessége = [Életképesség$_{vizsgált}$ arány] - [NSMTT-arány].

39. Azon hagyományos abszorbancia (OD) méréssel értékelt vizsgálati vegyi anyagok esetében, amelyek egyaránt okoznak színinterferenciát (lásd a 37. pontot) és közvetlen MTT-redukciót (lásd a 38. pontot), az előző pontokban ismertetett NSMTT és $NSC_{élő}$ kontrollok mellett szükség van egy harmadik fajta kontrollra is. Általában ez a helyzet áll elő a fényt 570 ±30 nm-en elnyelő, sötét színű (pl. kék, lila, fekete) vizsgálati vegyi anyagoknál, mivel saját színük akadályozza, hogy a 38. pontban leírtak szerint értékelni lehessen közvetlen MTT-redukáló hatásukat. Ilyen esetben alapértelmezetten el kell végezni mind az NSMTT, mind az $NSC_{élő}$ kontrollt. Előfordulhat, hogy azokat a vizsgálati

vegyi anyagokat, amelyeken NSMTT és $NSC_{élő}$ kontrollt is végeztek, mind az élő, mind az elhalt szövetek abszorbeálják és magukban tartják. Ilyenkor az NSMTT kontroll nem csupán a vizsgálati vegyi anyag által előidézett közvetlen MTT-redukáló hatást korrigálja, hanem esetleg az anyag elhalt szövetek általi abszorpciójából és benntartásából eredő színinterferenciát is. Ez viszont a színinterferencia kétszeri korrekciójához vezethet, mivel az $NSC_{élő}$ kontroll már korrigálja a vizsgálati vegyi anyag élő szövetek általi abszorpciójából és benntartásából fakadó színinterferenciát. A színinterferencia esetleges kétszeri korrekciójának kiküszöbölése érdekében szükség van egy harmadik kontrollra, amely az elhalt szövetek esetében méri a nem specifikus elszíneződést (NSC_{elhalt}) (lásd a III. és IV. függeléket) (34) (35). E kiegészítő kontroll során a vizsgálati vegyi anyaggal legalább két elhalt szövetreplikátumot kezelnek, amelyeken elvégzik a teljes vizsgálatot, de az MTT inkubációs fázis során MTT-mentes oldatba helyezik azokat. A független vizsgálatok/vizsgálatmenetek számától függetlenül vizsgálati vegyi anyagonként elegendő egyetlen NSC_{elhalt} kontroll, azt azonban az NSMTT kontrollal egyidejűleg és ugyanazon szövettételen kell elvégezni. Ezután meghatározzák a szövetek valódi életképességét, ehhez a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott életképességi arányból (Életképesség$_{vizsgált}$ arány) levonják az NSMTT-arányt és levonják az $NSC_{élő}$ arányt, majd hozzáadják a zavaró hatású vizsgálati vegyi anyaggal kezelt és MTT-mentes közegben inkubált elhalt szövetekkel kapott nem specifikus elszíneződési arányt, amelyet a korrigálandó vizsgálattal párhuzamosan végzett negatív kontrollhoz viszonyítva számítanak ki (NSC_{elhalt} arány), tehát a szövetek valódi életképessége = [Életképesség$_{vizsgált}$ arány] - [NSMTT-arány] - [$NSC_{élő}$ arány] + [NSC_{elhalt} arány].

40. Lényeges megjegyezni, hogy (hagyományos abszorbancia mérés esetén) a nem specifikus MTT-redukció és a nem specifikus színinterferencia a spektrofotométer linearitási tartománya fölé növelheti a szövetkivonat OD-értéket, és (HPLC/UPLC spektrofotometriás mérés esetén) a nem specifikus MTT-redukció a spektrofotométer linearitási tartománya fölé növelheti a szövetkivonat MTT-formazán csúcsterületét is. Ebből kifolyólag fontos, hogy minden laboratórium például MTT-formazán (CAS-száma: 57360-69-7, forgalmazza például a Sigma-Aldrich vállalat, Cat# M2003) segítségével az OD-értékre/csúcsterületre vonatkozólag meghatározza spektrofotométerének linearitási tartományát, mielőtt megkezdené a vizsgálati vegyi anyagok szabályozási célú vizsgálatát.

41. A spektrofotométert használó hagyományos abszorbancia (OD) mérés akkor alkalmazható a közvetlen MTT-redukáló hatással bíró és színinterferenciát okozó vizsgálati vegyi anyagok értékelésére, amikor az MTT-formazán mérésekor tapasztalt zavaró hatás nem túl erőteljes (vagyis a szövetkivonatok vizsgálati vegyi anyaggal kapott, közvetlen MTT-redukció és/vagy színinterferencia tekintetében nem korrigált OD-értékei a spektrofotométer linearitási tartományán belül vannak). Mindazonáltal a negatív kontroll 60 %-ával (a VRM1, valamint a VRM2 folyadékokra vonatkozó protokollja esetén) vagy 50 %-ával (a VRM2 szilárd anyagokra vonatkozó protokollja esetén) egyező vagy annál nagyobb NSMTT-arányt és/vagy $NSC_{élő}$ arányt előidéző vizsgálati vegyi anyagok eredményei óvatosan értelmezendők, mivel ezeket a határértékeket használják a validált referenciamódszerekben a kategorizált és a nem kategorizált vegyi anyagok megkülönböztetésére (lásd a 44. pontot). Ha viszont a vizsgálati vegyi anyag túl erőteljesen zavarja az MTT-formazán mérését (vagyis a vizsgált szövetkivonatok nem korrigált OD-értékei kívül esnek a spektrofotométer linearitási tartományán), a standard abszorbancia (OD) nem mérhető. Az MTT-formazán hagyományos abszorbancia (OD) mérését túlzott mértékben befolyásoló színes vizsgálati vegyi anyagok, illetve vízzel vagy izopropanollal való érintkezés következtében elszíneződött vizsgálati vegyi anyagok mérése elvégezhető HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárás útján (lásd a III. és IV. függeléket). A HPLC/UPLC rendszer ugyanis lehetővé teszi, hogy az MTT-formazánt mennyiségi meghatározása előtt elkülönítsék a vegyi anyagtól (36). Ezért HPLC/UPLC spektrofotometriás módszer használata esetén a vizsgálati vegyi anyagtól függetlenül soha nincs szükség $NSC_{élő}$ és NSC_{elhalt} kontrollra. Az NSMTT-kontroll ugyanakkor alkalmazandó (a 38. pontban ismertetett módon), ha a vizsgálati vegyi anyag gyaníthatóan közvetlenül redukálja az MTT-t. Az NSMTT-kontroll akkor is alkalmazandó, ha a vizsgálati vegyi anyag (saját vagy vízzel való érintkezés következtében kialakult) színe miatt közvetlen MTT-redukáló hatását nem lehet a 38. pontban ismertetett módon felmérni. Amennyiben HPLC/UPLC spektrofotometriásan mérik az MTT-formazánt, a szövetek életképességi aránya a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott MTT-formazán csúcsterület és a párhuzamos negatív kontrollal kapott MTT-formazán csúcsterület aránya lesz. A közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező vizsgálati vegyi anyagok esetében a szövetek valódi életképességét a 38. pont utolsó mondatában leírt módon számítják ki: [Életképesség$_{vizsgált}$ arány] mínusz [NSMTT-arány]. Végül megjegyzendő, hogy azok a közvetlen MTT-redukáló hatású, vagy színinterferenciát is okozó közvetlen MTT-redukáló vegyi anyagok, amelyek a kezelést követően visszamaradnak a szövetben és olyan erős MTT-redukáló hatással bírnak, hogy a vizsgált szövetkivonatok OD-értéke (hagyományos OD mérés esetén), illetve csúcsterülete (HPLC/UPLC spektrofotometriás mérés esetén) kívül esik a spektrofotométer linearitási tartományán, az RhCE vizsgálati módszerekkel nem értékelhetők, bár ilyen csak igen ritka esetben fordul elő.

42. A HPLC/UPLC spektrofotometria bármely típusú vizsgálati vegyi anyagnál (színes, nem színes, MTT-redukáló vagy nem MTT redukáló hatású) alkalmazható az MTT-formazán mérésére (11) (36). A HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszerek sokfélesége miatt a felhasználók nem tudnak azonos rendszerkörülményeket teremteni. Ezért a szövetkivonatok MTT-formazán-tartalmának meghatározása előtt igazolni kell a HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszer minősítését azzal, hogy eleget tesznek az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyelete (FDA) által az iparág számára kiadott, bioanalitikus módszerek validálására vonatkozó iránymutatásban (36) (38) szereplő standard minősítési paramétereken alapuló elfogadhatósági kritériumoknak. E kulcsfontosságú paraméterekről és elfogadhatósági kritériumokról a 5. függelék nyújt tájékoztatást. Amint eleget tettek a 5. függelékben meghatározott elfogadhatósági kritériumoknak, a HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszer minősítettnek tekintendő, és alkalmas arra, hogy az itt leírt vizsgálati módszerben bemutatott kísérleti feltételek mellett elvégezze az MTT-formazán mérését.

Elfogadhatósági kritériumok

43. Minden olyan vizsgálatmenet esetében, amelynek során a minőség-ellenőrzési kritériumoknak megfelelő RhCE szövettételeket alkalmaznak (lásd a 30. pontot), a negatív kontrollanyaggal kezelt szöveteknek olyan OD-értéket kell mutatniuk, amely tükrözi a szöveteknek a szállítási és az átvételi lépéseket, valamint az összes protokollfolyamatot követő minőségét, és nem léphetik túl a dokumentált adatok alapján meghatározott, 2. táblázatban szereplő határértékeket (lásd a 26. pontot). Hasonlóképpen a pozitív kontrollanyaggal, vagyis a metil-acetáttal kezelt szövetek negatív kontrollhoz viszonyított átlagos életképességének 50 % alatt kell maradnia a VRM1 folyadékokra és szilárd anyagokra vonatkozó protokolljában, míg a VRM2 protokoll esetén legfeljebb 30 % (folyadékokra vonatkozó protokoll) vagy 20 % (szilárd anyagokra vonatkozó protokoll) lehet, mert ez igazolja, hogy a vizsgálati módszer feltételei mellett a szövetek képesek reagálni egy irritáló vizsgálati vegyi anyagra (34) (35). A vizsgálati vegyi anyagokkal és kontrollanyagokkal kezelt szövetreplikátumok variabilitásának az elfogadott határértékeken belül kell maradnia (vagyis két szövetreplikátum variabilitása közötti különbség nem haladhatja meg a 20 %-ot, illetve három szövetreplikátum közötti standard deviáció (SD) nem haladhatja meg a 18 %-ot). Amennyiben egy adott vizsgálatmenet negatív vagy pozitív kontrollja kívül esik az elfogadott tartományon, a vizsgálatmenetet érvénytelennek kell nyilvánítani, és meg kell ismételni. Amennyiben egy adott vizsgálati vegyi anyaggal kezelt szövetreplikátumok közötti variabilitás kívül esik az elfogadott tartományon, a vizsgálatot érvénytelennek kell nyilvánítani, és a vizsgálati vegyi anyagot újbóli vizsgálatnak kell alávetni.

Az eredmények értelmezése és az előrejelzési modell

44. Az egyes vizsgálati vegyi anyagokkal kezelt szövetkivonat-replikátumokra vonatkozóan kapott OD-értékek/csúcsterületek alapján kell meghatározni a (100 %-nak vett) negatív kontrollra normalizált átlagos szövet-életképesség százalékos arányát (a szövetreplikátumok átlagát). A 4. táblázat ismerteti a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti kategória nélküli) vizsgálati vegyi anyagok azonosítására használt százalékos szövet-életképességi határértékeket. Az eredmények tehát az alábbiak szerint értelmezendők:

— A vizsgálati vegyi anyagot nem szükséges az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerint osztályozni és címkézni (vagyis az anyag kategória nélküli), ha a szövet kezelést és expozíció utáni inkubációt követően megállapított átlagos életképességi aránya meghaladja (>) a szövet-életképesség meghatározott százalékos határértékét (lásd a 4. táblázatot). Ebben az esetben más vizsgálati módszerekkel végzett további vizsgálatra nincs szükség.

— Amennyiben a szövet kezelést és expozíció utáni inkubációt követően megállapított átlagos életképességi aránya megegyezik a szövet-életképesség meghatározott százalékos határértékével vagy annál kisebb (≤) (lásd a 4. táblázatot), besorolása nem előrejelezhető. Ebben az esetben más vizsgálati módszerekkel végzett további vizsgálatra van szükség, mert az RhCE vizsgálati módszerek álpozitív eredményhez vezethetnek (lásd a 14. és 15. pontot), továbbá nem tudnak különbséget tenni az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. és 2. kategória között (lásd a 17. pontot).

4. táblázat

Az ENSZ-GHS/CLP-rendelet osztályozási rendszere szerinti előrejelzési modellek

VRM szerinti	Kategória nélküli	Előrejelzés nem végezhető
VRM 1 – EpiOcular™ EIT (mindkét protokoll)	Átlagos szövet-életképesség > 60 %	Átlagos szövet-életképesség ≤ 60 %
VRM 2 – SkinEthic™ HCE EIT (folyadékokra vonatkozó protokoll)	Átlagos szövet-életképesség > 60 %	Átlagos szövet-életképesség ≤ 60 %
VRM2 – SkinEthic™ HCE EIT (szilárd anyagokra vonatkozó protokoll)	Átlagos szövet-életképesség > 50 %	Átlagos szövet-életképesség ≤ 50 %

45. Egyértelmű eredmény esetén legalább két szövetreplikátum vizsgálatából álló egyszeri vizsgálatnak elegendőnek kell lennie az adott vizsgálati vegyi anyag esetében. Határértéken lévő eredmények esetében azonban, ha például az egyes szövetreplikátumok eredményei nem egyeznek és/vagy a szövetek átlagos életképességi aránya 60 ± 5 % (VRM1, valamint a VRM2 folyadékokra vonatkozó protokollja esetén) vagy 50 ± 5 % (a VRM2 szilárd anyagokra vonatkozó protokollja esetén), megfontolandó egy második vizsgálat lefolytatása, és ha az első és a második vizsgálat eredményei különbözőek, egy harmadiké is.

46. A keverékek bizonyos típusainál, ahol megfelelő és indokolt, mérlegelni lehet más százalékos szövet-életképességi határértékek alkalmazását a besorolt és a nem besorolt vizsgálati vegyi anyagok közötti különbségtételhez, hogy az adott keveréktípusok tekintetében javítani lehessen a vizsgálati módszer általános teljesítményét (lásd a 14. pontot). A referencia-vegyianyagok hasznosnak bizonyulhatnak ismeretlen vizsgálati vegyi anyagok vagy termékosztályok súlyos szemkárosodási/szemirritációs potenciáljának értékelésére vagy valamely besorolt vegyi anyag szemre kifejtett relatív toxicitási hatásának a pozitív válaszreakciók egy adott tartományán belüli értékelésére.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

47. Mindegyik vizsgálati vegyi anyagra vonatkozóan táblázatos jelentést kell készíteni a vizsgálatmenetben tesztelt egyes szövetreplikátumok adatairól (például OD-értékek/MTT-formazán csúcsterületek, a vizsgálati vegyi anyagra és a kontrollanyagokra vonatkozólag meghatározott százalékos szövet-életképességi adatok és az RhCE vizsgálati módszer végső előrejelzése), amelyben szerepelnie kell a megismételt kísérletek adatainak is, ha voltak ilyenek. Emellett minden vizsgálati vegyi anyagra és kontrollanyagra vonatkozólag fel kell tüntetni a jelentésben az átlagos szövet-életképességi arányt és a két szövetreplikátum életképessége közötti különbséget (ha n=2 szövetreplikátum) vagy a standard deviációt (ha n≥ 3 szövetreplikátum). Ezenfelül bele kell foglalni a jelentésbe azt is, ha valamely vizsgálati vegyi anyagról megfigyelték, hogy közvetlen MTT-redukáló hatása és/vagy színinterferencia miatt befolyást gyakorol az MTT-formazán mérésére.

Vizsgálati jelentés

48. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag

Egy összetevőből álló anyag

— kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;

— fizikai megjelenés, illékonyság, pH-érték, LogP-érték, molekulatömeg, kémiai osztály, valamint a vizsgálat elvégzése szempontjából releváns további fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;

— tisztaság, adott és a gyakorlatban megvalósítható esetben a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;

— vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak.

Több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítójával (lásd fent), tisztaságával, mennyiségi előfordulásával és releváns fizikai-kémiai tulajdonságaival (lásd fent) jellemezve; amennyiben rendelkezésre állnak;

— fizikai megjelenés és a vizsgálat elvégzése szempontjából releváns további fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;

— tisztaság, adott és a gyakorlatban megvalósítható esetben a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;

— vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak.

Pozitív és negatív kontrollanyagok

— kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;

— fizikai megjelenés, illékonyság, molekulatömeg, kémiai osztály, valamint a vizsgálat elvégzése szempontjából releváns további fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;

— tisztaság, adott és a gyakorlatban megvalósítható esetben a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;

— vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;

— adott esetben az ultra nagytisztaságú víztől, illetve a Ca2+/Mg2+-mentes DPBS-től eltérő negatív kontrollanyag használatának indokolása;

— adott esetben a tiszta metil-acetáttól eltérő pozitív kontrollanyag használatának indokolása;

— a pozitív és negatív kontrollanyagok a vizsgálatmenet elfogadhatósági kritériumainak való megfelelőségét bizonyító korábbi eredményei.

A megbízó és a vizsgálatot végző laboratórium adatai

— A megbízó, a vizsgálatot végző laboratórium és a vizsgálatvezető neve és címe.

— *Az alkalmazott RhCE szövetkonstrukció és protokoll (valamint használatuk indokolása, amennyiben szükséges)*

A vizsgálati módszer körülményei

— az alkalmazott RhCE szövetkonstrukció és gyártási szám;

— az MTT-formazán mennyiségi meghatározására használt hullámhossz és (adott esetben) a sávszélesség, valamint a mérőeszköz (pl. spektrofotométer) linearitási tartománya;

— az MTT-formazán számszerű mérésére alkalmazott módszer leírása;

— az alkalmazott HPLC/UPLC-spektrofotometriás rendszer leírása, ha releváns;

— az alkalmazott specifikus RhCE szövetkonstrukcióra vonatkozó teljes körű alátámasztó adatok, köztük a modell teljesítménye. Ennek többek között az alábbiakat kell magában foglalnia:

i) a minőség-ellenőrzés során mért életképesség (forgalmazó által szolgáltatott adat);

ii) a vizsgálati módszer feltételei mellett mért életképesség (felhasználó által szolgáltatott adat);

iii) barrierfunkció minőség-ellenőrzése;

iv) morfológia, ha rendelkezésre áll;

v) reprodukálhatóság és előrejelző képesség;

vi) az RhCE szövetkonstrukció egyéb minőség-ellenőrzési paraméterei, ha vannak;

— hivatkozás az RhCE szövetkonstrukcióval kapott korábbi adatokra. Ennek többek között az alábbiakat kell magában foglalnia: a minőség-ellenőrzési adatok elfogadhatósága tekintettel a korábbi tételadatokra;

— nyilatkozat arról, hogy a vizsgálatot végző intézmény a jártassági tesztanyagok vizsgálata révén bizonyította a vizsgálati módszer végrehajtásában való jártasságát annak rutinszerű használata előtt.

A vizsgálatmenet és a vizsgálat elfogadásának kritériumai

— a pozitív és negatív kontrollok átlaga és elfogadhatósági tartománya a korábbi adatokon alapul;

— a pozitív és negatív kontrollokban használt szövetreplikátumok közötti elfogadható mértékű variabilitás;

— a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt szövetreplikátumok közötti elfogadható mértékű variabilitás.

Vizsgálati eljárás

— az alkalmazott vizsgálati eljárás részletei;

— a vizsgálati vegyi anyag és a kontrollanyagok alkalmazott dózisa;

— az expozíció, az expozíció utáni merítés és az expozíció utáni inkubáció időtartama és az alkalmazott hőmérséklet (adott esetben);

— a vizsgálati eljárás bármilyen változtatásának leírása;

— a közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező és/vagy színváltozást okozó vizsgálati vegyi anyagokhoz alkalmazott kontrollok feltüntetése, amennyiben releváns;

— vizsgálati vegyi anyagonként és kontrollonként (pozitív kontroll, negatív kontroll, NSMTT, $NSC_{élő}$ és NSC_{elhalt}, ha releváns) használt szövetreplikátumok száma.

Eredmények

— az egyes vizsgálati vegyi anyagokra és kontrollanyagokra, minden vizsgálatmenetre (ideértve az esetlegesen elvégzett megismételt kísérleteket is) és replikátummérésre vonatkozó adatok, többek között az OD-érték vagy az MTT-formazán csúcsterület, a szövetek életképességi aránya, a szövetek átlagos életképességi aránya, a szövetreplikátumok közötti eltérések vagy standard deviáció és a végső előrejelzés táblázatba foglalása;

— amennyiben alkalmazandó, a közvetlen MTT-redukáló hatású és/vagy színes vizsgálati vegyi anyagokhoz használt kontrollok eredményei, ideértve az OD-értéket vagy az MTT-formazán csúcsterületet, az NSMTT, az $NSC_{élő}$ és az NSC_{elhalt} arányt, a szövetreplikátumok közötti különbséget vagy standard deviációt, a szövetek helyes végső életképességi arányát és a végső előrejelzést;

— a vizsgálatmenet és a vizsgálat meghatározott elfogadhatósági kritériumai tekintetében a vizsgálati vegyi anyaggal/anyagokkal és a kontrollanyagokkal kapott eredmények;

— az egyéb megfigyelt hatások leírása, például a szövetek valamely színes vizsgálati vegyi anyag okozta elszíneződése.

Az eredmények értékelése

Következtetések

SZAKIRODALOM

(1) UN (2015). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York and Geneva: Egyesült Nemzetek. Elérhető a következő címen:http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(2) E melléklet B.5., Akut szemirritáció/szemkorrózió című fejezete.

(3) E melléklet B.47., Szarvasmarha-szaruhártya opacitásának és permeabilitásának mérésén alapuló vizsgálati módszer i. a súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyagok és ii. a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő vegyi anyagok azonosítására című fejezete.

(4) E melléklet B.48., Izolált csirkeszem vizsgálatán alapuló vizsgálati módszer i. a súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyagok és ii. a besorolást nem igénylő vegyi anyagok azonosítására című fejezete.

(5) E melléklet B.61., Fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálati módszer a szemkorróziót és a súlyos szemirritációt okozó anyagok azonosítására című fejezete.

(6) E melléklet B.68., Rövid expozíciós idejű *in vitro* vizsgálati módszer i. a súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyagok és ii. a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő vegyi anyagok azonosítására című fejezete.

(7) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2 010,261-266.

(8) EC EURL ECVAM (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28 125 EN; doi:10.2787/41680. Elérhető a következő címen:http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280.

(9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03 of 17 November 2014; EUR 28 173 EN; doi: 10.2787/043697. Elérhető a következő címen:http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702.

(10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D, Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In vitro* 31, 43-53.

(11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In vitro* 34, 55-70.

(12) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02 of 24 June 2016; EUR 28 175 EN; doi: 10.2787/390390. Elérhető a következő címen:http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704.

(13) EC EURL ECVAM (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Manuscript in Preparation).

(14) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. Journal of *Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377-390.

(15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In vitro* 24, 1-9.

(16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(17) OECD (2016). Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(18) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.

(20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for *in vitro* toxicology. In: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), Alternative Toxicological Methods, CRC Press, pp. 147-159.

(21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In vitro* 27, 619-626.

(22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In vitro* 27, 1 476-1 488.

(23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.

(24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.

(25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.

(26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113-126.

(27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N.and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, pp. 749–815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.

(28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, pp. 665–697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.

(29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922-936.

(30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106-117.

(31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In vitro* 15, 115-130.

(32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2 610-2 625.

(33) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41-54.

(34) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Elérhető a következő címen:[https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index].

(35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (July 20, 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Elérhető a következő címen:https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index.

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In vitro* 29, 741-761.

(37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101-127.

(38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. 2001. május. Elérhető a következő címen:http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf.

(39) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No 263. ENV Publications, Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

1. függelék

Fogalommeghatározások

Pontosság: a vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítőképességét mutatja, és „relevanciájának" egyik megítélési szempontja. E kifejezést gyakran használják az „egyezés" megfelelőjeként, amely egy adott vizsgálati módszer alkalmazásakor az azonos eredmények arányát fejezi ki (18).

Referencia-vegyianyag: a vizsgálati vegyi anyaggal való összevetéshez referenciaként használt vegyi anyag. A referencia-vegyianyagnak a következő tulajdonságokkal kell rendelkeznie: i. állandó és megbízható forrás(ok)ból kell származnia, ami lehetővé teszi azonosítását és jellemzését; ii. a vizsgálati vegyi anyag(ok)éhoz hasonló szerkezeti, funkcionális és/vagy kémiai vagy termékosztályba kell tartoznia; iii. ismert fizikai-kémiai tulajdonságokkal kell rendelkeznie; iv. rendelkezésre kell állnia az ismert hatásait alátámasztó adatoknak; és v.. a kívánt hatástartományban ismert hatásúnak kell lennie.

Alulról építkező megközelítés: a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében feltehetőleg besorolást és címkézést nem igénylő vizsgálati vegyi anyag esetén alkalmazott lépcsőzetes megközelítés, amely a besorolást és címkézést nem igénylő vegyi anyagok (negatív eredmény) más vegyi anyagokhoz (pozitív eredmény) viszonyított meghatározásával kezdődik.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Egyezés: Lásd a „pontosság" meghatározását.

Szaruhártya: a szemgolyó elülső részén az íriszt és a pupillát fedő és a szem belsejébe a fényt bevezető, áttetsző rész.

CV: variációs koefficiens.

Dev: eltérés.

EIT: Eye Irritation Test (szemirritációs vizsgálat).

EURL ECVAM: Állatkísérletek Alternatíváinak Uniós Referencialaboratóriuma.

Szemirritáció: a vizsgálati vegyi anyagnak a szem elülső felszínén történő alkalmazását követően megjelenő és az alkalmazástól számított 21 napon belül teljes mértékben visszafordítható szemelváltozások. Megfelel a „reverzibilis szemkárosodás" fogalmának és az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 2. kategóriának.

ET_{50}: az az expozíciós idő, amely alatt egy adott, állandó koncentrációjú referencia-vegyianyag hatására a szövet életképessége 50 %-kal csökken.

Álnegatív arány: a vizsgálati módszer alkalmazása során tévesen negatívnak minősített pozitív anyagok részaránya. A vizsgálati módszer teljesítőképességének egyik mutatója.

Álpozitív arány: a vizsgálati módszer alkalmazása során tévesen pozitívnak minősített negatív anyagok részaránya. A vizsgálati módszer teljesítőképességének egyik mutatója.

Veszély: valamely anyag vagy helyzet azon sajátossága, hogy káros hatásokat képes előidézni az élő szervezet, rendszer vagy (al)populáció anyagnak való expozíciójakor.

HCE: SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (emberi szaruhártya felhámszövet).

HPLC: nagy teljesítményű folyadékkromatográfia.

IC_{50}: az a referencia-vegyianyag koncentráció, amely meghatározott idejű expozíciót (pl. 30 perces SDS-sel történő kezelést) követően 50 %-kal csökkenti a szövetek életképességét.

Végtelen dózis: az RhCE szövetkonstrukcióra alkalmazott vizsgálati vegyi anyag azon mennyisége, amely meghaladja a felhám felszínének teljes és egyenletes befedéséhez szükséges mennyiséget.

Irreverzibilis szemkárosodás: lásd: „Súlyos szemkárosodás”.

LLOQ: mennyiségi meghatározás alsó határértéke.

LogP: az oktanol/víz megoszlási koefficiens logaritmusa.

Keverék: két vagy több anyagot tartalmazó elegy vagy oldat.

Egy összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben az egyik fő összetevő legalább 80 tömegszázalékban van jelen.

Több összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben egynél több fő összetevő legalább 10 tömegszázalékban, de 80 tömegszázalékot nem meghaladó koncentrációban van jelen. A több összetevőből álló anyag gyártási folyamat eredménye. A keverék és a több összetevőből álló anyag között az a különbség, hogy a keverék két vagy több anyag összekeverésével, kémiai reakció nélkül jön létre. A több összetevőből álló anyag kémiai reakció eredménye.

MTT: 3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid; tiazolil kék tetrazólium-bromid.

Negatív kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó minta, amelyet egy olyan anyaggal kezelnek, amelyről ismert, hogy a vizsgálati rendszerben nem vált ki pozitív hatást. Ezt a mintát a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt mintákkal és más kontrollmintákkal együtt feldolgozzák fel, és e minta alapján határozzák meg a 100 %-os szövet-életképességet.

Nem besorolt: a szemirritáció tekintetében (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 2., és az ENSZ-GHS szerinti 2A. vagy 2B. kategóriába tartozóként) nem besorolt vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozóként) nem besorolt vegyi anyagok. Megfelelnek az „ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti kategória nélküli” vegyi anyagoknak.

NSC_{elhalt}: elhalt szöveteken megfigyelt, nem specifikus elszíneződés.

$NSC_{élő}$: élő szöveteken megfigyelt, nem specifikus elszíneződés.

NSMTT: nem specifikus MTT-redukció.

OD: optikai sűrűség.

Teljesítményszabványok: hitelesített, tudományosan megalapozottnak nyilvánított referenciamódszeren alapuló szabványok, amelyek a javasolt, végrehajtás és funkcionalitás szempontjából hasonló vizsgálati módszer összehasonlíthatósági értékelésének alapjául szolgálnak. Ide tartoznak: i. a vizsgálati módszer alapvető összetevői; ii. a referencia-vegyianyagok minimális jegyzéke, amely a validált vizsgálati módszer által nyújtott teljesítmény elfogadhatóságának igazolására használt vegyi anyagokból került összeállításra; és iii. a validált vizsgálati módszer eredményei alapján meghatározott, hasonló megbízhatósági és pontossági szintek, amelyeket a javasolt vizsgálati módszernek teljesítenie kell a minimális jegyzék referencia-vegyianyagainak felhasználásával történő értékelése során (18).

Pozitív kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó minta, amelyet egy olyan anyaggal kezelnek, amelyről ismert, hogy a vizsgálati rendszerben pozitív hatást vált ki. Ezt a mintát a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt mintákkal és más kontrollmintákkal együtt dolgozzák fel. Annak biztosítása érdekében, hogy a pozitív kontrollban jelentkező hatás időbeli változását fel lehessen mérni, a pozitív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Relevancia: a vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálati módszer pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (18).

Megbízhatóság: a vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. Megállapítása a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság, valamint a laboratóriumon belüli megismételhetőség kiszámításával történik (18).

Helyettesítő vizsgálat: olyan vizsgálat, amelynek célja, hogy a veszélyek azonosítására és/vagy kockázatértékelésre rutinszerűen alkalmazott és elfogadott vizsgálatot helyettesítse, és amelyről megállapították, hogy az elfogadott vizsgálattal összehasonlítva, az összes lehetséges vizsgálati helyzetben és vegyi anyag esetében a humán vagy állati egészség egyenértékű vagy jobb védelmét biztosítja (18).

Reprodukálhatóság: ugyanazon vizsgálati vegyi anyag ugyanazon vizsgálati protokollal végzett ismételt vizsgálata során kapott eredmények egyezése (lásd: „megbízhatóság") (18).

Reverzibilis szemkárosodás: lásd: „Szemirritáció".

RhCE: Reconstructed human Cornea-like Epithelium (az emberi szaruhártyahámhoz hasonló rekonstruált felhám).

Vizsgálatmenet: egy vizsgálatmenet során egy vagy több vizsgálati vegyi anyagot vizsgálnak egy párhuzamos negatív kontrollal és egy pozitív kontrollal.

SD: standard deviáció.

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vizsgálati vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálat helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (18).

Súlyos szemkárosodás: a vizsgálati anyagnak a szem külső felületére való juttatását követően olyan szövetkárosodás kialakulása vagy a látás olyan súlyos fizikai romlása, amely a beadást követően 21 napon belül nem fordítható vissza teljes mértékben. Megfelel az „irreverzibilis szemkárosodás" fogalmának és az „ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriának".

Szabványműveleti eljárások: formális, írásba foglalt eljárások, amelyek részletesen ismertetik bizonyos rutinjellegű és vizsgálatspecifikus laboratóriumi műveletek végrehajtási módját. Kidolgozásukat a helyes laboratóriumi gyakorlatok teszik szükségessé.

Specificitás: a vizsgálat elvégzésével helyesen besorolt összes negatív/inaktív vizsgálati vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (18).

Anyag: olyan természetes állapotban előforduló vagy gyártási eljárásból származó kémiai elem és vegyületei, amely a stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagot és az alkalmazott eljárásból származó szennyező anyagokat is tartalmazhat, de nem tartalmaz olyan oldószert, amely az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltoztatása nélkül elkülöníthető.

Vizsgálat: egyetlen vizsgálati vegyi anyag egyidejű tesztelése legalább két szövetreplikátumon, a megfelelő szabványműveleti eljárásban meghatározott módon.

Szövet-életképesség: egy sejtpopuláció rekonstruált szöveten belüli teljes aktivitását, például az életfontosságú MTT-festékanyag csökkentésének képességét mérő paraméter, amely a mért végponttól és az alkalmazott vizsgálat felépítésétől függően korrelál az élő sejtek teljes számával és/vagy az életképességükkel.

Felülről építkező megközelítés: a feltehetőleg súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyag esetén alkalmazott lépcsőzetes megközelítés, amely a súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyagok (pozitív eredmény) más vegyi anyagokhoz (negatív eredmény) viszonyított meghatározásával kezdődik.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Többszintű vizsgálati stratégia: lépcsőzetes vizsgálati stratégia, amely a vizsgálati módszereket egymást követően alkalmazza. A vizsgálati vegyi anyagra vonatkozó valamennyi információt áttekintik az egyes szinteken, és a bizonyítékok súlyozásával meghatározzák, hogy a stratégia következő szintjére való továbblépés előtt a veszélyességi osztályozásra vonatkozó döntéshez elegendő információ áll-e rendelkezésre. Ha a vizsgálati vegyi anyag veszélyességi potenciálja/hatáserőssége a rendelkezésre álló információk alapján az adott szinten megállapítható, további vizsgálatra nincs szükség (18).

ULOQ: mennyiségi meghatározás felső határértéke.

A vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete által globálisan harmonizált rendszere (ENSZ-GHS): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (1).

ENSZ-GHS és CLP-rendelet szerinti 1. kategória: lásd: „Súlyos szemkárosodás”.

ENSZ-GHS és CLP-rendelet szerinti 2. kategória: lásd: „Szemirritáció”.

ENSZ-GHS és CLP-rendelet szerint nem besorolt: az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. vagy 2. (illetve az ENSZ-GHS szerinti 2A. vagy 2B.) kategóriába való besorolás követelményeinek nem megfelelő vegyi anyagok. Megfelelnek a „Kategória nélküli” vegyi anyagoknak.

UPLC: ultranagy teljesítményű folyadékkromatográfia.

UVCB: ismeretlen vagy változó összetételű anyagok, valamint komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok.

Érvényes vizsgálati módszer: olyan vizsgálati módszer, amely kellően relevánsnak és megbízhatónak minősül egy adott célra, és amely tudományosan megalapozott elveken alapul. Egy-egy vizsgálati módszer abszolút értelemben soha nem érvényes, kizárólag meghatározott céllal összefüggésben az (18).

Validált vizsgálati módszer: olyan vizsgálati módszer, amelynek az adott céllal kapcsolatos relevanciája (pontosságát is ideértve) és megbízhatósága validálási vizsgálatok alapján megállapítást nyert. Fontos megjegyezni, hogy a validált vizsgálati módszer a javasolt felhasználási célra nem feltétlenül kínál megfelelő pontosságú és megbízhatóságú elfogadható eljárást (18).

VRM: validált referenciamódszer.

VRM1: az 1. validált referenciamódszer az EpiOcular™ EIT vizsgálatra utal.

VRM2: a 2. validált referenciamódszer a SkinEthic™ HCE EIT vizsgálatra utal.

A bizonyítékok súlyozása: a rendelkezésre álló különféle érvek és ellenérvek mérlegelésének folyamata az adott vizsgálati anyag veszélyességével kapcsolatban a megfelelő következtetés levonása és alátámasztása céljából.

2. függelék

A SZEMIRRITÁCIÓ VAGY A SÚLYOS SZEMKÁROSODÁS TEKINTETÉBEN BESOROLÁST ÉS CÍMKÉZÉST NEM IGÉNYLŐ VEGYI ANYAGOK AZONOSÍTÁSÁRA HITELESÍTETT RHCE VIZSGÁLATOK FŐBB ÖSSZETEVŐI

A vizsgálat összetevői	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Protokollok	Folyadékok (15 percig pipettálható 37 ± 1 °C vagy alacsonyabb hőmérsékleten)	Szilárd anyagok (nem pipettálható)	Folyadékok és viszkózus anyagok (pipettálható)	Szilárd anyagok (nem pipettálható)
A modell felülete	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
A szövetreplikátumok száma	Legalább 2	Legalább 2	Legalább 2	Legalább 2
Színinterferencia előzetes felmérése	50 µl + 1 ml H_2O 60 percig 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett (nem színes vizsgálati vegyi anyagok esetében), vagy 50 µl + 2 ml izopropanol 2–3 óráig szobahőmérsékleten keverve (színes vizsgálati vegyi anyagok esetében) →ha a vizsgálati vegyi anyag OD-értéke 570 ±20 nm-en az izopropanol vagy a víz OD-értékének levonását követően nagyobb mint 0,08 (ami megközelítőleg a negatív kontroll OD-átlagának 5 %-a), élő szöveteken adaptált kontrollt kell végezni.	50 mg + 1 ml H_2O 60 percig 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett (nem színes vizsgálati vegyi anyagok esetében) és/vagy 50 mg + 2 ml izopropanol 2–3 óráig szobahőmérsékleten keverve (színes és nem színes vizsgálati vegyi anyagok esetében) →ha a vizsgálati vegyi anyag OD-értéke 570 ±20 nm-en az izopropanol vagy a víz OD-értékének levonását követően nagyobb mint 0,08 (ami megközelítőleg a negatív kontroll OD-átlagának 5 %-a), élő adaptált kontrollt kell végezni.	10 µl + 90 µl H_2O 30 ±2 percig szobahőmérsékleten (18–28 °C) keverve →ha a vizsgálati vegyi anyag elszíneződik, élő szöveteken adaptált kontrollt kell végezni	10 mg + 90 µl H_2O 30 ±2 percig szobahőmérsékleten keverve →ha a vizsgálati vegyi anyag elszíneződik, élő szöveteken adaptált kontrollt kell végezni

A vizsgálat összetevői	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Közvetlen MTT-redukáló hatás előzetes felmérése	50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml koncentrációjú oldata 180 ±15 percig 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett →ha az oldat színe kékre/lilára vált, fagyasztással elölt adaptált kontrollt kell végezni (negatív kontrollként MTT-oldatba helyezett 50 µl steril ionmentesített vizet használnak)	50 mg + 1 ml MTT 1 mg/ml koncentrációjú oldata 180 ±15 percig 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett →ha az oldat színe kékre/lilára vált, fagyasztással elölt adaptált kontrollt kell végezni (negatív kontrollként MTT-oldatba helyezett 50 µl steril ionmentesített vizet használnak)	30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml koncentrációjú oldata 180 ±15 percig 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett →ha az oldat színe kékre/lilára vált, vízben elölt adaptált kontrollt kell végezni (negatív kontrollként MTT-oldatba helyezett 30 µl steril ionmentesített vizet használnak)	30 mg + 300 µl MTT 1 mg/ml koncentrációjú oldata 180 ±15 percig 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett →ha az oldat színe kékre/lilára vált, vízben elölt adaptált kontrollt kell végezni (negatív kontrollként MTT-oldatba helyezett 30 µl steril ionmentesített vizet használnak)
Előkezelés	20 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-mentes DPBS 30 ± 2 percig 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett, fénytől védve.	20 µl Ca^{2+}/Mg^{2+} -mentes DPBS 30 ± 2 percig 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett, fénytől védve.	—	—
A kezelési dózisok és alkalmazásuk	50 µl (83,3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2) kalibrált eszközzel mérve (e.g. egy csapott kanál, amit 50 mg nátrium-kloridra kalibráltak).	10 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-mentes DPBS + 30 ± 2 µl (60 µl/cm^2) Viszkózus anyagokhoz nejlonháló használata ajánlott	30 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-mentes DPBS + 30 ± 2 mg (60 mg/cm^2)
Expozíciós idő és hőmérséklet	30 perc (± 2 perc) tápoldatban 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett	6 óra (± 0,25 óra) tápoldatban 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett	30 perc (± 2 perc) tápoldatban 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett	4 óra (± 0,1 óra) tápoldatban 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett

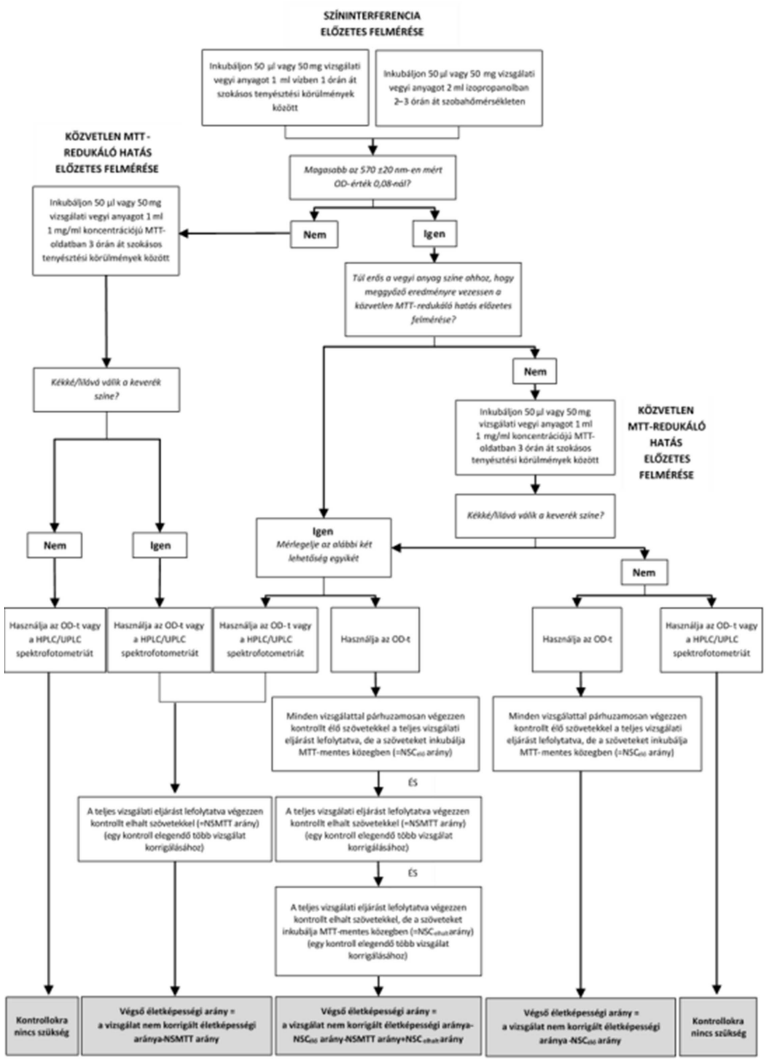
A vizsgálat összetevői	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Átmosás szobahőmérsékleten	3 alkalommal 100 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-mentes DPBS-ben	3 alkalommal 100 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-mentes DPBS-ben	20 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-mentes DPBS	25 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-mentes DPBS
Expozíció utáni merítés	12 perc (± 2 perc) szobahőmérsékleten tápoldatban	25 perc (± 2 perc) szobahőmérsékleten tápoldatban	30 perc (± 2 perc) 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH tápoldatban	30 perc (± 2 perc) szobahőmérsékleten tápoldatban
Expozíció utáni inkubáció	120 perc (± 15 perc) tápoldatban 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett	18 óra (± 0,25 óra) tápoldatban 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett	Nincs	18 óra (± 0,5 óra) tápoldatban 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett
Negatív kontroll	50 µl H_2O Párhuzamosan vizsgálva	50 µl H_2O Párhuzamosan vizsgálva	30 ± 2µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-mentes DPBS Párhuzamosan vizsgálva	30 ± 2µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-mentes DPBS Párhuzamosan vizsgálva
Pozitív kontroll	50 µl metil-acetát Párhuzamosan vizsgálva	50 µl metil-acetát Párhuzamosan vizsgálva	30 ± 2µl metil-acetát Párhuzamosan vizsgálva	30 ± 2µl metil-acetát Párhuzamosan vizsgálva

A vizsgálat összetevői	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
MTT-oldat	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT inkubációs idő és hőmérséklet	180 perc (± 15 perc) 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett	180 perc (± 15 perc) 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett	180 perc (± 15 perc) 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett	180 perc (± 15 perc) 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett
Extraháló oldószer	2 ml izopropanol (kinyerés az inzert tetejéről és aljáról a szövet átszúrásával)	2 ml izopropanol (kinyerés az inzert aljáról a szövet átszúrásával)	1,5 ml izopropanol (kinyerés az inzert tetejéről és aljáról)	1,5 ml izopropanol (kinyerés az inzert aljáról)
Extrakciós időtartam és hőmérséklet	2–3 óra rázatással (~120 rpm) szobahőmérsékleten vagy éjszaka 4–10 °C-on	2–3 óra rázatással (~120 rpm) szobahőmérsékleten vagy éjszaka 4–10 °C-on	4 óra rázatással (~120 rpm) szobahőmérsékleten vagy rázatás nélkül legalább egész éjszaka 4–10 °C-on	Legalább 2 óra rázatással (~120 rpm) szobahőmérsékleten
OD leolvasás	570 nm (550–590 nm) referenciaszűrő nélkül	570 nm (550–590 nm) referenciaszűrő nélkül	570 nm (540–600 nm) referenciaszűrő nélkül	570 nm (540–600 nm) referenciaszűrő nélkül
Szövet minőség-ellenőrzése	Kezelés 100 µl 0,3 térfogatszázalékos Triton X-100-zal 12,2 perc ≤ ET_{50} ≤ 37,5 perc	Kezelés 100 µl 0,3 térfogatszázalékos Triton X-100-zal 12,2 perc ≤ ET_{50} ≤ 37,5 perc	30 perces kezelés nátrium-dodecil-szulfáttal (SDS) (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,5 mg/ml	30 perces kezelés nátrium-dodecil-szulfáttal (SDS) (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml

A vizsgálat összetevői	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Elfogadhatósági kritériumok	1. A negatív kontrollal kezelt szövetreplikátumok átlagos OD-értékének 0,8-nál nagyobbnak és 2,5-nél kisebbnek kell lennie 2. A pozitív kontrollal 30 percen át kezelt szövetreplikátumok átlagos, a negatív kontroll százalékában kifejezett életképessége nem érheti el az 50 %-ot 3. A két szövetreplikátum életképessége közötti különbség nem érheti el a 20 %-ot.	1. A negatív kontrollal kezelt szövetreplikátumok átlagos OD-értékének 0,8-nál nagyobbnak és 2,5-nél kisebbnek kell lennie 2. A pozitív kontrollal 6 órán át kezelt szövetreplikátumok átlagos, a negatív kontroll százalékában kifejezett életképessége nem érheti el az 50 %-ot 3. A két szövetreplikátum életképessége közötti különbség nem érheti el a 20 %-ot.	1. A negatív kontrollal kezelt szövetreplikátumok átlagos OD-értékének 1,0-nál nagyobbnak, de legfeljebb 2,5-nek kell lennie 2. A pozitív kontrollal 30 percen át kezelt szövetreplikátumok átlagos, a negatív kontroll százalékában kifejezett életképessége nem haladhatja meg a 30 %-ot 3. A két szövetreplikátum életképessége közötti különbség nem érheti el a 20 %-ot.	1. A negatív kontrollal kezelt szövetreplikátumok átlagos OD-értékének 1,0-nál nagyobbnak, de legfeljebb 2,5-nek kell lennie 2. A pozitív kontrollal 4 órán át kezelt szövetreplikátumok átlagos, a negatív kontroll százalékában kifejezett életképessége legfeljebb 20 % lehet 3. A két szövetreplikátum életképessége közötti különbség nem érheti el a 20 %-ot.

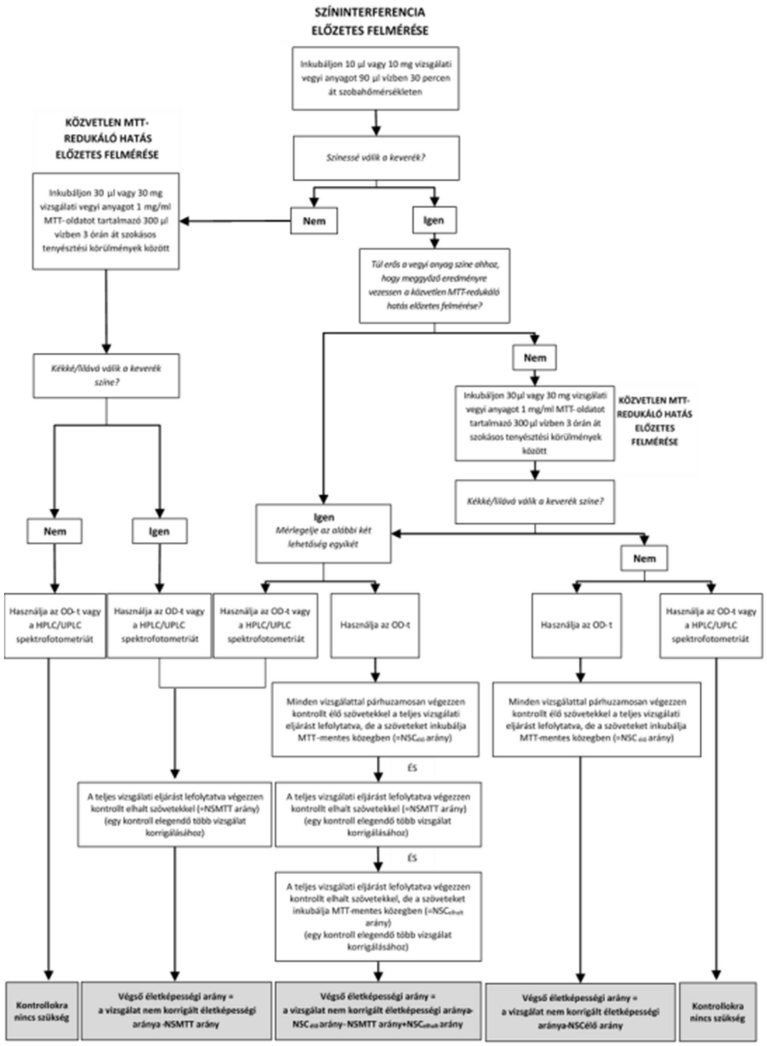
3. függelék

A VRM1 SZABVÁNYMŰVELETI ELJÁRÁSÁN ALAPULÓ SZEMLÉLTETŐ FOLYAMATÁBRA ARRÓL, HOGYAN LEHET AZONOSÍTANI ÉS KEZELNI A KÖZVETLEN MTT-REDUKÁLÓ ÉS/VAGY SZÍNINTERFERENCIÁT OKOZÓ VEGYI ANYAGOKAT



4. függelék

A VRM2 SZABVÁNYMŰVELETI ELJÁRÁSÁN ALAPULÓ SZEMLÉLTETŐ FOLYAMATÁBRA ARRÓL, HOGYAN LEHET AZONOSÍTANI ÉS KEZELNI A KÖZVETLEN MTT-REDUKÁLÓ ÉS/VAGY SZÍNINTERFERENCIÁT OKOZÓ VEGYI ANYAGOKAT



5. függelék

AZ RHCE SZÖVETKONSTRUKCIÓKBÓL KIVONT MTT-FORMAZÁN MÉRÉSÉRE HASZNÁLT HPLC/UPLC SPEKTROFOTOMETRIÁS RENDSZER MINŐSÍTÉSÉNEK FŐBB PARAMÉTEREI ÉS ELFOGADHATÓSÁGI KRITÉRIUMAI

Paraméter	Az FDA-iránymutatás szerinti protokoll (36) (38)	Elfogadhatósági kritériumok
Szelektivitás	Izopropanol elemzése, élő vakpróba (nem kezelt élő RhCE-szövetekből kivont izopropanol), elhalt vakpróba (nem kezelt elhalt RhCE-szövetekből kivont izopropanol), és egy festék (pl. metilénkék) elemzése	$Terület_{interferencia} \leq Terület_{AMHÉ}$ ([1]) 20 %-a
Precizitás	Minőség-ellenőrzések (vagyis MTT-formazán 1,6 μg/ml, 16 μg/ml és 160 μg/ml mellett) izopropanolban (n=5)	Variációs koefficiens ≤ 15 % vagy ≤ az AMHÉ 20 %-a
Pontosság	Minőség-ellenőrzés izopropanolban (n=5)	Eltérési arány ≤ 15 % vagy ≤ az AMHÉ 20 %-a
Mátrixhatás	Minőség-ellenőrzés élő vakpróbán (n=5)	85 % ≤ Mátrixhatás % ≤ 115 %
Átvitel	Izopropanol elemzése egy FMHÉ ([2]) szabvány után	$Terület_{interferencia} \leq Terület_{AMHÉ}$ 20 %-a
Megismételhetőség (napon belüli)	3 független kalibrációs görbe (izopropanolba helyezett MTT-formazán 6 egymás utáni 1/3-os hígítása kezdve a FMHÉ-nél, vagyis 200 μg/ml-nél); Minőség-ellenőrzés izopropanolban (n=5)	Kalibrációs görbék: Eltérési arány ≤ 15 % vagy ≤ az AMHÉ 20 %-a Minőség-ellenőrzések: Eltérési arány ≤ 15 % és variációs koefficiens ≤ 15 %
Megismételhetőség (napok közötti)	1. nap: 1 kalibrációs görbe és minőség-ellenőrzések izopropanolban (n=3) 2. nap: 1 kalibrációs görbe és minőség-ellenőrzések izopropanolban (n=3) 3. nap: 1 kalibrációs görbe és minőség-ellenőrzések izopropanolban (n=3)	
Az MTT-formazán rövid távú stabilitása az RhCE szövetkivonatban	Minőség-ellenőrzések élő vakpróbán (n=3) a készítés napján és 24 órás szobahőmérsékleten való tárolás után	Eltérési arány ≤ 15 %
Az MTT-formazán hosszú távú stabilitása az RhCE szövetkivonatban, ha szükséges	Minőség-ellenőrzések élő vakpróbán (n=3) a készítés napján és több napon keresztüli -20 °C-on való tárolás után	Eltérési arány ≤ 15 %

([1]) LLOQ: mennyiségi meghatározás alsó határértéke, amely 1–2 %-os szöveti életképességet takar, vagyis 0,8 μg/ml.
([2]) ULOQ: mennyiségi meghatározás felső határértéke, amely legalább kétszer akkora, mint a negatív kontroll izopropanolban várható legmagasabb MTT-formazán koncentrációja (~70 μg/ml a VRM-ben), vagyis 200 μg/ml.

B.70. **A VEGYI ANYAGOK ÖSZTROGÉNRECEPTOROKHOZ KÖTÉSI AFFINITÁSÁNAK HUMÁN REKOMBINÁNS ÖSZTROGÉNRECEPTORRAL (hrER) TÖRTÉNŐ ÉSZLELÉSÉRE SZOLGÁLÓ *IN VITRO* VIZSGÁLATOK**

ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

Az OECD teljesítményalapú vizsgálati iránymutatása

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 493. vizsgálati iránymutatásában (2015) leírt módszerrel. A 493. teljesítményalapú vizsgálati iránymutatás (PBTG) az ösztrogénreceptorokhoz kötési affinitást mutató anyagok észlelésére szolgáló humán rekombináns *in vitro* vizsgálatok (humán ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatok) módszertanát ismerteti. Az iránymutatás az ösztrogénreceptort (vagyis az ERα-t) kötő anyagok azonosítását lehetővé tévő két, végrehajtás és funkcionalitás szempontjából hasonló vizsgálati módszert tartalmaz, és a veszély értékelésére szolgáló új és átdolgozott vizsgálati módszerek validálásáról és nemzetközi elfogadásról szóló OECD-irányelvben (1) megfogalmazott validálási elvekkel összhangban megkönnyíti az új – hasonló vagy módosított – vizsgálati módszerek kidolgozását. E teljesítményalapú vizsgálati iránymutatás alapjául szolgáló, teljes körűen validált (a 2. és a 3. függelékben ismertetett) vizsgálati referenciamódszerek a következők:

— a teljes hosszúságú humán rekombináns ERα használatán alapuló Freyberger-Wilson-féle (FW) *in vitro* ösztrogénreceptor-kötési vizsgálat (2), valamint

— a Chemical Evaluation and Research Institute (CERI) által kidolgozott *in vitro* ösztrogénreceptor-kötési vizsgálat, amely humán rekombináns fehérje ligandumkötő-doménjének használatán alapul (2).

A rendelkezésre álló teljesítményszabványok (3) megkönnyítik az ugyanezt a veszélyes végpontot célzó hasonló vizsgálati módszerek kidolgozását és validálását, és lehetővé teszik a 493. teljesítményalapú vizsgálati iránymutatás időben történő módosítását, hogy az új, hasonló vizsgálatokat be lehessen építeni az átdolgozott iránymutatásba. Hasonló vizsgálatok azonban csak azután foglalhatók bele az iránymutatásba, hogy az OECD felülvizsgálta és jóváhagyta a teljesítményszabványok teljesülését. A 493. vizsgálati iránymutatás alá tartozó vizsgálatok egységesen felhasználhatók az OECD-tagállamok ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatok eredményeire vonatkozó követelményeinek kialakításához, ugyanakkor biztosítják az adatok kölcsönös elfogadásának előnyeit.

A vizsgálati módszerhez tartozó vizsgálatok háttere és elvei

2. Az OECD 1998-ban kiemelt fontosságú tevékenységet indított az endokrin rendszert esetlegesen károsító vegyi anyagok kiszűrésére és vizsgálatára vonatkozó meglévő vizsgálati iránymutatások felülvizsgálata, valamint új vizsgálati iránymutatások kidolgozása érdekében. Az OECD endokrin rendszert károsító anyagok vizsgálatára és értékelésére szolgáló fogalmi keretét 2012-ben átdolgozták. Az elvi keretrendszer eredeti és átdolgozott változatát mellékletként csatolták az endokrin rendszert károsító vegyi anyagok értékelésére vonatkozó szabványosított vizsgálati iránymutatásokról szóló iránymutatáshoz (4). Az elvi keretrendszer öt szintet határoz meg, amelyek mindegyike a biológiai komplexitás egy különálló szintjének felel meg. Az e vizsgálati módszer keretében ismertetett ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatok a 2. szinten helyezkednek el, amely magában foglalja „*a kiválasztott endokrin mechanizmus(ok)ról/útvonal(ak)ról adatokat szolgáltató in vitro vizsgálatokat*”. Ez a vizsgálati módszer olyan *in vitro* receptorkötési vizsgálatokhoz használatos, amelyek célja a humán ösztrogénreceptor alfa (ERα) ligandumainak azonosítása.

3. Egyértelműen bizonyították az *in vitro* ösztrogénreceptor-kötési vizsgálat biológiai funkciók terén betöltött jelentőségét. Az ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatokat abból a célból hozták létre, hogy beazonosítsák az ösztrogén hormon szignalizációs útvonalát potenciálisan zavaró vegyi anyagokat, és az elmúlt két évtized során széles körben alkalmazták őket az ösztrogénreceptor szöveti eloszlásának jellemzésére, valamint az ösztrogénreceptor agonistáinak/antagonistáinak azonosítására. Ezek a vizsgálatok az ösztrogén szignalizációs útvonalának első lépését jelentő ligandum-receptor kölcsönhatással foglalkoznak, ami kulcsfontosságú szerepet tölt be minden gerinces élőlény szaporodási funkciójában.

4. Az ösztrogének és az ösztrogénreceptorok kölcsönhatása befolyásolhatja az ösztrogénhatásra érzékeny gének transzkripcióját és okozhat nem-genomiális hatásokat, amelyek többek között a sejtosztódás, a normál magzati fejlődés és a szaporodási funkciók sejtszintű előidézéséhez vagy gátlásához vezethetnek (5) (6) (7). A normál ösztrogénrendszerek zavara károsan befolyásolhatja a normál egyedfejlődést (ontogenezist), a reprodukciós egészséget és a reproduktív rendszer integritását. A nem megfelelő ösztrogénreceptor szignál olyan hatásokat válthat ki, mint a hormonfüggő daganatos betegségek megemelkedett kockázata, a termékenység csökkenése, valamint a magzati növekedési és fejlődési rendellenességek (8).

5. Az *in vitro* kötési vizsgálatok egy anyagnak a specifikus receptor ligandumkötő helyével történő közvetlen kölcsönhatásán alapulnak, ami a géntranszkripciót szabályozza. A humán rekombináns ösztrogénreceptor alfa (hrERα) kötési vizsgálat főként a radioaktívan jelölt ligandum (a [^{3}H]-17β-ösztradiol) ösztrogénreceptorhoz történő kötését méri a vizsgálati vegyi anyag (vagyis a kompetítor) növekvő koncentrációjának jelenlétében. Az ösztrogénreceptorok iránt nagy affinitást mutató vizsgálati vegyi anyagok alacsonyabb koncentrációban versenyeznek a radioaktívan jelölt ligandummal azokhoz a vegyi anyagokhoz képest, amelyek kisebb affinitást mutatnak a receptor iránt. A vizsgálat két fő összetevőből áll: egy telítési kötési kísérletből, amelynek során meghatározzák a receptor-ligandum kölcsönhatás paramétereit és dokumentálják az ösztrogénreceptor-specifikusságot, majd egy kompetitív kötési kísérletből, amely jellemzi a vizsgálati vegyi anyag és a radioaktívan jelölt ligandum ER-kötőhelyekért folytatott vetélkedését.

6. A CERI és a Freyberger–Wilson kötési vizsgálat validálási tanulmánya igazolta, hogy e vizsgálatok tervezett felhasználásuk tekintetében relevánsak és megbízhatóak (2).

7. A vizsgálati módszerben használt fogalmak és rövidítések meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A receptorkötési vizsgálatok alkalmazási területe és korlátai

8. E vizsgálatokat szűrési és rangsorolási célra ajánlják, ugyanakkor a molekuláris kiváltó eseményre vonatkozólag is képesek adatokat szolgáltatni, amelyek felhasználhatók egy bizonyítékok súlyozásán (WoE) alapuló megközelítésben. A vizsgálatok tárgya az ösztrogénreceptor α ligandumkötő doménjén *in vitro* létrejövő kémiai kötés. Ezért az eredményekből nem lehet közvetlenül következtetni az intakt *in vivo* endokrin rendszerben megvalósuló összetett jelátvitelre és szabályozásra.

9. A természetes ligandum, a 17β-ösztradiol megkötése az első lépése annak a molekuláris eseménysorozatnak, amely aktiválja a célgének transzkripcióját, majd végül egy fiziológiai változást idéz elő (9). Tehát az ösztrogénreceptor α ligandumkötő doménjéhez való kötést az ösztrogénreceptorok által kiváltott endokrin zavarok (ED) egyik fő mechanizmusaként tartják számon, bár más mechanizmusok is okozhatnak endokrin zavarokat, többek között i. az ösztrogénreceptor α ligandumkötő régióján kívüli részeivel létrejött kölcsönhatások, ii. az ösztrogén jelátvitel szempontjából releváns más receptorokkal, mint pl. az ösztrogénreceptor β-val, az ösztrogénreceptorokkal kapcsolt g-fehérjékkel, az endokrin rendszeren belüli más receptorokkal és enzimrendszerekkel létrejött kölcsönhatások, iii. hormonszintézis, iv. a hormonok metabolikus aktiválása és/vagy inaktiválása, v. hormonok elszállítása a célszövetekhez és vi. hormonok kiürülése a szervezetből. E hatásmechanizmusokkal a vizsgálati módszer alá tartozó vizsgálatok egyike sem foglalkozik.

10. E vizsgálati módszer célja, hogy felmérje az anyagok humán ösztrogénreceptor α-hoz való kötődési képességét, és nem teszi lehetővé az ösztrogénreceptor α agonistái és antagonistái közötti különbségtételt. E vizsgálatok nem foglalkoznak továbbá az eseménysorozat későbbi történéseivel, például a géntranszkripcióval vagy a fiziológiai változásokkal. Mivel a validálás során csak különálló, egy komponensű anyagokat használtak, a vizsgálat keverékekre való alkalmazhatósága nem vetődött fel. Mindazonáltal a vizsgálatok elvileg alkalmazhatók több összetevőből álló anyagok és keverékek vizsgálatára. A vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény.

11. A sejtmentes receptorrendszerek nem rendelkeznek saját metabolikus képességgel, metabolikus enzimrendszerekkel kombinált használatukat pedig nem validálták. Elképzelhető, hogy kidolgozható lenne egy metabolikus aktivitást magában foglaló vizsgálat, ez azonban további validálást tenne szükségessé.

12. Azok a vegyi anyagok, amelyek denaturálhatják a fehérjét (vagyis a receptor fehérjét), például a felületaktív anyagok, vagy amelyek módosíthatják a vizsgálati puffer pH-értékét, nem vizsgálhatók, vagy csak olyan koncentrációkban vizsgálhatók, amelyek nem idéznek elő ilyen hatásokat. Ezen túlmenően egy adott vizsgálati vegyi anyag tesztelhető koncentrációtartományát a vizsgálati pufferben való oldhatósága is korlátozza.

13. Az 1. táblázat tájékoztatási céllal ismerteti az e vizsgálati módszer által leírt mindkét teljes körűen validált vizsgálatban tesztelt 24 anyagra vonatkozó eredményeket. A szóban forgó anyagok közül 17-et ösztrogénreceptorhoz kötődő anyagként határoztak meg, 6-ot pedig nem kötődőnek minősítették a közzétett vizsgálati jelentésnek, többek között az *in vitro* ösztrogénreceptor transzkripciós aktivációs vizsgálatok és/vagy az uterotrofikus vizsgálat alapján (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Az 1. táblázatban összefoglalt adatok vonatkozásában 10^{-4} M koncentrációig szinte 100 %-os egyezés mutatható ki a két vizsgálat között valamennyi anyag besorolása tekintetében, és minden anyagot helyesen osztályoztak ösztrogénreceptorhoz kötődő és nem kötődő anyagként. Erről az anyagcsoportról, valamint a validálási tanulmányok során az ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatokban tesztelt egyéb anyagokról a humán ösztrogénreceptorhoz-kötési vizsgálat teljesítményszabványai nyújtanak bővebb tájékoztatást (3), lásd a 2. függeléket (1., 2., és 3. táblázat).

1. táblázat

A Freyberger–Wilson (FW) és a CERI humán ösztrogénreceptor-kötési vizsgálat során tesztelt anyagok ösztrogénreceptorhoz kötődő és nem kötődő anyagként való besorolása a várt válasszal való összevetésben

	Az anyag neve	CAS-szám	Várt válasz	FW vizsgálat		CERI vizsgálat		MESH kémiai osztály	Termékosztály
				Koncentráció- tartomány (M)	Besorolás	Koncentráció- tartomány (M)	Besorolás		
1	17β-ösztradiol	50-28-2	*Kötődő*	1×10^{-11}–1×10^{-6}	Kötődő	1×10^{-11}–1×10^{-6}	Kötődő	Szteroid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
2	Noretinodrel	68-23-5	*Kötődő*	3×10^{-9}–30×10^{-4}	Kötődő	3×10^{-9}–30×10^{-4}	Kötődő	Szteroid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
3	Noretindron	68-22-4	*Kötődő*	3×10^{-9}–30×10^{-4}	Kötődő	3×10^{-9}–30×10^{-4}	Kötődő	Szteroid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
4	Di-*n*-butil-ftalát	84-74-2	*Nem kötődő* (*)	1×10^{-10}–1×10^{-4}	Nem kötődő (**) ()	1×10^{-10}–1×10^{-4}	Nem kötődő (**) ()	Szénhidrogén (ciklikus), észter	Lágyítószer, köztes vegyi anyag
5	Dietilstilbösztrol	56-53-1	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Szénhidrogén (ciklikus), fenol	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
6	17α-etinilösztradiol	57-63-6	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Szteroid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
7	Mezo-hexestrol	84-16-2	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Szénhidrogén (ciklikus), fenol	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
8	Geniszten	446-72-0	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Szénhidrogén (heterociklikus), flavonid	Természetes termék
9	Equol	531-95-3	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Fitoösztrogén metabolit	Természetes termék
10	Butil-parabén (nátrium-butil-4-hidroxi-benzoát)	94-26-8	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Parabén	Tartósítószer

	Az anyag neve	CAS-szám	Várt válasz	FW vizsgálat		CERI vizsgálat		MESH kémiai osztály	Termékosztály
				Koncentráció- tartomány (M)	Besorolás	Koncentráció- tartomány (M)	Besorolás		
11	Nonilfenol (keverék)	84852-15-3	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Alkil-fenol	Köztes vegyület
12	*o,p'*-DDT	789-02-6	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Szerves klór	Rovarölő szer
13	Kortikoszteron	50-22-6	*Nem kötődő* (*)	1×10^{-10}–1×10^{-4}	Nem kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-4}	Nem kötődő	Szteroid	Természetes termék
14	Zearalenon	17924-92-4	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Szénhidrogén (heterociklikus), lakton	Természetes termék
15	Tamoxifén	10540-29-1	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Szénhidrogén (ciklikus)	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
16	5α-dihidroteszteron	521-18-6	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Szteroid, nem fenolos	Természetes termék
17	Biszfenol-A	80-05-7	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Fenol	Köztes vegyi anyag
18	4-n-heptilfenol	1987-50-4	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kétértelmű [a]	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Alkil-fenol	Köztes
19	Kepone (klórdekon)	143-50-0	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Szénhidrogén (halogénezett)	Peszticid
20	Benz(a)antracén	56-55-3	*Nem kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Nem kötődő [b]	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Nem kötődő [b]	Aromás szénhidrogén	Köztes
21	Enterolakton	78473-71-9	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Fitoösztrogén	Természetes termék
22	Progeszteron	57-83-0	*Nem kötődő* (*)	1×10^{-10}–1×10^{-4}	Nem kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-4}	Nem kötődő	Szteroid	Természetes termék

	Az anyag neve	CAS-szám	Várt válasz	FW vizsgálat		CERI vizsgálat		MESH kémiai osztály	Termékosztály
				Koncentráció- tartomány (M)	Besorolás	Koncentráció- tartomány (M)	Besorolás		
23	Oktil-trietoxi-szilán	2943-75-1	*Nem kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Nem kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Nem kötődő	Szilán	Felületmódosító
24	Atrazin	1912-24-9	*Nem kötődő* (*)	1×10^{-10}–1×10^{-4}	Nem kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-4}	Nem kötődő	Heterociklikus vegyület	Gyomirtó szer

(*) Oldhatósági határérték < 1×10^{-4} M.

(**) A di-n-butil-ftalát (DBP) nem kötődő anyagként való alkalmazása és besorolása 10^{-4} M koncentrációig történő vizsgálatán alapul, mivel az elővalidálási tanulmányok során néhány laboratóriumban 10^{-3} M koncentrációban oldhatatlannak bizonyult (pl. zavarosságot mutatott).

([1]) A validálási tanulmány során a di-*n*-butil-ftalátot (DBP) kódolt vizsgálati anyagként tesztelték, 10^{-3} M koncentrációig. E feltételek mellett bizonyos laboratóriumok a legmagasabb koncentrációnál (10^{-3} M) a radioaktív ligandum kötődésének csökkenését figyelték meg és/vagy kétértelmű görbeillesztést tapasztaltak. E vizsgálatmenetek tekintetében a DBP a CERI vizsgálatot alkalmazó öt laboratórium közül háromban, és a Freyberger–Wilson vizsgálatot alkalmazó hat laboratórium közül ötben „kétértelmű” vagy „kötődő” besorolást kapott (lásd a (2) referencia IV.B.3a,b és VI.A részeit).

([a]) Besorolása nem egyezik a várt besorolással. Mivel a 4-*n*-heptilfenolt öt laboratórium közül három „kétértelműnek” vagy „nem kötődőnek” minősítette, az átlag alapján kétértelmű besorolást kapott. Az alaposabb vizsgálat feltárta, hogy ennek oka a vegyi anyag oldhatósági korlátaiban keresendő, amelyek megakadályozták a teljes kötési görbe létrehozását.

([b]) A benz(a)antracén a validálási tanulmány során új besorolást kapott, nem kötődő (vagyis negatív) anyagként azonosították a közzétett szakirodalom alapján, amely igazolta, hogy az anyag *in vitro* megfigyelt ösztrogénhatású aktivitása (16) elsősorban metabolikus aktiválásától függ(17)(18). Az anyag enzimatikus metabolikus aktiválása nem várható az ezen, laboratóriumok közötti intervalidálási tanulmány keretében alkalmazott sejtmentes humán ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatokban. Ezért a Freyberger–Wilson és a CERI vizsgálat kísérleti körülményei között történő alkalmazása szempontjából az anyag helyes besorolása a „nem kötődő”.

A humán ÖSZTROGÉNRECEPTOR-KÖTÉSI VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI

A vizsgálat alapvető összetevői

14. Ez a vizsgálati módszer olyan vizsgálatokra vonatkozik, amelyek ösztrogénreceptort és a receptorhoz kellően nagy affinitással kötődő ligandumot alkalmaznak, amely a vizsgálat során markerként/nyomjelzőként használható, és a vizsgálati vegyi anyagok növekvő koncentrációjával leszorítható. A kötési vizsgálatok az alábbi két fő összetevőből állnak: 1) telítési kötés és 2) kompetitív kötés. A telítési kötési vizsgálat során ellenőrzik a receptor preparátumok specifikusságát és aktivitását, a kompetitív kötési kísérlet során pedig értékelik a vizsgálati vegyi anyagok humán ösztrogénreceptorhoz való kötési képességét.

Kontrollok

15. Meg kell határozni, hogy mi alapján javasolják a párhuzamosan vizsgált referenciaösztrogént és kontrollanyagokat. Az egyidejűleg elvégzett kontrollok (oldószeres (vivőanyagos), pozitív (ösztrogénreceptorhoz kötődő; erős és gyenge affinitással rendelkező) és negatív (nem kötődő) kontrollok) arra szolgálnak, hogy igazolják a vizsgálat tesztkörülmények közötti megfelelő működését, és megteremtsék az alapját az egyes kísérletek összevetésének; általában részét képezik a szóban forgó kísérlet elfogadhatósági kritériumainak (1). Minden vizsgálatmenetben ugyanazon a lemezen vizsgálni kell a referenciaösztrogén teljes koncentrációgörbéjét és a kontrollanyagokat (vagyis a gyengén kötődő és a nem kötődő anyagot). Az összes többi lemeznek az alábbiakat kell tartalmazniuk: 1) az E2 és a gyengén kötődő anyag magas koncentrációját (amely megközelítőleg teljesen leszorítja a radioaktívan jelölt ligandumot) és közepes koncentrációját (amely körülbelül az IC_{50} hatásának felel meg), három ismétlésben; 2) az oldószer és a nem specifikus kötődés vizsgálatát, három-három ismétlésben.

Standard minőség-ellenőrzési eljárások

16. El kell végezni az egyes vizsgálatokhoz meghatározott standard minőség-ellenőrzési eljárásokat annak érdekében, hogy garantálni lehessen a receptorok aktivitását, a vegyi anyag megfelelő koncentrációértékeit, a tűréshatárok többszöri ismétlésen keresztüli stabilitását, valamint a várt ösztrogénreceptor-kötési válaszreakciók biztosításának hosszú távú képességét.

A laboratórium jártasságának igazolása

17. Mielőtt ismeretlen vegyi anyagokat tesztelnének az e vizsgálati módszerhez kapcsolódó bármely vizsgálattal, a laboratóriumoknak igazolniuk kell az adott vizsgálat alkalmazásában szerzett jártasságukat azáltal, hogy végrehajtanak az ösztrogénreceptor preparátum specifikusságának és aktivitásának ellenőrzésére szolgáló telítési vizsgálatokat, valamint a referenciaösztrogént és a kontrollokat (gyengén kötődő és nem kötődő anyagokat) is tesztelő kompetitív kötési vizsgálatokat. A laboratóriumoknak adatbázist kell létrehozniuk a referenciaösztrogénnel és a kontrollanyagokkal különböző napokon végzett 3–5 független kísérletből származó eredményekből. Ezek a kísérletek teremtik meg az alapját annak, hogy a laboratóriumok a referenciaösztrogénre és a kontrollanyagokra vonatkozólag dokumentált adatokkal rendelkezzenek, amelyeket a jövőbeni vizsgálatmenetek során felhasználnak a vizsgálat elfogadhatóságának értékeléséhez.

18. A vizsgálati rendszer reakcióképességét a 2. táblázatban felsorolt jártassági tesztanyagok vizsgálata révén is meg kell erősíteni. A jártassági tesztanyagok jegyzéke az ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatok teljesítményszabványaiban (3) megadott referenciaanyagok egy csoportjából tevődik össze. Ezek az anyagok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők, olyan kémiai osztályokat képviselnek, amelyeknél gyakori az ösztrogénreceptor-kötési aktivitás, a várt ösztrogénreceptor-kötési potenciál megfelelő (erőstől a gyengéig terjedő) tartományát képviselik, és vannak közöttük nem kötődő (azaz negatív) anyagok. Az egyes jártassági tesztanyagok vizsgált koncentrációértékeinek le kell fedniük a 2. táblázatban szereplő tartományt. Minden anyag esetében legalább három kísérletet kell végezni, és az eredményeknek összhangban kell lenniük a vegyi anyag várt aktivitásával. Az összes kísérletet független módon (vagyis a receptor, a vizsgálati vegyi anyagok és a reagens frissen készített oldataival) kell végrehajtani, minden egyes koncentrációértéket három ismétlésben vizsgálva. A jártasság az egyes jártassági tesztanyagok megfelelő (pozitív/negatív) osztályba sorolásával igazolható. A vizsgálatok elsajátítása során a jártassági vizsgálatot minden szakembernek el kell végeznie.

2. táblázat

A humán ösztrogénreceptor kompetitív kötési vizsgálatokban használt kontrollanyagok és jártassági tesztanyagok jegyzéke (1)

Szám	Az anyag neve	CAS-szám (2)	Várt válasz (3) (4)	Vizsgálati koncentrációtartomány (M)	MeSH kémiai osztály (5)	Termékosztály (6)
Kontrollanyagok (referenciaösztrogén, gyengén kötődő és nem kötődő anyag)						
1	17–β-ösztradiol	50-28-2	Kötődő	1×10^{-11}–1×10^{-6}	Szteroid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
2	Noretinodrel (vagy) Noretindron	68-23-5 (vagy) 68-22-4	Kötődő	3×10^{-9}–30×10^{-6}	Szteroid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
3	Oktil-trietoxi-szilán	2943-75-1	Nem kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Szilán	Felületmódosító
Jártassági tesztanyagok (6)						
4	Dietilstilbösztrol	56-53-1	Kötődő	1×10^{-11}–1×10^{-6}	Szénhidrogén (ciklikus), fenol	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
5	17α-etinilösztradiol	57-63-6	Kötődő	1×10^{-11}–1×10^{-6}	Szteroid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
6	mezo-Hexestrol	84-16-2	Kötődő	1×10^{-11}–1×10^{-6}	Szénhidrogén (ciklikus), fenol	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
7	Tamoxifén	10540-29-1	Kötődő	1×10^{-11}–1×10^{-6}	Szénhidrogének (ciklikus)	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
8	Geniszten	446-72-0	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Heterociklikus vegyület, flavonid	Természetes termék

Szám	Az anyag neve	CAS-szám (2)	Várt válasz (3) (4)	Vizsgálati koncentrációtartomány (M)	MeSH kémiai osztály (5)	Termékosztály (6)
9	Biszfenol-A	80-05-7	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Fenol	Köztes vegyi anyag
10	Zearalenon	17924-92-4	Kötődő	1×10^{-11}–1×10^{-3}	Heterociklikus vegyület, lakton	Természetes termék
11	Butil-parabén	94-26-8	Kötődő	1×10^{-11}–1×10^{-3}	Karbonsav, fenol	Tartósítószer
12	Atrazin	1912-24-9	Nem kötődő	1×10^{-11}–1×10^{-6}	Heterociklikus vegyület	Gyomirtó szer
13	Di-n-butil-ftalát (DBP) (7)	84-74-2	Nem kötődő (8)	1×10^{-10}–1×10^{-4}	Szénhidrogén (ciklikus), észter	Lágyítószer, köztes vegyi anyag
14	Kortikoszteron	50-22-6	Nem kötődő	1×10^{-11}–1×10^{-4}	Szteroid	Természetes termék

(1) Amennyiben egy adott jártassági tesztanyag kereskedelmi forgalmazása megszűnik, akkor használható helyette egy ösztrogénreceptor-kötés tekintetében azonos besorolású, hasonló potenciállal rendelkező, azonos kémiai osztályba tartozó anyag.
(2) Rövidítések: CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám.
(3) Az anyagok ERα-hoz kötődő és nem kötődő kategóriába sorolására a CERI és a Freyberger–Wilson humán ösztrogénreceptor-kötési vizsgálat validálási tanulmányának keretében került sor (2).
(4) Az ösztrogénreceptor-kötési aktivitás besorolásának alapját az ösztrogénreceptor-kötési és transzaktiválási vizsgálatok felülvizsgálatára vonatkozó ICCVAM-háttérdokumentumok (9), valamint a hivatkozásokban szereplő, közzétett és átdolgozott tanulmányokból nyert empirikus adatok és egyéb információk képezik (10) (11) (12) (13) (14) (15).
(5) Az anyagok egy vagy több kémiai osztályba sorolása az Egyesült Államok nemzetközileg elismert szabványosított osztályozási rendszere, a Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) nemzeti könyvtára alapján történt (elérhető a következő címen: http://www.nlm.nih.gov/mesh).
(6) Az anyagok egy vagy több termékosztályba sorolása az Egyesült Államok Medicine's Hazardous Substances Database nemzeti könyvtára alapján történt (elérhető a következő címen: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)
(7) A legfeljebb 10^{-4} M koncentrációig vizsgált DBP használható alternatív nem kötődő kontrollanyagként.
(8) Az anyag oldhatósági határértéke 10^{-4} M. A di-n-butil-ftalát (DBP) nem kötődő anyagként való alkalmazása és besorolása 10^{-4} M koncentrációig történő vizsgálatán alapul, mivel az elővalidálási tanulmányok során néhány laboratóriumban 10^{-3} M koncentrációban oldhatatlannak bizonyult (pl. zavarosságot mutatott).

A vizsgálati vegyi anyagok oldhatósági vizsgálata és koncentrációtartományuk behatárolása

19. Előzetes vizsgálatot kell végezni az egyes vizsgálati vegyi anyagok oldhatósági határértékének meghatározására, valamint a vizsgálat során alkalmazandó megfelelő koncentrációtartomány megállapítására. A vizsgálati vegyi anyagok oldhatósági határértékét először oldószerben kell meghatározni, majd a vizsgálati körülmények mellett meg kell erősíteni. A vizsgálat során tesztelt végső koncentráció nem haladhatja meg az 1 mM-t. A koncentráció-tartomány-behatároló vizsgálatnak magában kell foglalnia egy oldószeres kontrollt és a legmagasabb elfogadható koncentrációtól (pl. 1 mM, illetve az oldhatósági határértéktől függően ennél alacsonyabb koncentrációtól) induló, nyolc koncentrációból álló logaritmikus hígítási sorozatot, az esetlegesen tapasztalt zavarosságot vagy kicsapódást fel kell jegyezni. A második és a harmadik kísérlet koncentrációértékeit úgy kell megválasztani, hogy jobban illeszkedjenek a koncentráció-válasz görbéhez.

A vizsgálatmenet elfogadhatósági kritériumai

20. A vizsgálatmenetek elfogadására vagy elvetésére a minden kísérletben vizsgált referenciaösztrogén és kontrollanyagok eredményeinek értékelése alapján kerül sor. Először is, az 1. lemez tekintetében minden kísérlet referenciaként szolgáló kontrollanyagainak görbeillesztési paramétereiből (pl. az IC_{50} és a Hill-meredekség) létrehozott teljes koncentrációgörbéknek meg kell felelniük a teljesítménymutatóknak, amit a CERI és a Freyberger–Wilson vizsgálat protokolljában (2. és 3. függelék) feltüntetett eredmények, valamint a vizsgálatot végző laboratórium történeti kontrolladatai alapján értékelnek. Minden kísérletben helyesen kell besorolni valamennyi kontrollanyagot (a referenciaösztrogént, valamint a gyengén kötődő és a nem kötődő anyagot). Másodszor pedig fel kell mérni, hogy az összes többi lemezen végzett kontrollok eredményei egybevágóak-e az 1. lemez eredményeivel. A vizsgálati vegyi anyag megfelelő koncentrációtartományát kell vizsgálni ahhoz, hogy egyértelműen meg lehessen határozni a kompetitív kötési görbe telítési csúcsát. A vizsgálati vegyi anyag egyes koncentrációinak ismétlései közötti, illetve a három független vizsgálatmenet közötti eltéréseknek észszerűnek és tudományosan védhetőnek kell lenniük. A vizsgálat következetes végrehajtásának képességét bizonyítani kell azáltal, hogy a laboratóriumok adatbázist hoznak létre és tartanak fent a referenciaösztrogén és a kontrollanyagok adataiból. A laboratóriumon belüli reprodukálhatóság mérésére használhatók a referenciaösztrogén és a kontrollként szolgáló gyengén kötődő anyag több kísérletből származó görbeillesztési paraméterei átlagának standard deviációi (SD) vagy variációs koefficiensei (CV). Az egyes vizsgálatmenetek lemezein vizsgált kontrollanyagok és minden vizsgálati vegyi anyag eredményeinek értelmezése során szakmai megítélés alapján kell dönteni.

Ezenkívül érvényesülniük kell az elfogadhatósági kritériumokra vonatkozó alábbi elveknek is:

— elegendő mennyiségű adattal kell rendelkezni ahhoz, hogy számszerűen értékelni lehessen az ösztrogénreceptor-kötést;

— a vizsgált koncentrációknak a vizsgálati vegyi anyag oldhatósági tartományán belül kell maradniuk.

Az adatok elemzése

21. A telítési és a kompetitív kötési adatok meghatározott adatelemzési eljárásának meg kell felelnie a receptor és a ligandum közötti kölcsönhatások jellemzésére vonatkozó főbb elveknek. A telítési kötési adatokat jellemzően egy nem-lineáris regressziós modellel elemzik, amellyel meghatározható mind a teljes, mind a nem specifikus kötődés. A B_{max} és a K_d értékének meghatározásakor a ligandum csökkenése miatt szükség lehet korrekcióra (pl. Swillens, 1995 (19)). A kompetitív kötési vizsgálatok adatait általában transzformálják (pl. a specifikus kötődés arányát és a vizsgálati vegyi anyag koncentrációit (log M)). Az egyes vizsgálati vegyi anyagok log (IC_{50}) értékének megbecsüléséhez egy megfelelő nem-lineáris görbeillesztő szoftvert kell használni, amely illeszteni tud a négyparaméteres Hill-egyenletre. A kezdeti elemzést követően meg kell határozni a görbeillesztési paramétereket, és vizuálisan ellenőrizni kell, hogy a kötési adatok mennyire illeszkednek a létrehozott kompetitív kötési görbére. Bizonyos esetekben a legjobban illeszkedő görbe meghatározásához további elemzésre lehet szükség (pl. a görbe tetejének és/vagy aljának szűkítésére, a 10 %-os szabály alkalmazására, lásd a 4. függeléket és a 2. referenciát (a III.A.2. részben)).

22. Az elfogadhatósági kritériumok (20. pont) teljesítése jelzi a vizsgálati rendszer megfelelő működését, de nem garantálja egy adott vizsgálat adatainak pontosságát. Az adatok pontosságát az jelzi a legjobban, ha az első vizsgálat helyes eredményei megismételhetők.

Az adatok értelmezésének általános kritériumai

23. Jelenleg nincs általánosan elfogadott módszer az ösztrogénreceptor-kötési adatok értelmezésére. Ugyanakkor a humán ösztrogénreceptor által közvetített aktivitás kvalitatív (pl. kötődő/nem kötődő) és/vagy kvantitatív (pl. log IC_{50}, relatív kötődési affinitás (RBA) stb.) értékelésének empirikus adatokon és megalapozott tudományos véleményen kell nyugodnia.

Vizsgálati jelentés

24. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálat:

— az alkalmazott vizsgálat.

Kontroll/referencia/vizsgálati vegyi anyag

— eredet, gyártási szám, felhasználási határidő, ha rendelkezésre áll;

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, ha ismert;

— a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben, ha ismert;

— adott esetben a pH-érték, az ozmolalitás és a kicsapódás mérése abban a tápfolyadékban, amelyhez a vizsgálati vegyi anyagot hozzáadták.

Egy összetevőből álló anyag:

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján;

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai által jellemezve.

Oldószer/vivőanyag:

— jellemzés (az anyag természete, forgalmazója és gyártási száma);

— az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása;

— a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert.

Receptorok:

— a receptorok eredete (forgalmazó, katalógusszám, receptor faj, a forgalmazó által megadott aktív receptor koncentráció, a forgalmazó által kiadott tanúsítvány);

— a receptorok jellemzése (többek között a telítési kötési vizsgálat eredményei): K_d, B_{max};

— a receptorok tárolása;

— radioaktívan jelölt ligandum:

— forgalmazó, katalógusszám, tétel, specifikus aktivitás.

Vizsgálati körülmények:

— a vizsgálati körülmények között fennálló oldhatósági korlátok;

— a kötési vizsgálat pufferének összetétele;

— a receptor koncentrációja;

— a nyomjelző (vagyis a radioaktívan jelölt ligandum) koncentrációja;

— a vizsgálati vegyi anyag koncentrációi;

— a vivőanyag aránya a végső vizsgálatban;

— inkubációs hőmérséklet és idő;

— a kötött és a szabad ligandumok elkülönítésére használt módszer;

— pozitív és negatív kontrollanyagok/referenciaanyagok;

— kritériumok, amelyek eldöntik, hogy a vizsgálatok pozitívnak, negatívnak vagy többféleképpen magyarázhatónak tekintendők-e.

Elfogadhatóság ellenőrzése:

— a párhuzamos pozitív kontrollok/referenciaanyagok tényleges IC_{50} és Hill-meredekségi értéke.

Eredmények:

— nyers adatok és a kötött/szabad ligandumokra vonatkozó adatok;

— adott esetben denaturálást ellenőrző vizsgálat;

— ha létezik, a legkisebb hatásos koncentráció (LEC);

— adott esetben az RBA és/vagy az IC_{50} értéke;

— amennyiben lehetséges, a koncentráció-válasz összefüggés;

— statisztikai elemzések, ha végeztek ilyeneket, hiba- és megbízhatósági számításokkal (pl. SEM, SD, CV vagy 95 % CI), és annak leírása, hogy milyen módon kapták ezeket az értékeket.

Az eredmények értékelése:

— a 10 %-os szabály alkalmazása.

Következtetések

SZAKIRODALOM

(1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(2) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(3) OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(4) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(5) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: p.20-6.

(6) Welboren W.J., *et al*. (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr*. Relat. Cancer., 16(4): p. 1073-89.

(7) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. *Pathol*. Lab. Med., 135(1): p. 63-6.

(8) Diamanti-Kandarakis *et al*. (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, Endo Rev 30(4):293-342.

(9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.

(10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(12) Akahori Y. *et al*. (2008). Relationship Between the Results of *In vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol*. *In vitro*, 22(1): 225-231.

(13) OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. p. 1-188.

(15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, Toxicol. Letters, 146: 111-120.

(16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol*. Letters, 180: 213-221.

(17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol.*, 196: 58-67.

(18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. Chemosphere, 34: 835-848.

(19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, Mol Pharmacol 47(6):1197-1203.

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS RÖVIDÍTÉSEK

10 %-os szabály: annak lehetősége, hogy az elemzésből kizárják azokat az adatpontokat, amelyek esetében a [^{3}H]17β-ösztradiol specifikus kötődési arányát mérő ismétlések átlaga legalább 10 %-kal meghaladja a valamely alacsonyabb koncentrációnál megfigyelt átlagértéket (lásd a 4. függeléket).

Elfogadhatósági kritériumok: a kísérleti kontrollok és referenciaszabványok megfelelőségére vonatkozó minimális előírások. Ahhoz, hogy egy kísérlet érvényesnek minősüljön, meg kell felelni valamennyi elfogadhatósági kritériumnak.

Pontosság (egyezőség): a vizsgálati eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés eltérése. A vizsgálat megfelelőségének mutatója, és relevanciájának egyik szempontja. E kifejezést gyakran használják az „egyezőség" szinonimájaként, amely arra utal, hogy egy adott vizsgálat milyen arányban szolgáltat helyes eredményeket (1).

CF: Az OECD endokrin rendszert károsító anyagok vizsgálatára és értékelésére szolgáló fogalmi kerete.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

CV: variációs koefficiens.

E2: 17β-ösztradiol

ED: az endokrin rendszer károsítása.

hERα: humán ösztrogénreceptor alfa.

ER: ösztrogénreceptor.

Ösztrogénhatású aktivitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy a 17β-ösztradiolhoz hasonlóan ösztrogénreceptorokhoz kötődjön. Ezzel a vizsgálati módszerrel a humán ösztrogénreceptor alfához való kötődés észlelhető.

IC_{50}: egy gátló vizsgálati vegyi anyag maximális tényleges hatásának felét kiváltó koncentráció.

ICCVAM: alternatív módszerek validálásával foglalkozó ügynökségközi koordinációs bizottság.

Laboratóriumok közötti reprodukálhatóság: annak a mutatója, hogy különböző minősített laboratóriumok milyen mértékben képesek ugyanazon protokoll alkalmazásával és ugyanazon anyagok vizsgálatával hasonló kvalitatív és kvantitatív eredményeket elérni. A laboratóriumok közötti reprodukálhatóság az elővalidálási és validálási folyamat során kerül meghatározásra, és annak mértékét jelzi, hogy az adott vizsgálat mennyire sikeresen vihető át laboratóriumok között; más néven laboratóriumok közötti megismételhetőség (1).

Laboratóriumon belüli reprodukálhatóság: annak meghatározása, hogy egy adott laboratóriumon belül dolgozó szakemberek milyen mértékben képesek egy meghatározott protokoll alapján különböző időpontokban sikeresen megismételni az eredményeket. Más néven „laboratóriumon belüli megismételhetőség" (1).

LEC: a legkisebb hatásos koncentráció a vizsgálati vegyi anyag azon legalacsonyabb koncentrációja, amely választ vált ki (vagyis a vizsgálati vegyi anyag legkisebb koncentrációja, amelynél az indukciós tényező statisztikailag eltér a párhuzamos vivőanyagos kontrolltól).

Me-too vizsgálat: olyan vizsgálatok köznapi elnevezése, amelyek strukturálisan és funkcionálisan hasonlóak egy validált és elfogadott, referenciaként szolgáló vizsgálati módszerhez. A hasonló vizsgálati módszer szinonimája.

PBTG: teljesítményalapú vizsgálati iránymutatás.

Teljesítményszabványok: validált vizsgálati módszeren alapuló szabványok, amelyek a javasolt, végrehajtás és funkcionalitás szempontjából hasonló vizsgálat összehasonlíthatósági értékelésének alapjául szolgálnak. Ide tartoznak: (1) a vizsgálat alapvető összetevői; (2) a referencia-vegyianyagok minimális jegyzéke, amely a validált vizsgálati módszer elfogadható teljesítményének igazolására használt vegyi anyagokból került összeállításra; és (3) a validált vizsgálati módszer eredményei alapján meghatározott, hasonló megbízhatósági és pontossági szintek, amelyeket a javasolt vizsgálatnak teljesítenie kell a minimális jegyzék referencia-vegyianyagainak felhasználásával történő értékelése során (1).

Jártassági tesztanyagok: a teljesítményszabványokban megadott referenciaanyagokon belüli alcsoport, amelyet a laboratóriumok felhasználhatnak egy adott szabványosított vizsgálatban való szakmai jártasságuk igazolására. Ezeket az anyagokat általában az alapján választják ki, hogy összességükben lefedik a válaszreakciók lehetséges tartományát, kereskedelmi forgalomban kaphatók és rendelkezésre állnak rájuk vonatkozó minőségi referenciaadatok.

Jártasság: annak igazolása, hogy a laboratórium képes megfelelően lefolytatni egy adott vizsgálatot, mielőtt ismeretlen anyagokat tesztelne.

Referenciaösztrogén: 17ß-ösztradiol (E2, CAS-száma: 50-28-2).

Vizsgálati referenciamódszerek: A 493. teljesítményalapú vizsgálati iránymutatás alapját képező vizsgálatok.

RBA: relatív kötési affinitás. Valamely anyag relatív kötési affinitását az anyag log (IC_{50}) értékének a 17β-ösztradiol log (IC_{50}) értékéhez viszonyított arányaként határozzák meg.

Relevancia: valamely vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálat pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (1).

Megbízhatóság: a vizsgálat laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. A laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság kiszámításával állapítják meg.

SD: standard deviáció.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Validált vizsgálati módszer: olyan vizsgálat, amelynek az adott céllal kapcsolatos relevanciája (pontosságát is ideértve) és megbízhatósága validálási vizsgálatok alapján megállapítást nyert. Fontos megjegyezni, hogy a validált vizsgálati módszer a javasolt felhasználási célra nem feltétlenül kínál megfelelő pontosságú és megbízhatóságú elfogadható eljárást (1).

Validálás: az az eljárás, amelynek révén megállapítják egy bizonyos megközelítés, módszer, vizsgálat, eljárás vagy értékelés adott célra való megbízhatóságát és relevanciáját (1).

2. függelék

A FREYBERGER-WILSON-FÉLE TELJES HOSSZÚSÁGÚ REKOMBINÁNS ÖSZTROGÉNRECEPTOR A (ERA) HASZNÁLATÁN ALAPULÓ IN VITRO TELÍTÉSI ÉS KOMPETITÍV KÖTÉSI VIZSGÁLATOK

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

1. Ez az *in vitro* ösztrogénreceptor (ERα) telítési és kompetitív kötési vizsgálat teljes hosszúságú humán ERα (hrERα) receptort alkalmaz, amelyet bakulovírussal fertőzött rovarsejtekben termeltetnek és izolálnak. A Freyberger és Wilson által kidolgozott protokollt több laboratórium részvételével zajló, nemzetközi validálási tanulmánynak (2) vetették alá, amely bizonyította, hogy a vizsgálat tervezett felhasználása tekintetében releváns és megbízható.

2. A vizsgálat egy szűrési eljárás, amelynek révén azonosíthatók a teljes hosszúságú humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődni képes anyagok. A vizsgálatot annak meghatározására alkalmazzák, hogy egy adott vizsgálati vegyi anyag képes-e vetélkedni a 17β-ösztradiollal a humán ösztrogénreceptor α-hoz való kötődésért. A vizsgálat kvantitatív eredményei magukban foglalhatják az IC_{50} értéket (vagyis azt a koncentrációt, amelyre a vizsgálati vegyi anyagnak szüksége van ahhoz, hogy a [^{3}H]-17β-ösztradiol felét leszorítsa a humán ösztrogénreceptor α-ról), valamint a vizsgálati vegyi anyag humán ösztrogénreceptor α-hoz való relatív – a 17β-ösztradiolhoz viszonyított – kötési affinitását. A vegyi anyagok szűrése céljából a vizsgálat elfogadható kvalitatív eredményei kiterjedhetnek a vizsgálati vegyi anyagok humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődő, nem kötődő, illetve nem egyértelmű kategóriába sorolására, ezek meghatározására a kötési görbékre vonatkozó kritériumok alapján kerül sor.

3. A vizsgálat radioaktív ligandumot használ, ezért a laboratóriumnak rendelkeznie kell radioaktív anyagok használatára vonatkozó engedéllyel. A radioaktív izotópokkal és veszélyes vegyi anyagokkal végzett valamennyi folyamat során be kell tartani a nemzeti jogszabályok által előírt rendelkezéseket és eljárásokat.

4. E vizsgálat szabályozási célra való alkalmazása előtt el kell olvasni az „**ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS**” és „**A humán ÖSZTROGÉNRECEPTOR-KÖTÉSI VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI**” részt. Az ebben a vizsgálati iránymutatásban használt fogalmak és rövidítések meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLATI ELVEK (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

5. A humán ösztrogénreceptor α-kötési vizsgálat azt méri, hogy milyen mértékben képes egy radioaktívan jelölt ligandum (a [^{3}H]17β-ösztradiol) az ösztrogénreceptorhoz kötődni egy adott vizsgálati vegyi anyag (a kompetítor) növekvő koncentrációjának jelenlétében. Az ösztrogénreceptorok iránt nagy affinitást mutató vizsgálati vegyi anyagok alacsonyabb koncentrációban versenyeznek a radioaktívan jelölt ligandummal azokhoz a vegyi anyagokhoz képest, amelyek kisebb affinitást mutatnak a receptor iránt.

6. A vizsgálat két fő összetevőből áll: egy telítési kötési kísérletből, amelynek során meghatározzák a receptor és a ligandum közötti kölcsönhatás paramétereit, majd egy ezután végzett kompetitív kötési kísérletből, amelynek révén jellemzik a vizsgálati vegyi anyag és a radioaktívan jelölt ligandum ösztrogénreceptor-kötőhelyekért folytatott vetélkedését.

7. A telítési kötési kísérlet célja, hogy a kompetitív kötési kísérlet előkészítéseként meghatározzák a receptorok egy adott tételének kötési affinitását és a receptorok számát. A telítési kötési kísérlet egyensúlyi állapotban méri egy fix koncentrációjú ösztrogénreceptor természetes ligandumához való kötési affinitását (amelynek mutatója a disszociációs állandó, a K_d) és a receptor aktív kötőhelyeinek koncentrációját (B_{max}).

8. A kompetitív kötési kísérletben azt mérik, hogy egy adott anyag milyen mértékű affinitással rendelkezik arra, hogy versenyezzen a [^{3}H]17β-ösztradiollal az ösztrogénreceptorral formált kötésért. Az affinitást a vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációjával számszerűsítik, amely egyensúlyi állapotban meggátolja a [^{3}H]17β-ösztradiol specifikus kötődésének 50 %-át (ez az úgynevezett „50 %-os gátlást kiváltó koncentráció” vagy IC_{50}). Az affinitás mérhető emellett a relatív kötési affinitással is (RBA, az ösztradiol ugyanazon vizsgálatmenetben, de külön mért IC_{50} értékéhez viszonyított affinitás). A kompetitív kötési kísérlet azt méri, hogy milyen mértékben kötődik egy fix koncentrációban alkalmazott [^{3}H]17β-ösztradiol a vizsgálati vegyi anyag széles skálát (nyolc nagyságrendet) lefedő koncentrációja jelenlétében. Ezt követően – ahol lehetséges – az adatokat a Hill-egyenlet olyan formájára illesztik (Hill, 1910), amely meghatározza, hogy milyen mértékben szorítják le az egy kötőhelyet elfoglaló kompetitív kötődő anyagok a radioaktív ligandumot. A radioaktívan jelölt ösztradiol egyensúlyi állapotban történő leszorításának mértéke alapján jellemzik a vizsgálati vegyi anyagot kötődő, nem kötődő, vagy kétértelmű választ adó anyagként.

ELJÁRÁS

A humán ösztrogénreceptor α fehérje elfogadható teljesítményének igazolása

9. A telítési és a kompetitív kötési vizsgálatok rutinszerű alkalmazása előtt a humán ösztrogénreceptor α minden új tételéről bizonyítani kell, hogy megfelelő teljesítményt nyújt abban a laboratóriumban, ahol használni fogják. A megfelelő teljesítmény egy két lépésből álló eljárással bizonyítható. Ez a két lépés a következő:

— A humán ösztrogénreceptor α-specifikusságának és -telítettségének igazolása érdekében végezzünk el egy telítési [^{3}H]-17β-ösztradiol kötési vizsgálatot. Az adatok nem-lineáris regressziós analízise (pl. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995), majd azt követő Scatchard-plot ábrázolása az egyes hrERα-tételekre vonatkozólag dokumentálja a [^{3}H]-17β-ösztradiol humán ösztrogénreceptor α-hoz való kötési affinitását (K_d) és a receptorok számát (B_{max}).

— Végezzünk el egy kompetitív kötési vizsgálatot a kontrollanyagok (a referenciaösztrogén (17β-ösztradiol)), egy gyengén kötődő anyag (pl. noretinodrel vagy noretindron) és egy nem kötődő anyag (oktil-trietoxi-szilán, OTES) használatával. Valamennyi laboratóriumnak létre kell hoznia egy adatbázist annak dokumentálására, hogy a referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag IC_{50} értékét és más releváns mutatóit következetesen határozta meg a különböző kísérletek és az eltérő hrERα-tételek vizsgálata során. A kontrollanyagok kompetitív kötési görbéjét alkotó paramétereknek a 95 %-os konfidenciaintervallumon belül kell lenniük (lásd az 1. táblázatot), amelynek értékeit a vizsgálat validálási tanulmányában részt vevő laboratóriumok adatai alapján határozták meg (2).

1. táblázat

A Freyberger–Wilson humán ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatban használt referenciaösztrogén és gyengén kötődő anyag teljesítményére vonatkozó kritériumok

Anyag	Paraméter	Átlag [a]	Standard deviáció (n)	95 %-os konfidenciaintervallumok [b]	
				Alsó határ	Felső határ
17β-ösztradiol	Görbe teteje (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Görbe alja (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Hill-meredekség	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	$LogIC_{50}$ (M)	-8,92 [c]	0,18 (67)	-8,97	-8,88
Noretinodrel	Görbe teteje (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Görbe alja (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hill-meredekség	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	Log IC_{50} (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Noretindron [c]	Görbe teteje (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Görbe alja (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hill-meredekség	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	$LogIC_{50}$ (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

[a] Az átlag (n) ± standard deviáció (SD) értékét becsült görbeillesztési paraméterek (négyparaméteres Hill-egyenlet) segítségével számolták ki a validálási tanulmány során négy laboratórium által kontroll céljából végzett vizsgálatmenetek során (lásd a 2. referencia N. függelékét).

[b] A 95 %-os konfidenciaintervallum útmutatóként szolgál az elfogadhatósági kritériumokhoz.

[c] A validálási tanulmány során a 4. alfeladatban a noretindron vizsgálata opcionális volt (lásd a 2. referenciát és a 4. alfeladatot). Az átlag ± SD (n) értékét tehát becsült görbeillesztési paraméterek (négyparaméteres Hill-egyenlet) segítségével számolták ki két laboratórium által kontroll céljából végzett vizsgálatmenetek során.
Az IC_{50} tartománya függ a receptor preparátum K_d értékétől és a radioaktívan jelölt ligandum egyes laboratóriumokban alkalmazott koncentrációjától. Megengedhető, hogy a vizsgálat lefolytatásának körülményei alapján az IC_{50} tartományát megfelelő mértékben módosítsák.

A laboratórium jártasságának igazolása

10. Lásd a vizsgálati módszer „**A humán ÖSZTROGÉNRECEPTOR-KÖTÉSI VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI**" részének 17. és 18. pontját, valamint 2. táblázatát. Minden (telítési és kompetitív kötési) vizsgálatnak három független (vagyis a receptor, a vegyi anyagok és a reagensek frissen készített oldataival végezett), különböző napokon lefolytatott vizsgálatmenetből kell állnia, az egyes vizsgálatmeneteknek pedig három ismétlést kell tartalmazniuk.

A receptor (hrERα) koncentrációjának meghatározása

11. Az aktív receptor koncentrációja tételenként és tárolási feltételek szerint kissé változó. Ebből adódóan a forgalmazótól való átvételkor meg kell határozni az aktív receptor koncentrációját. Így megállapítható az aktív receptor vizsgálatmenet során alkalmazandó megfelelő koncentrációja.

12. A kompetitív kötési vizsgálatnak megfelelő körülmények között (vagyis 1 nM [^{3}H]-ösztradiollal) a receptort 0,25, 0,5, 0,75 és 1 nM névleges koncentrációban inkubálni kell 1 μM nem jelölt ösztradiol jelenlétében (nem specifikus kötődés) és annak hiányában (teljes kötődés). A specifikus kötődést, amely a teljes és a nem specifikus kötődés különbségeként határozható meg, ábrázolni kell a receptor névleges koncentrációja függvényében. A receptort abban a névleges koncentrációban kell használni a telítési és a kompetitív kötési kísérletek során, amelynél a specifikus kötődési értékei megegyeznek a hozzáadott radioaktívan jelölt ösztradiol kötési értékeinek 20 %-ával. A humán ösztrogénreceptor 0,5 nM-es végső koncentrációja többnyire eleget tesz ennek a feltételnek.

13. Amennyiben a 20 %-os feltétel több próbálkozás után sem teljesül, ellenőrizni kell, hogy nincsenek-e potenciális hibák a kísérlet elrendezésében. A 20 %-os feltétel nem teljesülése jelezheti azt is, hogy a rekombináns tételben nagyon csekély az aktív receptorok száma, ilyen esetben fontolóra kell venni másik receptortétel alkalmazását.

Telítési vizsgálat

14. A [^{3}H]17β-ösztradiolt kell kiértékelni nyolc növekvő koncentrációban, három ismétlésben, az alábbi három kitétellel (lásd a 2. táblázatot):

— Nem jelölt 17β-ösztradiol nélkül és ösztrogénreceptorral. Ez alapján határozható meg a teljes kötődés a csak [^{3}H]17β-ösztradiolt tartalmazó lyukakban mért radioaktivitás alapján.

— A jelölt 17β-ösztradiolhoz képest 1000-szeres koncentrációjú nem jelölt 17β-ösztradiol jelenlétében és ösztrogénreceptorral. Ez az állapot arra szolgál, hogy az aktív kötőhelyek telítődjenek nem jelölt 17β-ösztradiollal, így a lyukakban mért radioaktivitás alapján meghatározható a nem specifikus kötődés. A fennmaradó, receptorhoz kötődő radioaktív ösztrogének feltételezhetően nem specifikus helyre kötődőnek, mivel a nem jelölt ösztrogének olyan magas koncentrációban vannak jelen, hogy elfoglalják a receptor valamennyi szabad specifikus kötőhelyét.

— Nem jelölt 17β-ösztradiol és ösztrogénreceptor nélkül (így meghatározható a teljes radioaktivitás).

A [^{3}H]-17β-ösztradiol és a nem jelölt 17β-ösztradiol oldatainak elkészítése

15. A [^{3}H]-17β-ösztradiol oldatainak elkészítéséhez a [^{3}H]-17β-ösztradiol 12 nM koncentrációjú törzsoldatához vizsgálati pufferrel beállítjuk a kezdeti, 0,12 nM-től 12 nM-ig terjedő koncentrációtartományt. Ezen oldatokból 40 μl-t adagolunk a 96 lyukú mikrotiterlemez megfelelő vizsgálati lyukaiba (160 μl végtérfogatban), így megkapjuk a vizsgálat végső, 0,03 és 3,0 nM közötti koncentrációértékeit. A vizsgálati puffer, a [^{3}H]-17β-ösztradiol törzsoldatának és oldatainak elkészítését, valamint a koncentrációértékek meghatározását részletesen ismerteti a Freyberger–Wilson protokoll (2).

16. A 17β-ösztradiol etanolos oldatait vizsgálati puffer hozzáadásával kell hígítani, elkészítve a nyolc növekvő elemből álló, 0,06 μM-től 6 μM-ig terjedő kezdeti koncentrációsorozatot. Ezekből az oldatokból 80 μl-t adagolunk a 96 lyukú mikrotiterlemez megfelelő vizsgálati lyukaiba (160 μl végtérfogatban), így megkapjuk a vizsgálat végső, 0,03 μM és 3,0 μM közötti koncentrációértékeit. A nem specifikus kötődést tesztelő lyukakban a nem jelölt 17β-ösztradiol 1000-szeres feleslegben kell legyen a jelölt [^{3}H]-17β-ösztradiol végső koncentrációjához képest. A nem jelölt 17β-ösztradiol oldatainak elkészítését részletesen ismerteti a Freyberger–Wilson protokoll (2).

17. A receptornak azt a névleges koncentrációját kell alkalmazni, amelyik 20 %-os (± 5 %) specifikus kötődést vált ki (lásd a 12–13. pontot). A humán ösztrogénreceptor α oldatot közvetlenül használat előtt kell elkészíteni.

18. A 96 lyukú mikrotiterlemezeket a 2. táblázatban foglaltak szerint készítik el, az egyes koncentrációértékeket 3 ismétlésben vizsgálva. A [^{3}H]-17β-ösztradiol, a nem jelölt 17β-ösztradiol, a puffer és a receptor lemezenkénti koncentrációértékeit és térfogatát a 2.2. függelék tartalmazza.

2. táblázat

Mikrotiterlemez elrendezése a telítési kötési vizsgálathoz

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3} H] E2 + ER			0,06 nM [^{3} H] E2 + ER			0,08 nM [^{3} H] E2 + ER			0,10 nM [^{3}H] E2 + ER			Teljes kötődés (oldószer)
B	0,30 nM [^{3} H] E2 + ER			0,60 nM [^{3} H] E2 + ER			1,0 nM [^{3} H] E2 + ER			3,0 nM [^{3} H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3} H] E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [^{3} H] E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [^{3} H] E2 + ER + 0,08 μM E2			0,10 nM [^{3}H] E2 $^{+ ER+}$ 0,10 μM E2			Nem specifikus kötődés
E	0,30 nM [^{3} H] E2 + ER + 0,30 μM E2			0,60 nM [^{3} H] E2 + ER + 0,60 μM E2			1,0 nM [^{3}H] E2 $_{+ ER}^{+ 1,0}$ μM E2			3,0 nM [^{3} H] E2 + ER + 3,0 μM E2			
F													
G													
H													

[3H] E2:: [3H]-17β-ösztradiol
ER:: ösztrogénreceptor
E2:: nem jelölt 17β-ösztradiol

19. A vizsgálati mikrotiterlemezeket 16–20 órán keresztül 2–8 °C-os hőmérsékleten inkubálni kell, a lemezeket az inkubáció ideje alatt rázógépre kell helyezni.

A humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődött [^{3}H]-17β-ösztradiol mérése

20. A humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődött [^{3}H]-17β-ösztradiolokat elkülönítjük a szabad [^{3}H]-17β-ösztradioloktól, ehhez minden lyukhoz hozzáadunk 80 μl hideg DCC szuszpenziót, ezt követően a mikrotiterlemezeket 10 percen át rázatjuk, majd mintegy 2500 rpm sebességgel 10 percen keresztül centrifugáljuk. Annak érdekében, hogy e folyamat során minimálisra szorítsuk a kötött [^{3}H]-17β-ösztradiolok humán ösztrogénreceptor α-ról történő disszociációját, nagyon fontos, hogy a pufferek és a vizsgálati lyukak hőmérsékletét 2 és 8 °C között tartsuk, és minden lépést gyorsan végezzünk el. A lemezek hatékony és gyors feldolgozásához szükség van egy mikrotiterlemez-rázógépre.

21. 50 μl felülúszóban az ösztrogénreceptor α-hoz kötött [^{3}H]-17β-ösztradiolt átvisszük egy második mikrotiterlemezre, nagy figyelemmel végezve a transzfert, nehogy a DCC-hez hozzáérve átszennyezzük a lyukakat.

22. Ezt követően mindegyik lyukhoz (A1–B12 és D1–E12) 200 μl szcintillációs folyadékot adunk, amely képes a radioaktív sugárzás mozgási energiáját fényenergiává alakítani. A G1–H12 lyukak (a teljes percenkénti bomlás (dpms) mutatói) a [^{3}H]-17β-ösztradiol (40 μl) hígítási sorozatát tartalmazzák, amelyet közvetlenül a mérési lemez lyukaiba töltött szcintillációs folyadékba kell helyezni a 3. táblázat szerinti elosztásban, ezek a lyukak tehát csak 200 μl szcintillációs folyadékot és a [^{3}H]-17β-ösztradiol megfelelő hígítását tartalmazzák. Ezek a mérőszámok azt jelzik, hogy mennyi dpms-ben kifejezett [^{3}H]-17β-ösztradiolt adtunk hozzá a teljes kötődést és a nem specifikus kötődést vizsgáló lyukakhoz.

3. táblázat

Mikrotiterlemez elrendezése telítési kötési vizsgálathoz, radioaktivitás mérése

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3} H] E2 + ER			0,06 nM [^{3} H] E2 + ER			0,08 nM [^{3} H] E2 + ER			0,10 nM [^{3}H] E2 + ER			Teljes kötődés (oldószer)
B	0,30 nM [^{3} H] E2 + ER			0,60 nM [^{3} H] E2 + ER			1,0 nM [^{3} H] E2 + ER			3,0 nM [^{3} H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3} H] E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [^{3} H] E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [^{3} H] E2 + ER + 0,08 μM E2			0,10 nM [^{3}H] E2 + ER+ 0,10 μM E2			Nem specifikus kötődés
E	0,30 nM [^{3} H] E2 + ER + 0,30 μM E2			0,60 nM [^{3} H] E2 + ER + 0,60 μM E2			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 1,0 μM E2			3,0 nM [^{3} H] E2 + ER + 3,0 μM E2			
F													
G	0,03 nM [3H] E2 (teljes dpms)			0,06 nM [3H] E2			0,08 nM [3H] E2			0,10 nM [3H] E2			Teljes dpms (*)
H	0,30 nM [3 H] E2			0,60 nM [3 H] E2			1,0 nM [3 H] E2			3,0 nM [3 H] E2			

[3H] E2:: [3H]-17β-ösztradiol
ER:: ösztrogénreceptor
E2:: nem jelölt 17β-ösztradiol
dpms:: percenkénti bomlás
(*) A [^{3}H] jelölt ösztradiol radioaktív hígítási sorozatát közvetlenül a G1–H12 lyukakban lévő 200 μl szcintillációs folyadékhoz kell adni.

23. A mérés megkezdése előtt legalább 2 órát kell várni, a radioaktivitás mérési ideje pedig mintánként 40 perc legyen. A lyukankénti dpm értékének meghatározásához mikrotiterlemez-szcintillációs számlálót kell alkalmazni, és korrigálni kell az elnyelődött veszteség értékét. Amennyiben nem áll rendelkezésre mikrotiterlemezhez használható szcintillációs számláló, a minták hagyományos számlálóval is mérhetők. Ez esetben fontolóra lehet venni a számlálásra fordított idő csökkentését.

Kompetitív kötési vizsgálat

24. A kompetitív kötési vizsgálat azt méri, hogy egy állandó koncentrációjú [^{3}H]-17β-ösztradiol milyen mértékben képes kötődni az adott vizsgálati vegyi anyag növekvő koncentrációja mellett. Egy vizsgálatmeneten belül minden koncentrációt három párhuzamos ismétlésben kell vizsgálni. Emellett minden vizsgálati vegyi anyagot három nem egyidejűleg végzett vizsgálatmenetben kell tesztelni. A vizsgálatot egy vagy több 96 lyukú mikrotiterlemezen kell elvégezni.

Kontrollok

25. A vizsgálat végrehajtása során minden egyes kísérletben párhuzamosan vizsgálni kell az oldószert és a kontrollanyagokat (a referenciaösztrogént, valamint a gyengén kötődő és a nem kötődő anyagot). Minden vizsgálatmenetben ugyanazon a lemezen vizsgálni kell a referenciaösztrogén teljes koncentrációgörbéjét és a kontrollanyagokat (vagyis a gyengén kötődő és a nem kötődő anyagot). Az összes többi lemeznek tartalmaznia kell i. az E2 és a gyengén kötődő anyag magas (maximális leszorítást eredményező) és közepes (körülbelül IC_{50} hatást kiváltó) koncentrációját, három ismétlésben; ii. az oldószeres kontrollt és a nem specifikus kötődés mérését, legalább három-három ismétlésben. A vizsgálati puffer, a kontrollanyagok, a [^{3}H]-17β-ösztradiol, a humán ösztrogénreceptor α és a vizsgálati vegyi anyagok oldatainak elkészítési eljárását a 2. referencia ismerteti (K függelék, lásd a Freyberger–Wilson vizsgálati protokollt).

Oldószeres kontroll:

26. Az oldószeres kontroll igazolja, hogy az oldószer nem lép kölcsönhatásra a vizsgálati rendszerrel, emellett méri a teljes kötődést (TB). Az ajánlott oldószer az etanol. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag legmagasabb koncentrációja nem oldható etanolban, akkor alternatívaként DMSO is használható. Az etanol, illetve DMSO használata esetén a DMSO koncentrációja a végső vizsgálati lyukakban 1,5 %, de nem haladhatja meg a 2 %-ot.

Puffer kontroll:

27. A puffer kontroll (BC) nem tartalmazhatja sem az oldószert, sem a vizsgálati vegyi anyagot, csak a vizsgálat összes többi összetevőjét. A puffer kontroll eredményeit összevetik az oldószeres kontroll eredményeivel annak ellenőrzésére, hogy az alkalmazott oldószer nincs hatással a vizsgálati rendszerre.

Erősen kötődő anyag (referenciaösztrogén)

28. A 17β-ösztradiol (CAS-száma: 50-28-2) az endogén ligandum, és magas affinitással kötődik az ösztrogénreceptor alfa altípusához. Minden humán ösztrogénreceptor α kompetitív kötési vizsgálathoz nem jelölt 17β-ösztradiollal el kell készíteni egy standard görbét, amely lehetővé teszi a variabilitás értékelését, ha a laboratóriumon belül egy későbbi időpontban ismét elvégzik a vizsgálatot. A nem jelölt 17β-ösztradiolból nyolc hígítást kell készíteni etanolban, és a vizsgálati lyukakba helyezni a következő koncentrációtartományban: 100 nM-tól 10 pM-ig (-7[logM] és -11[logM] között) és a következő elosztásban: (-7[logM], -8[logM], -8,5[logM], -9[logM], - 9,5[logM], -10[logM], -11[logM]). A nem jelölt 17β-ösztradiol legmagasabb koncentrációja (1 μM) egyben a nem specifikus kötődés indikátoraként is szolgál. Ezt a koncentrációt a 4. táblázatban az „NSB" rövidítés különbözteti meg, bár ez is részét képezi a standard görbének.

Gyengén kötődő anyag

29. A vizsgálatba bele kell foglalni egy gyengén kötődő anyagot (a noretinodrel t (CAS-száma: 68-23-5) vagy a noretindront (CAS-száma: 68-22-4)), hogy igazolja az egyes kísérletek érzékenységét, és lehetővé tegye a variabilitás értékelését, ha a vizsgálatot egy későbbi időpontban megismétlik. A gyengén kötődő anyagból nyolc oldatot kell készíteni etanolban, és a vizsgálati lyukakba helyezni a következő koncentrációtartományban: 3 nM-tól 30 μM-ig (-8,5[logM] és -4,5[logM] között) és a következő elosztásban: -4,5[logM], -5[logM], -5,5[logM], -6[logM], -6,5[logM], -7[logM],-7,5[logM], -8,5[logM].

Nem kötődő anyag

30. Negatív (nem kötődő) kontrollanyagként oktil-trietoxi-szilánt (OTES, CAS-száma: 2943-75-1) kell alkalmazni. Ez biztosítja, hogy a vizsgálat végrehajtása során detektálni lehessen, ha a vizsgálati vegyi anyagok nem kötődnek a humán ösztrogénreceptor α-hoz. A nem kötődő anyagból nyolc oldatot kell készíteni etanolban, és a vizsgálati lyukakba helyezni a következő koncentrációtartományban: 0,1 nM–1000 μM (-10[logM] és -3[logM] között), logaritmikus lépésközönként. Alternatív nem kötődő kontrollanyagként di-*n*-butil-ftalát (DBP) használható. Ez utóbbi anyagról kimutatták, hogy maximális oldhatósága -4[logM].

A humán ösztrogénreceptor α koncentrációja

31. A receptort abban a mennyiségben kell alkalmazni, amelyik 1 nM radioaktív ligandum jelenlétében 20 %-os (± 5 %) specifikus kötődést vált ki (lásd a 2. függelék 12–13. pontját). A humán ösztrogénreceptor α oldatot közvetlenül használat előtt kell elkészíteni.

[^{3}H]-17β-ösztradiol

32. A [^{3}H]-17β-ösztradiolt 1,0 nM koncentrációban kell a vizsgálati lyukakba helyezni.

Vizsgálati vegyi anyagok

33. Első lépésként oldhatósági vizsgálatot kell végezni az egyes vizsgálati vegyi anyagok oldhatósági határértékének meghatározására, valamint a vizsgálati protokoll végrehajtása során alkalmazandó megfelelő koncentrációtartomány megállapítására. A vizsgálati vegyi anyagok oldhatósági határértékét először oldószerben kell meghatározni, majd a vizsgálati körülmények mellett meg kell erősíteni. A vizsgálat során tesztelt végső koncentráció nem haladhatja meg az 1 mM-t. A koncentrációtartomány-behatároló vizsgálatnak magában kell foglalnia egy oldószeres kontrollt és a legmagasabb elfogadható koncentrációtól (pl. 1 mM, illetve az oldhatósági határértéktől függően ennél alacsonyabb koncentrációtól) induló, 8 koncentrációból álló logaritmikus hígítási sorozatot, az esetlegesen tapasztalt zavarosságot vagy kicsapódást fel kell jegyezni (lásd még a 35. pontot). A vizsgálati vegyi anyagot a koncentrációtartomány behatárolására szolgáló előzetes vizsgálatban meghatározott, 8 log koncentrációintervallumot tartalmazó görbe alapján kell tesztelni. A második és a harmadik kísérlet koncentrációértékeit úgy kell megválasztani, hogy jobban illeszkedjenek a koncentráció-válasz görbéhez.

34. A vizsgálati vegyi anyag oldatait megfelelő oldószerben kell elkészíteni (lásd a 2. függelék 26. pontját). Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag legmagasabb koncentrációja sem etanolban, sem DMSO-ban nem oldható, és a hozzáadott oldószer mennyiségének növelése miatt a végső vizsgálathoz használt csőben az oldószer koncentrációja túllépné az elfogadható határértéket, a legmagasabb koncentráció az eggyel alacsonyabb koncentrációra csökkenthető. Ebben az esetben hozzá lehet adni egy további koncentrációértéket a koncentrációsorozat alacsonyabb értékeket tartalmazó végéhez. A sorozat többi koncentrációértékét változatlanul kell hagyni.

35. A vizsgálati vegyi anyag mikrotiterlemezbe adagolt oldatait figyelemmel kell követni, mivel a vizsgálati vegyi anyag a vizsgálati lyukakba helyezést követően kicsapódhat. A kicsapódást tartalmazó vizsgálati lyukak adatait ki kell zárni a görbeillesztésből, és fel kell jegyezni az adatok kizárásának okát.

36. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag log(IC_{50}) értékére vonatkozólag léteznek más forrásokból származó korábbi adatok, érdemes lehet geometriailag elosztani az oldatokat (pl. hogy 0,5 log egységnyire helyezkedjenek el a log(IC_{50}) várt értéke körül). A végső eredménynek a log(IC_{50}) mindkét oldalán kellő távolságban eloszló koncentrációkat kell mutatnia, beleértve a görbe tetejét és alját, hogy a kötési görbét megfelelően lehessen jellemezni.

Vizsgálati lemez elrendezése

37. A mikrotiterlemezeket fel kell címkézni, és kódokkal kell ellátni a hatszoros inkubálásnak alávetett oldószeres kontrollt, a referenciaösztrogén legmagasabb koncentrációját – amely egyben a nem specifikus kötődés (NSB) mutatója – és a puffer kontrollt, valamint a háromszor inkubált nem kötődő kontrollanyag (oktil-trietoxi-szilán) mind a nyolc koncentrációját, a referenciaösztrogén 7 alacsonyabb koncentrációját, a gyengén kötődő anyag nyolc dózist képviselő koncentrációit és minden egyes vizsgálati vegyi anyag (TC) 8 koncentrációját. Az alábbi 4. táblázat példát szolgáltat egy olyan lemezelrendezésre, amely biztosítja a referenciaösztrogén és a kontrollanyagok teljes koncentrációgörbéjét. A többi mikrotiterlemez a vizsgálati vegyi anyagok mérésére szolgál, emellett tartalmazniuk kell a lemezen belüli ellenőrzésre szolgáló kontrollanyagokat, vagyis 1) az E2 és a gyengén kötődő anyag magas (maximális leszorítást eredményező) és közepes (körülbelül IC_{50} hatást kiváltó) koncentrációját, három ismétlésben; 2) az oldószeres kontrollt és a nem specifikus kötődés mérését, hat-hat ismétlésben (lásd az 5. táblázatot). A 2.3. függelék példát szolgáltat arra, hogy milyen lemezelrendezést lehet alkalmazni a kompetitív vizsgálatban három ismeretlen vizsgálati vegyi anyag teszteléséhez. A 4. és az 5. táblázatban feltüntetett koncentrációértékek a vizsgálatban használt végső koncentrációkat jelzik. Az E2 maximális koncentrációja 1×10^{-7} M legyen, a gyengén kötődő anyag legmagasabb koncentrációja pedig az 1. lemezen használt legmagasabb koncentráció legyen. Az IC_{50} koncentrációját a laboratóriumnak kell meghatároznia, a kontrollanyagok adatait tartalmazó adatbázisa alapján. Ennek az értéknek közelítenie kell a validálási tanulmányok során nyert értékhez (lásd az 1. táblázatot).

4. táblázat

A kompetitív kötési vizsgálathoz használt mikrotiterlemez azon elrendezése, amely biztosítja a referenciaösztrogén és a kontrollanyagok teljes koncentrációgörbéjét (1. lemez).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (csak oldószer)			TB (csak oldószer)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1\times10^{-8,5}$)			E2 (1×10^{-9})		
C	E2 ($1\times10^{-9,5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Üres (*)		
D	NE ($1\times10^{-4,5}$)			NE (1×10^{-5})			NE ($1\times10^{-5,5}$)			NE (1×10^{-6})		
E	NE ($1\times10^{-6,5}$)			NE (1×10^{-7})			NE ($1\times10^{-7,5}$)			NE ($1\times10^{-8,5}$)		
F	OTES (1×10^{-3})			OTES (1×10^{-4})			OTES (1×10^{-5})			OTES (1×10^{-6})		
G	OTES (1×10^{-7})			OTES (1×10^{-8})			OTES (1×10^{-9})			OTES (1×10^{-10})		
H	Üres (radioaktívhoz) (**)			Üres (radioaktívhoz) (**)			Puffer kontroll			Puffer kontroll		

Ebben a példában a gyengén kötődő anyag a noretinodrel (NE).
(*) ténylegesen üres, nem használt lyuk.
(**) a lyukat nem használják az inkubáció alatt, de használják a teljes hozzáadott radioaktivitás ellenőrzésére.

5. táblázat

A kompetitív kötési vizsgálathoz használt mikrotiterlemez azon elrendezése, amely biztosítja a vizsgálati vegyi anyagok és a lemezen belüli ellenőrzésre szolgáló kontrollanyagok teljes koncentrációgörbéjét

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (csak oldószer)			TB (csak oldószer)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10^{-3})			TC1 (1×10^{-4})			TC1 (1×10^{-5})			TC1 (1×10^{-6})		
C	TC1 (1×10^{-7})			TC1 (1×10^{-8})			TC1 (1×10^{-9})			TC1 (1×10^{-10})		
D	TC2 (1×10^{-3})			TC2 (1×10^{-4})			TC2 (1×10^{-5})			TC2 (1×10^{-6})		
E	TC2 (1×10^{-7})			TC2 (1×10^{-8})			TC2 (1×10^{-9})			TC2 (1×10^{-10})		
F	TC3 (1×10^{-3})			TC3 (1×10^{-4})			TC3 (1×10^{-5})			TC3 (1×10^{-6})		
G	TC3 (1×10^{-7})			TC3 (1×10^{-8})			TC3 (1×10^{-9})			TC3 (1×10^{-10})		
H	NE (IC_{50})			NE ($1\times10^{-4,5}$)			E2 (IC_{50})			E2 (1×10^{-7})		

Ebben a példában a gyengén kötődő anyag a noretinodrel (NE).

A kompetitív kötési vizsgálat elvégzése

38. Amint az a 6. táblázatból is látszik, a lyukakba 80 µl kontrollként szolgáló oldószert és puffert, referenciaösztrogént, gyengén kötődő anyagot, nem kötődő anyagot és vizsgálati pufferben előkészített vizsgálati vegyi anyagokat kell adagolni. Ezt követően minden egyes lyukhoz hozzá kell adni 4 nM koncentrációjú [^{3}H]-17β-ösztradiolt 40 µl mennyiségben. Mintegy 10–15 perces, 2–8 °C hőmérsékleten végzett óvatos ráztatás után hozzá kell adni a 40 µl mennyiségű humán ösztrogénreceptor α oldatot. A vizsgálati mikrotiterlemezeket 16–20 órán keresztül 2–8 °C-os hőmérsékleten inkubálni kell, a lemezeket az inkubáció ideje alatt rázógépre kell helyezni.

6. táblázat

A humán ösztrogénreceptor kompetitív kötési vizsgálat mikrotiterlemezeire helyezett vizsgálati összetevők térfogata

Térfogat (µl)	Összetevő
80	Nem jelölt 17β-ösztradiol, noretinodrel , OTES, vizsgálati vegyi anyagok, oldószer vagy puffer
40	4 nM [^{3}H]-17β-ösztradiol oldat
40	hrERα oldat, a meghatározott koncentrációban
160	***Teljes térfogat az egyes vizsgálati lyukakban***

39. Ezt követően a telítési kötési vizsgálat 20–23. pontjában ismertetett módon minden lyukhoz hozzáadnak 80 µl hideg DCC szuszpenziót, hogy elkülönítsék a humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődött [^{3}H]-17β-ösztradiolt a szabad [^{3}H]-17β-ösztradioltól, majd megmérik a humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődött [^{3}H]-17β-ösztradiolok mennyiségét.

40. A H1 és H6 közötti lyukakban (amelyeket a 4. táblázat üres (radioaktívhoz) címen jelöl) mérik a 40 µl mennyiségű [^{3}H] jelölt ösztradiol percenkénti bomlását. A 40 µl-nek megfelelő mennyiséget közvetlenül a H1–H6 lyukakban lévő szcintillációs folyadékhoz kell adni.

Elfogadhatósági kritériumok

Telítési kötési vizsgálat

41. A specifikus kötődési görbének a [^{3}H]-17β-ösztradiol fokozódó koncentrációban való alkalmazása miatt egy platóban kell végződnie, ami jelzi a humán ösztrogénreceptor α ligandummal való telítettségét.

42. A [^{3}H]-17β-ösztradiol 1 nM koncentrációjánál megfigyelt specifikus kötődésnek a minden vizsgálatmenetben mért átlagos teljes radioaktivitás 15–25 %-os elfogadhatósági tartományán belül kell maradnia. E tartománytól való esetenkénti kis mértékű elérés még elfogadható, de ha a vizsgálatmenetek eredménye következetesen kívül esik ezen a tartományon, illetve ha egy adott vizsgálatmenet eredménye jelentősen eltér tőle, akkor ki kell igazítani a fehérjekoncentrációt és meg kell ismételni a telítési vizsgálatot.

43. Az adatoknak egy lineáris Scatchard-plotot kell alkotniuk.

44. A nem specifikus kötődés nem lehet túlzott mértékű. A nem specifikus kötődés értéke jellemzően nem érheti el a teljes kötődés 35 %-át. Ugyanakkor a nem specifikus kötődés aránya esetenként meghaladhatja ezt a határértéket, ha a radioaktívan jelölt 17β-ösztradiol legalacsonyabb vizsgált koncentrációjánál nagyon alacsony percenkénti bomlást mérnek.

Kompetitív kötési vizsgálat

45. A nem jelölt 17β-ösztradiol növekvő koncentrációban leszorítja a [^{3}H]-17β-ösztradiolt a receptorról, és ez összhangban van az egy kötőhelyes kompetitív kötéssel.

46. A referenciaösztrogén (vagyis a 17β-ösztradiol) IC_{50} és K_d értékének nagyjából egyenlőnek kell lennie a [^{3}H]-17β-ösztradiol moláris koncentrációjával; a disszociációs állandót a telítési kötési vizsgálatban határozzák meg.

47. A teljes specifikus kötődésnek rendre a 20 ± 5 %-os elfogadhatósági tartományon belül kell maradnia, ha a vizsgálatmenetekben az egyes lyukakhoz hozzáadott összes radioaktívan jelölt anyag átlagos mért koncentrációja 1 nM volt. E tartománytól való esetenkénti kis mértékű elérés még elfogadható, de ha a vizsgálatmenetek eredménye következetesen kívül esik ezen a tartományon, illetve ha egy adott vizsgálatmenet eredménye jelentősen eltér ettől, akkor ki kell igazítani a fehérjekoncentrációt.

48. Az oldószer nem módosíthatja a vizsgálat érzékenységét vagy megismételhetőségét. Az oldószeres kontroll (Tb-ként jelölve) eredményeit összevetik a puffer kontroll eredményeivel annak ellenőrzésére, hogy az alkalmazott oldószer nincs hatással a vizsgálati rendszerre. Amennyiben a TB kontroll és a puffer kontroll hasonló eredményre vezet, akkor az oldószer nem befolyásolja a vizsgálatot.

49. A nem kötődő anyag maximális 10^{-3} M (OTES) vagy 10^{-4} M (DBP) koncentrációnál legfeljebb 25 % [^{3}H]-17β-ösztradiolt szoríthat le a humán ösztrogénreceptor α-ról.

50. A Freyberger–Wilson humán ösztrogénreceptor-kötési vizsgálat validálási tanulmányából származó adatok alapján a referenciaösztrogénre és két gyengén kötődő anyagra (pl. noretinodrel , noretindron) vonatkozva teljesítménykritériumokat dolgoztak ki (2. referencia N. függeléke). A validálási tanulmányban részt vevő laboratóriumok 95 %-os konfidenciaintervallumot adtak meg az átlag (n) +/- SD értékéhez minden kontroll vizsgálatmenetben. 95 %-os konfidenciaintervallumot számoltak a görbeillesztési paraméterekre (vagyis a görbe tetejére, aljára, a Hill-meredekségre és a logIC_{50}-re), a referenciaösztrogénre és a gyengén kötődő anyagokra, valamint a gyengén kötődő anyagok referenciaösztrogénhez viszonyított $\log_{10}$RBA értékére vonatkozólag, ami teljesítménykritériumként szolgál a pozitív kontrollanyagok számára. Az 1. táblázat ismerteti a görbeillesztési paraméterek várt tartományait, amelyek használhatók teljesítménykritériumként. A gyakorlatban az IC_{50} tartománya a receptor preparátum K_d értékétől és a ligandum koncentrációjától függően kissé változó lehet.

51. A potenciális vizsgálati vegyi anyagok széles skálája, valamint potenciális affinitásuk és az eredmények (pl. teljes görbe, részleges görbe, nem illeszthető görbe) változatossága miatt a vizsgálati vegyi anyagok görbeillesztési paramétereire nézve nem dolgoztak ki teljesítménykritériumokat. Egy adott vizsgálati vegyi anyag egyes vizsgálatmeneteiből származó eredmények értékelése során azonban szakmai megítélés alapján kell dönteni. A vizsgálati vegyi anyag megfelelő koncentrációtartományát kell használni ahhoz, hogy egyértelműen meg lehessen határozni a kompetitív görbe (pl. 90–100 %-os kötődést jelző) platóját. A vizsgálati vegyi anyag különböző koncentrációin történő ismétlések eltérései közötti és a három független vizsgálatmenet közötti variabilitásnak észszerű mértéken belül kell maradnia és tudományosan védhetőnek kell lennie. Egy adott vizsgálati vegyi anyag minden vizsgálatmenetében elvégzett kontrollok eredményeinek meg kell közelíteniük a Freyberger–Wilson vizsgálat teljesítménymutatóit, és összhangban kell lenniük minden releváns laboratórium történeti kontrolladataival.

AZ ADATOK ELEMZÉSE

Telítési kötési vizsgálat

52. Mérni kell mind a teljes, mind a nem specifikus kötődést. Ezen értékek alapján számolható ki a [^{3}H]-17β-ösztradiol növekvő koncentrációin létrejött egyensúlyi állapotokban kiváltott specifikus kötődés úgy, hogy a teljes kötődésből kivonják a nem specifikus kötődést. A specifikus kötődés és a [^{3}H]-17β-ösztradiol koncentrációi közötti függvényt ábrázoló grafikon a maximális specifikus kötődésre jellemző platóban végződik, amely azt az állapotot jelzi, amikor a humán ösztrogénreceptor α telítődött [3H]-17β-ösztradiollal. Emellett az adatok elemzése dokumentálja, hogy a [^{3}H]-17β-ösztradiol egyetlen, nagy affinitású kötőhelyhez kapcsolódik. A nem specifikus, a teljes és a specifikus kötődést egy telítési kötési görbén kell ábrázolni. Az adatokat a továbbiakban nem-lineáris regressziós analízissel kell elemezni (pl. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995), végül pedig egy Scatchard-plot grafikonon ábrázolni.

53. Az adatelemzés során kizárólag a teljes kötődési adatok alapján meg kell határozni a B_{max} és a K_d értékét, feltételezve, hogy a nem specifikus kötődés lineáris, más módszer alkalmazását indokolni kell. A legjobban illeszkedő görbét pedig robusztus regresszióval kell meghatározni, az ettől való eltérést indokolni kell. A robusztus regresszió alkalmazásának módszerét meg kell adni. Abban az esetben, ha a B_{max} és a K_d értékét a telítési kötési adatok alapján határozzák meg, mindig korrigálni kell a ligandum koncentrációjának csökkenését (például a Swillens, 1995 által leírt módszerrel).

Kompetitív kötési vizsgálat

54. A kompetitív kötési görbe a [^{3}H]-17β-ösztradiol specifikus kötődésének és a kompetítor ($\log_{10}$ egységekben feltüntetett) koncentrációjának összefüggését ábrázolja. A vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely meggátolja a [^{3}H]-17β-ösztradiol maximális specifikus kötődésének 50 %-át, az IC_{50} érték.

55. A pozitív kontrollanyagok (pl. a referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag) becsült log(IC_{50}) értékének meghatározásához egy megfelelő nem-lineáris görbeillesztő szoftvert kell használni, amely illeszteni tudja egy négyparaméteres Hill-egyenlet görbéjét (pl. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). A görbék illesztése során a görbe tetejét, alját, meredekségét jelző értékeket és a log(IC_{50}) értékét általában szabadon ábrázolják. A legjobban illeszkedő görbét robusztus regresszióval kell meghatározni, az ettől való eltérést indokolni kell. A ligandum csökkenését nem kell korrigálni. A kezdeti analízist követően minden kötési görbét ellenőrizni kell, hogy megfelelően illeszkedik-e a modellre. A gyengén kötődő anyag relatív kötési affinitását a gyengén kötődő anyag log (IC_{50}) értékének a 17β-ösztradiol log (IC_{50}) értékéhez viszonyított arányaként kell meghatározni. A pozitív kontrollok és a nem kötődő kontroll eredményeit a vizsgálat e 2. függelék 45–50. pontjában ismertetett teljesítménymutatói alapján kell értékelni.

56. Az összes vizsgálati vegyi anyag adatait lépésenként kell elemezni, biztosítva ezáltal az adatok megfelelő elemzését és a kompetitív kötési görbék helyes osztályozását. Javasolt vizsgálati anyagonként minden vizsgálat megkezdésekor egy szabványosított adatelemzést végezni, amely megegyezik a referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag kontrolljainál alkalmazott analízissel (lásd a fenti 55. pontot). Az adatelemzés végeztével technikailag ellenőrizni kell a görbeillesztési paramétereket, valamint vizuálisan is ellenőrizni kell, hogy az adatok mennyire illeszkednek az egyes vizsgálatmenetek kompetitív kötési görbéjéhez. Amennyiben a technikai ellenőrzés során megfigyelhető a specifikusan kötődő [^{3}H]-17β-ösztradiol arányának koncentrációfüggő csökkenése, a vegyi anyagok egyes koncentrációit tartalmazó ismétlések közötti csekély eltérés és a három vizsgálatmenet görbeillesztési paramétereinek következetessége jó indikátorai annak, hogy a vizsgálatot és az adatelemzést megfelelően hajtották végre.

Az adatok értelmezése

57. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődő anyagnak minősül, ha az adatokra illeszthető kötési görbe, és a válaszgörbe legalsó pontja az adattartomány 50 %-a alatt helyezkedik el (1. ábra).

58. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, valamely vizsgálati vegyi anyag akkor tekinthető humán ösztrogénreceptor α-hoz nem kötődő anyagnak, ha:

— az adataira illeszthető kötési görbe, és az adatokra illesztett válaszgörbe legalsó pontja az adattartomány 75 %-a felett helyezkedik el, vagy

— az adataira nem illeszthető kötési görbe, és az adatok koncentrációcsoportjai közül a legalsó simítatlan átlagos kötési arány 75 % felett helyezkedik el.

59. A vizsgálati vegyi anyag válasza akkor minősül kétértelműnek, ha a fenti feltételek egyike sem teljesül (vagyis az adatokra illesztett válaszgörbe legalsó pontja 76 és 51 % között helyezkedik el).

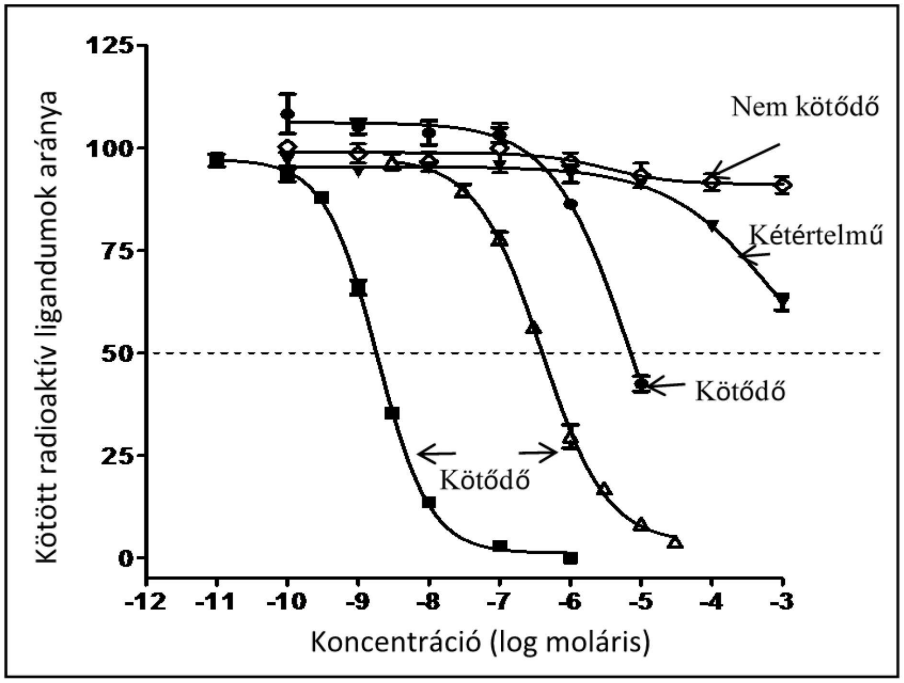
7. táblázat

A vizsgálati vegyi anyagok kompetitív kötési görbén alapuló osztályba sorolásának kritériumai

Besorolás	Kritériumok
Kötődő[a]	Az adatokra illeszthető kötési görbe. A **válaszgörbe legalsó pontja az adattartomány 50 %-a alatt helyezkedik el.**
Nem kötődő[b]	Ha az adatokra illeszthető kötési görbe, az **adattartományra illesztett válaszgörbe legalsó pontja 75 %-a felett helyezkedik el.**
Kétértelmű[c]	Ha az adatokra nem illeszthető kötési görbe, az **adatok koncentrációcsoportjai közül a legalsó simítatlan átlagos kötési arány 75 % felett helyezkedik el.** Bármely vizsgálatmenet, amelynek eredménye sem a kötődő, sem a nem kötődő kategóriába nem sorolható (pl. az adatokra illesztett válaszgörbe legalsó pontja 76 és 51 % között helyezkedik el).

1. ábra

Példák a vizsgálati vegyi anyagok kompetitív kötési görbén alapuló osztályba sorolására.



60. A vizsgálati vegyi anyag egy laboratóriumon belül elvégzett több vizsgálatmenetének eredményét összesítik úgy, hogy egy számértéket társítanak minden vizsgálatmenethez, majd meghatározzák a vizsgálatmenetek átlagát (lásd a 8. táblázatot). A laboratórium vizsgálatmeneteinek összesített eredményét azután összevetik az egyes vizsgálati vegyi anyagok várt besorolásával.

8. táblázat

Az egy laboratóriumon belül több vizsgálatmenetben vizsgálati vegyi anyagok osztályba sorolásának módszere

Számérték társítása az egyes vizsgálatmenetekhez:	
Besorolás	**Számérték**
Kötődő	2
Kétértelmű	1
Nem kötődő	0
Besorolás a vizsgálatmenetek átlagos számértéke alapján:	
Besorolás	**Számérték**
Kötődő	Átlag ≥ 1,5
Kétértelmű	0,5 ≤ Átlag < 1,5
Nem kötődő	Átlag < 0,5

VIZSGÁLATI JELENTÉS

60. Lásd a vizsgálati módszer „A humán ÖSZTROGÉNRECEPTOR-KÖTÉSI VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” részének 24. pontját.

2.1. függelék

SZAKKIFEJEZÉSEK LISTÁJA

[^{3}H]E2: radioaktív tríciummal jelölt 17β-ösztradiol.

DCC: dextránbevonatú aktívszén.

E2: nem jelölt 17β-ösztradiol (semleges).

Vizsgálati puffer: 10 mM trisz, 10 mg/ml szarvasmarha szérum albumin, 2 mM DTT, 10 % glicerin, 0,2 mM leupeptin, pH-értéke 7,5.

hrERα: humán rekombináns ösztrogénreceptor alfa (ligandumkötő domén).

Ismétlés: egyike azon lyukaknak, amelyek azonos mintát tartalmaznak azonos koncentrációban, és vizsgálatuk egy adott vizsgálatmeneten belül, párhuzamosan zajlik. E protokoll keretén belül a vizsgálati vegyi anyagok minden koncentrációját három ismétlésben tesztelik; vagyis a vizsgálati vegyi anyagok minden koncentrációját egyidejűleg három ismétlésben vizsgálják.

Vizsgálatmenet: párhuzamosan vizsgált mikrotiterlemez minden mintája, amely minden szükséges információt biztosít a vizsgálati vegyi anyagok humán ösztrogénreceptor α-hoz való kötődésének jellemzéséhez (nevezetesen a vizsgálati lyukba adagolt összes [^{3}H]-17β-ösztradiol, a [^{3}H]-17β-ösztradiol maximális kötődése a hrERα-hoz, nem specifikus kötődés és a vizsgálati vegyi anyagok különböző koncentrációi által előidézett teljes kötődés). Egy vizsgálatmenet állhat koncentrációnként egyetlen vizsgálati lyukból is (vagyis egy ismétlésből), mivel azonban ez a protokoll három ismétlésben való tesztelést ír elő, egy vizsgálatmenet koncentrációnként három vizsgálati lyukat foglal magában. Emellett a protokoll meghatározza azt is, hogy vegyi anyagonként három független (azaz nem egyidejűleg lefolytatott) vizsgálatmenetre van szükség.

2.2. függelék

HÁROM ISMÉTLÉSES TIPIKUS [^{3}H]-17B-ÖSZTRADIOL TELÍTÉSI VIZSGÁLAT

Három ismétléses tipikus [^{3}H]-17β-ösztradiol telítési vizsgálat											
Pozíció	**Ismétlés**	**Lyuktípus kódja**	**Radioaktív E2 induló koncentrációja (nM)**	**Radioaktív E2 térfogata (µl)**	**Radioaktív E2 végső koncentrációja (nM)**	**Nem jelölt E2 induló koncentráció (µM)**	**Nem jelölt E2 térfogata (µl)**	**Nem jelölt E2 végső koncentrációja (µM)**	**Puffer térfogata (µl)**	**Receptor térfogata (µl)**	**A lyukak teljes térfogata**
A1	1	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A2	2	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A3	3	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A4	1	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A5	2	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A6	3	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A7	1	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A8	2	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A9	3	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A10	1	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A11	2	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A12	3	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
B1	1	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B2	2	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B3	3	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B4	1	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B5	2	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B6	3	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B7	1	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B8	2	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160

Három ismétléses tipikus [^{3}H]-17β-ösztradiol telítési vizsgálat											
Pozíció	**Ismétlés**	**Lyuktípus kódja**	**Radioaktív E2 induló koncentrációja (nM)**	**Radioaktív E2 térfogata (µl)**	**Radioaktív E2 végső koncentrációja (nM)**	**Nem jelölt E2 induló koncentráció (µM)**	**Nem jelölt E2 térfogata (µl)**	**Nem jelölt E2 végső koncentrációja (µM)**	**Puffer térfogata (µl)**	**Receptor térfogata (µl)**	**A lyukak teljes térfogata**
B9	3	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B10	1	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B11	2	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B12	3	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160

Három ismétléses tipikus [^{3}H]-17β-ösztradiol telítési vizsgálat											
Pozíció	**Ismétlés**	**Lyuktípus kódja**	**Radioaktív E2 induló koncentrációja (nM)**	**Radioaktív E2 térfogata (µl)**	**Radioaktív E2 végső koncentrációja (nM)**	**Nem jelölt E2 induló koncentráció (µM)**	**Nem jelölt E2 térfogata (µl)**	**Nem jelölt E2 végső koncentrációja (µM)**	**Puffer térfogata (µl)**	**Receptor térfogata (µl)**	**A lyukak teljes térfogata**
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	Radioaktív	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Radioaktív	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Radioaktív	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Radioaktív	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Radioaktív	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Radioaktív	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Radioaktív	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Radioaktív	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Radioaktív	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Radioaktív	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Radioaktív	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Radioaktív	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
H1	1	Radioaktív	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Radioaktív	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Radioaktív	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Radioaktív	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40

Három ismétléses tipikus [^{3}H]-17β-ösztradiol telítési vizsgálat

Pozíció	Ismétlés	Lyuktípus kódja	Radioaktív E2 induló koncentrációja (nM)	Radioaktív E2 térfogata (µl)	Radioaktív E2 végső koncentrációja (nM)	Nem jelölt E2 induló koncentráció (µM)	Nem jelölt E2 térfogata (µl)	Nem jelölt E2 végső koncentrációja (µM)	Puffer térfogata (µl)	Receptor térfogata (µl)	A lyukak teljes térfogata
H5	2	Radioaktív	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Radioaktív	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Radioaktív	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Radioaktív	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Radioaktív	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Radioaktív	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Radioaktív	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Radioaktív	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

A „radioaktív” kifejezéssel jelölt lyukak az inkubálás alatt üresek. A 40 µl-t kizárólag a szcintillációs számlálás céljából adják hozzá a lyukakhoz.

2.3. függelék:

MINTÁK ELRENDEZÉSE A KOMPETITÍV KÖTÉSI VIZSGÁLATHOZ

Lemez	**Pozíció**	**Ismétlés**	**Lyuk típusa**	**Lyuk kódja**	**Koncentráció kódja**	**Kompetítor induló koncentrációja (M)**	**hrER törzs (µl)**	**Puffer térfogata (µl)**	**Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)**	**Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)**	**Végső térfogat (µl)**	**Kompetítor végső koncentrációja (M)**
Sz	A1	1	teljes kötődés	TB	TB1	—	40		40	80	160	—
Sz	A2	2	teljes kötődés	TB	TB2	—	40		40	80	160	—
Sz	A3	3	teljes kötődés	TB	TB3	—	40		40	80	160	—
Sz	A4	1	teljes kötődés	TB	TB4	—	40		40	80	160	—
Sz	A5	2	teljes kötődés	TB	TB5	—	40		40	80	160	—
Sz	A6	3	teljes kötődés	TB	TB6	—	40		40	80	160	—
Sz	A7	1	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S0	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
Sz	A8	2	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S0	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
Sz	A9	3	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S0	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
Sz	A10	1	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S0	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
Sz	A11	2	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S0	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
Sz	A12	3	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S0	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
Sz	B1	1	nem jelölt E2	Sz	S1	2,00 E^{-07}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-07}
Sz	B2	2	nem jelölt E2	Sz	S1	2,00 E^{-07}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-07}
Sz	B3	3	nem jelölt E2	Sz	S1	2,00 E^{-07}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-07}
Sz	B4	1	nem jelölt E2	Sz	S2	2,00 E^{-08}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-08}
Sz	B5	2	nem jelölt E2	Sz	S2	2,00 E^{-08}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-08}
Sz	B6	3	nem jelölt E2	Sz	S2	2,00 E^{-08}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-08}
Sz	B7	1	nem jelölt E2	Sz	S3	6,00 E^{-09}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-09}
Sz	B8	2	nem jelölt E2	Sz	S3	6,00 E^{-09}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-09}
Sz	B9	3	nem jelölt E2	Sz	S3	6,00 E^{-09}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-09}

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
Sz	B10	1	nem jelölt E2	Sz	S4	2,00 E^{-09}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-09}
Sz	B11	2	nem jelölt E2	Sz	S4	2,00 E^{-09}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-09}
Sz	B12	3	nem jelölt E2	Sz	S4	2,00 E^{-09}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-09}
Sz	C1	1	nem jelölt E2	Sz	S5	6,00 E^{-10}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-10}
Sz	C2	2	nem jelölt E2	Sz	S5	6,00 E^{-10}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-10}
Sz	C3	3	nem jelölt E2	Sz	S5	6,00 E^{-10}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-10}
Sz	C4	1	nem jelölt E2	Sz	S6	2,00 E^{-10}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-10}
Sz	C5	2	nem jelölt E2	Sz	S6	2,00 E^{-10}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-10}
Sz	C6	3	nem jelölt E2	Sz	S6	2,00 E^{-10}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-10}
Sz	C7	1	nem jelölt E2	Sz	S7	2,00 E^{-11}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-11}
Sz	C8	2	nem jelölt E2	Sz	S7	2,00 E^{-11}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-11}
Sz	C9	3	nem jelölt E2	Sz	S7	2,00 E^{-11}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-11}
Sz	C10	1	üres	üres	B1	—	—	160	—	—	160	—
Sz	C11	2	üres	üres	B2	—	—	160	—	—	160	—
Sz	C12	3	üres	üres	B3	—	—	160	—	—	160	—
Sz	D1	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00 E^{-05}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-05}
Sz	D2	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00 E^{-05}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-05}
Sz	D3	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00 E^{-05}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-05}
Sz	D4	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00 E^{-05}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-05}
Sz	D5	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00 E^{-05}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-05}
Sz	D6	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00 E^{-05}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-05}

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
Sz	D7	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-06}
Sz	D8	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-06}
Sz	D9	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-06}
Sz	D10	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
Sz	D11	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
Sz	D12	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
Sz	E1	1	noretinodrel	NE	WP	6,00 E^{-07}	40		40	80	160	3,0 E^{-07}
Sz	E2	2	noretinodrel	NE	WP	6,00 E^{-07}	40		40	80	160	3,0 E^{-07}
Sz	E3	3	noretinodrel	NE	WP	6,00 E^{-07}	40		40	80	160	3,0 E^{-07}
Sz	E4	1	noretinodrel	NE	WP	2,00 E^{-07}	40		40	80	160	1,0 E^{-07}
Sz	E5	2	noretinodrel	NE	WP	2,00 E^{-07}	40		40	80	160	1,0 E^{-07}
Sz	E6	3	noretinodrel	NE	WP	2,00 E^{-07}	40		40	80	160	1,0 E^{-07}
Sz	E7	1	noretinodrel	NE	WP	6,00 E^{-08}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-08}
Sz	E8	2	noretinodrel	NE	WP	6,00 E^{-08}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-08}
Sz	E9	3	noretinodrel	NE	WP	6,00 E^{-08}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-08}
Sz	E10	1	noretinodrel	NE	WP	6,00 E^{-09}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-09}

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
Sz	E11	2	noretinodrel	NE	WP	6,00 E^{-09}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-09}
Sz	E12	3	noretinodrel	NE	WP	6,00 E^{-09}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-09}
Sz	F1	1	OTES	N	OTES	2,00 E^{-03}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-03}
Sz	F2	2	OTES	N	OTES	2,00 E^{-03}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-03}
Sz	F3	3	OTES	N	OTES	2,00 E^{-03}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-03}
Sz	F4	1	OTES	N	OTES	2,00 E^{-04}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-04}
Sz	F5	2	OTES	N	OTES	2,00 E^{-04}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-04}
Sz	F6	3	OTES	N	OTES	2,00 E^{-04}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-04}
Sz	F7	1	OTES	N	OTES	2,00 E^{-05}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-05}
Sz	F8	2	OTES	N	OTES	2,00 E^{-05}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-05}
Sz	F9	3	OTES	N	OTES	2,00 E^{-05}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-05}
Sz	F10	1	OTES	N	OTES	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
Sz	F11	2	OTES	N	OTES	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
Sz	F12	3	OTES	N	OTES	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
Sz	G1	1	OTES	N	OTES	2,00 E^{-07}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-07}
Sz	G2	2	OTES	N	OTES	2,00 E^{-07}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-07}
Sz	G3	3	OTES	N	OTES	2,00 E^{-07}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-07}
Sz	G4	1	OTES	N	OTES	2,00 E^{-08}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-08}
Sz	G5	2	OTES	N	OTES	2,00 E^{-08}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-08}
Sz	G6	3	OTES	N	OTES	2,00 E^{-08}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-08}
Sz	G7	1	OTES	N	OTES	2,00 E^{-09}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-09}

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
Sz	G8	2	OTES	N	OTES	2,00 E^{-09}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-09}
Sz	G9	3	OTES	N	OTES	2,00 E^{-09}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-09}
Sz	G10	1	OTES	N	OTES	2,00 E^{-10}	40	—	40	—	160	1,0 E^{-10}
Sz	G11	2	OTES	N	OTES	2,00 E^{-10}	40	—	40	—	160	1,0 E^{-10}
Sz	G12	3	OTES	N	OTES	2,00 E^{-10}	40	—	40	—	160	1,0 E^{-10}
Sz	H1	1	radioaktív	H	H	—	—	—	40	—	40	—
Sz	H2	1	radioaktív	H	H	—	—	—	40	—	40	—
Sz	H3	1	radioaktív	H	H	—	—	—	40	—	40	—
Sz	H4	1	radioaktív	H	H	—	—	—	40	—	40	—
Sz	H5	1	radioaktív	H	H	—	—	—	40	—	40	—
Sz	H6	1	radioaktív	H	H	—	—	—	40	—	40	—
Sz	H7	1	puffer kontroll	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
Sz	H8	1	puffer kontroll	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
Sz	H9	1	puffer kontroll	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
Sz	H10	1	puffer kontroll	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
Sz	H11	1	puffer kontroll	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
Sz	H12	1	puffer kontroll	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—

A „radioaktív” kifejezéssel jelölt lyukak az inkubálás alatt üresek. A 40 µl-t kizárólag a szcintillációs számlálás céljából adják hozzá a lyukakhoz.

Minták elrendezése a kompetitív kötési vizsgálathoz

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µL)	Puffer térfogata (µL)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
P1	A1	1	teljes kötődés	TB	TBB1B1	—	40	—	40	80	160	—
P1	A2	2	teljes kötődés	TB	TB2	—	40	—	40	80	160	—
P1	A3	3	teljes kötődés	TB	TB3	—	40	—	40	80	160	—
P1	A4	1	teljes kötődés	TB	TB4	—	40	—	40	80	160	—
P1	A5	2	teljes kötődés	TB	TB5	—	40	—	40	80	160	—
P1	A6	3	teljes kötődés	TB	TB6	—	40	—	40	80	160	—
P1	A7	1	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S0	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
P1	A8	2	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S0	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
P1	A9	3	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S0	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
P1	A10	1	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S0	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
P1	A11	2	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S0	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
P1	A12	3	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S0	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
P1	B1	1	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	1	2,00 E^{-03}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-03}
P1	B2	2	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	1	2,00 E^{-03}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-03}
P1	B3	3	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	1	2,00 E^{-03}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-03}
P1	B4	1	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	2	2,00 E^{-04}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-04}
P1	B5	2	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	2	2,00 E^{-04}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-04}
P1	B6	3	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	2	2,00 E^{-04}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-04}
P1	B7	1	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	3	2,00 E^{-05}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-05}
P1	B8	2	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	3	2,00 E^{-05}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-05}
P1	B9	3	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	3	2,00 E^{-05}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-05}
P1	B10	1	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	4	2,00 E^{-06}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-06}
P1	B11	2	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	4	2,00 E^{-06}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-06}
P1	B12	3	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	4	2,00 E^{-06}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-06}

Minták elrendezése a kompetitív kötési vizsgálathoz

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µL)	Puffer térfogata (µL)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
P1	C1	1	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	5	$2{,}00\ E^{-07}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-07}$
P1	C2	2	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	5	$2{,}00\ E^{-07}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-07}$
P1	C3	3	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	5	$2{,}00\ E^{-07}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-07}$
P1	C4	1	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	6	$2{,}00\ E^{-08}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-08}$
P1	C5	2	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	6	$2{,}00\ E^{-08}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-08}$
P1	C6	3	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	6	$2{,}00\ E^{-08}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-08}$
P1	C7	1	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	7	$2{,}00\ E^{-09}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-09}$
P1	C8	2	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	7	$2{,}00\ E^{-09}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-09}$
P1	C9	3	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	7	$2{,}00\ E^{-09}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-09}$
P1	C10	1	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	8	$2{,}00\ E^{-10}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-10}$
P1	C11	2	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	8	$2{,}00\ E^{-10}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-10}$
P1	C12	3	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	8	$2{,}00\ E^{-10}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-10}$
P1	D1	1	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	1	$2{,}00\ E^{-03}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-03}$
P1	D2	2	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	1	$2{,}00\ E^{-03}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-03}$
P1	D3	3	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	1	$2{,}00\ E^{-03}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-03}$
P1	D4	1	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	2	$2{,}00\ E^{-04}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-04}$
P1	D5	2	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	2	$2{,}00\ E^{-04}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-04}$
P1	D6	3	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	2	$2{,}00\ E^{-04}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-04}$
P1	D7	1	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	3	$2{,}00\ E^{-05}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-05}$
P1	D8	2	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	3	$2{,}00\ E^{-05}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-05}$
P1	D9	3	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	3	$2{,}00\ E^{-05}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-05}$
P1	D10	1	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	4	$2{,}00\ E^{-06}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-06}$
P1	D11	2	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	4	$2{,}00\ E^{-06}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-06}$
P1	D12	3	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	4	$2{,}00\ E^{-06}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-06}$

Minták elrendezése a kompetitív kötési vizsgálathoz

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µL)	Puffer térfogata (µL)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
P1	E1	1	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	5	2,00 E^{-07}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-07}
P1	E2	2	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	5	2,00 E^{-07}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-07}
P1	E3	3	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	5	2,00 E^{-07}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-07}
P1	E4	1	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0 E^{-08}
P1	E5	2	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0 E^{-08}
P1	E6	3	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0 E^{-08}
P1	E7	1	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	7	2,00 E^{-06}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-09}
P1	E8	2	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	7	2,00 E^{-06}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-09}
P1	E9	3	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	7	2,00 E^{-06}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-09}
P1	E10	1	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	8	2,00 E^{-06}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-10}
P1	E11	2	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	8	2,00 E^{-06}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-10}
P1	E12	3	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	8	2,00 E^{-06}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-10}
P1	F1	1	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	1	2,00 E^{-03}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-03}
P1	F2	2	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	1	2,00 E^{-03}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-03}
P1	F3	3	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	1	2,00 E^{-03}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-03}
P1	F4	1	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	2	2,00 E^{-04}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-04}
P1	F5	2	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	2	2,00 E^{-04}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-04}
P1	F6	3	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	2	2,00 E^{-04}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-04}
P1	F7	1	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	3	2,00 E^{-05}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-05}
P1	F8	2	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	3	2,00 E^{-05}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-05}
P1	F9	3	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	3	2,00 E^{-05}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-05}
P1	F10	1	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	4	2,00 E^{-06}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-06}
P1	F11	2	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	4	2,00 E^{-06}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-06}
P1	F12	3	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	4	2,00 E^{-06}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-06}

Minták elrendezése a kompetitív kötési vizsgálathoz

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µL)	Puffer térfogata (µL)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
P1	G1	1	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	5	2,00 E^{-07}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-07}
P1	G2	2	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	5	2,00 E^{-07}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-07}
P1	G3	3	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	5	2,00 E^{-07}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-07}
P1	G4	1	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	6	2,00 E^{-08}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-08}
P1	G5	2	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	6	2,00 E^{-08}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-08}
P1	G6	3	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	6	2,00 E^{-08}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-08}
P1	G7	1	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	7	2,00 E^{-09}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-09}
P1	G8	2	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	7	2,00 E^{-09}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-09}
P1	G9	3	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	7	2,00 E^{-09}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-09}
P1	G10	1	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	8	2,00 E^{-10}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-10}
P1	G11	2	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	8	2,00 E^{-10}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-10}
P1	G12	3	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	8	2,00 E^{-10}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-10}
P1	H1	1	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	noretinodrel	NE		1,00 $E^{-4,5}$	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	noretinodrel	NE		1,00 $E^{-4,5}$	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	noretinodrel	NE		1,00 $E^{-4,5}$	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	nem jelölt E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	nem jelölt E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	nem jelölt E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	nem jelölt E2 S			1,00 E^{-7}	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	nem jelölt E2 S			1,00 E^{-7}	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	nem jelölt E2 S			1,00 E^{-7}	40	0	40	80	160	

3. függelék

A CERI INTÉZET (CHEMICAL EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTE) HUMÁN REKOMBINÁNS LIGANDUMKÖTŐ DOMÉNNEL RENDELKEZŐ ERA FEHÉRJE HASZNÁLATÁN ALAPULÓ *IN VITRO* ÖSZTROGÉNRECEPTOR-KÖTÉSI VIZSGÁLATA

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

1. Ez az *in vitro* ösztrogénreceptor (ERα) telítési és kompetitív kötési vizsgálat a humán ösztrogénrecptor α (hrERα) ligandumkötő doménjét alkalmazza. A japán CERI Intézet által előállított fehérjekonstrukció egy glutation-S-transzferáz (GST) fúziós fehérje, amelyet *E. coli*-ban termeltetnek. A CERI protokollt több laboratórium részvételével zajló, nemzetközi validálási tanulmánynak (2) vetették alá, amely bizonyította, hogy a vizsgálat tervezett felhasználása tekintetében releváns és megbízható.

2. A vizsgálat egy szűrési eljárás, amelynek révén azonosíthatók a humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődni képes anyagok. A vizsgálatot annak meghatározására alkalmazzák, hogy egy adott vizsgálati vegyi anyag képes-e versenyezni a 17β-ösztradiollal a humán ösztrogénreceptor α ligandumkötő doménjéhez való kötődésért. A vizsgálat kvantitatív eredményei magukban foglalhatják az IC_{50} értéket (vagyis azt a koncentrációt, amelyre a vizsgálati vegyi anyagnak szüksége van ahhoz, hogy a [^{3}H]-17β-ösztradiol felét leszorítsa a humán ösztrogénreceptor α-ról), valamint a vizsgálati vegyi anyag humán ösztrogénreceptor α-hoz való relatív – a 17β-ösztradiolhoz viszonyított – kötési affinitását. A vegyi anyagok szűrése céljából a vizsgálat elfogadható kvalitatív eredményei kiterjedhetnek a vizsgálati vegyi anyagok humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődő, nem kötődő, illetve nem egyértelmű kategóriába sorolására, ezek meghatározására a kötési görbékre vonatkozó kritériumok alapján kerül sor.

3. A vizsgálat radioaktív ligandumot használ, ezért a laboratóriumnak rendelkeznie kell radioaktív anyagok használatára vonatkozó engedéllyel. A radioaktív izotópokkal és veszélyes vegyi anyagokkal végzett valamennyi folyamat során be kell tartani a nemzeti jogszabályok által előírt rendelkezéseket és eljárásokat.

4. E vizsgálat szabályozási célra való alkalmazása előtt el kell olvasni az „**ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS**” és „**A humán ÖSZTROGÉNRECEPTOR-KÖTÉSI VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI**” részt. Az ebben a vizsgálati iránymutatásban használt fogalmak és rövidítések meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLATI ELVEK (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

5. A humán ösztrogénreceptor α-kötési vizsgálat azt méri, hogy milyen mértékben képes egy radioaktívan jelölt ligandum (a [^{3}H]17β-ösztradiol) az ösztrogénreceptorhoz kötődni egy adott vizsgálati vegyi anyag (a kompetítor) növekvő koncentrációjának jelenlétében. Az ösztrogénreceptorok iránt nagy affinitást mutató vizsgálati vegyi anyagok alacsonyabb koncentrációban versenyeznek a radioaktívan jelölt ligandummal azokhoz a vegyi anyagokhoz képest, amelyek kisebb affinitást mutatnak a receptor iránt.

6. A vizsgálat két fő összetevőből áll: egy telítési kötési kísérletből, amelynek során meghatározzák a receptor és a ligandum közötti kölcsönhatás paramétereit, majd egy ezután végzett kompetitív kötési kísérletből, amelynek révén jellemzik a vizsgálati vegyi anyag és a radioaktívan jelölt ligandum ösztrogénreceptor-kötőhelyekért folytatott vetélkedését.

7. A telítési kötési kísérlet célja, hogy a kompetitív kötési kísérlet előkészítéseként meghatározzák a receptorok egy adott tételének kötési affinitását és a receptorok számát. A telítési kötési kísérlet egyensúlyi állapotban méri egy fix koncentrációjú ösztrogénreceptor természetes ligandumához való kötési affinitását (amelynek mutatója a disszociációs állandó, a K_d) és a receptor aktív kötőhelyeinek koncentrációját (B_{max}).

8. A kompetitív kötési kísérletben azt mérik, hogy egy adott anyag milyen mértékű affinitással rendelkezik arra, hogy versenyezzen a [^{3}H]17β-ösztradiollal az ösztrogénreceptorral formált kötésért. Az affinitást a vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációjával számszerűsítik, amely egyensúlyi állapotban meggátolja a [^{3}H]17β-ösztradiol specifikus kötődésének 50 %-át (ez az úgynevezett „50 %-os gátlást kiváltó koncentráció” vagy IC_{50}). Az affinitás mérhető emellett a relatív kötési affinitással is (RBA, az ösztradiol ugyanazon vizsgálatmenetben, de külön mért IC_{50} értékéhez viszonyított affinitás). A kompetitív kötési kísérlet azt méri, hogy milyen mértékben kötődik egy fix koncentrációban alkalmazott [^{3}H]17β-ösztradiol a vizsgálati vegyi anyag széles skálát (nyolc nagyságrendet) lefedő koncentrációja jelenlétében. Ezt követően – ahol lehetséges – az adatokat a Hill-egyenlet olyan formájára illesztik (Hill, 1910), amely meghatározza, hogy milyen mértékben szorítják le az egy kötőhelyet elfoglaló kompetitív kötődő anyagok a radioaktív ligandumot. A radioaktívan jelölt ösztradiol egyensúlyi állapotban történő leszorításának mértéke alapján jellemzik a vizsgálati vegyi anyagot kötődő, nem kötődő, vagy kétértelmű választ adó anyagként.

ELJÁRÁS

A humán ösztrogénreceptor α fehérje elfogadható teljesítményének igazolása

9. A telítési és a kompetitív kötési vizsgálatok rutinszerű alkalmazása előtt a humán ösztrogénreceptor α minden új tételéről bizonyítani kell, hogy megfelelő teljesítményt nyújt abban a laboratóriumban, ahol használni fogják. A megfelelő teljesítmény egy két lépésből álló eljárással bizonyítható. Ez a két lépés a következő:

— A humán ösztrogénreceptor α-specifikusságának és -telítettségének igazolása érdekében végezzünk el egy telítési[^{3}H]-17β-ösztradiol kötési vizsgálatot. Az adatok nem-lineáris regressziós analízise (pl. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995), majd azt követő Scatchard-plot ábrázolása egy adott hrERα-tételre vonatkozólag dokumentálja a [^{3}H]-17β-ösztradiol humán ösztrogénreceptor α-hoz való kötési affinitását (K_d) és a receptorok számát (B_{max}).

— Végezzünk el egy kompetitív kötési vizsgálatot a kontrollanyagok (a referenciaösztrogén (17β-ösztradiol), egy gyengén kötődő anyag (pl. noretinodrel vagy noretindron) és egy nem kötődő anyag (oktil-trietoxi-szilán, OTES)) használatával. Valamennyi laboratóriumnak létre kell hoznia egy adatbázist annak dokumentálására, hogy a referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag IC_{50} értékét és releváns mutatóit következetesen határozta meg a különböző kísérletek és az eltérő humán ösztrogénreceptor α-tételek vizsgálata során. Emellett a kontrollanyagok kompetitív kötési görbéjét alkotó paramétereknek a 95 %-os konfidenciaintervallumon belül kell lenniük (lásd az 1. táblázatot), amelynek értékeit a vizsgálat validálási tanulmányában részt vevő laboratóriumok adatai alapján határozták meg (2).

1. táblázat

A CERI humán ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatban használt referenciaösztrogén és gyengén kötődő anyag teljesítményére vonatkozó kritériumok

Anyag	Paraméter	Átlag [a]	Standard deviáció (n)	95 %-os konfidenciaintervallumok [b]	
				Alsó határ	Felső határ
17β-ösztradiol	Görbe teteje	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Görbe alja	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Hill-meredekség	−1,22	0,20 (70)	−1,27	−1,17
	$LogIC_{50}$	−8,93	0,23 (70)	−8,98	−8,87
Noretinodrel	Görbe teteje	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Görbe alja	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hill–meredekség	−1,04	0,21 (68)	−1,09	−0,99
	$LogIC_{50}$	−6,19	0,40 (68)	−6,29	−6,10
Noretindron [c]	Görbe teteje	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Görbe alja	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hill–meredekség	−1,18	0,32 (23)	−1,31	−1,04
	$LogIC_{50}$	−6,01	0,54 (23)	−6,25	−5,78

[a] Az átlag ± standard deviáció (SD) értékét ((n) mintamérettel) becsült görbeillesztési paraméterek (négyparaméteres Hill-egyenlet) segítségével számolták ki a validálási tanulmány során négy laboratórium által kontroll céljából végzett vizsgálatmenetek során (lásd a 2. referencia N. függelékét).

[b] A 95 %-os konfidencia útmutatóként szolgál az elfogadhatósági kritériumokhoz.

[c] A validálási tanulmány során a 4. alfeladatban a noretindron vizsgálata opcionális volt (lásd a 2. referenciát és a 4. alfeladatot). Az átlag ± SD (n) értékét tehát becsült görbeillesztési paraméterek (négyparaméteres Hill-egyenlet) segítségével számolták ki két laboratórium által kontroll céljából végzett vizsgálatmenetek során.
Az IC_{50} tartománya függ a receptor preparátum K_d értékétől és a radioaktívan jelölt ligandum egyes laboratóriumokban alkalmazott koncentrációjától. Megengedhető, hogy a vizsgálat lefolytatásának körülményei alapján az IC_{50} tartományát megfelelő mértékben módosítsák.

A laboratórium jártasságának igazolása

10. Lásd a vizsgálati módszer „**A humán ÖSZTROGÉNRECEPTOR–KÖTÉSI VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI**” részének 17. és 18. pontját, valamint 2. táblázatát. Minden (telítési és kompetitív kötési) vizsgálatnak három független (vagyis a receptor, a vegyi anyagok és a reagensek frissen készített oldataival végezett), különböző napokon lefolytatott vizsgálatmenetből kell állnia, az egyes vizsgálatmeneteknek pedig három ismétlést kell tartalmazniuk.

A receptor (hrERα) koncentrációjának meghatározása

11. Az aktív receptor koncentrációja tételenként és tárolási feltételek szerint kissé változó. Ebből adódóan a forgalmazótól való átvételkor meg kell határozni az aktív receptor koncentrációját. Így megállapítható az aktív receptor vizsgálatmenet során alkalmazandó megfelelő koncentrációja.

12. A kompetitív kötési vizsgálatnak megfelelő körülmények között (vagyis 0,5 nM [^{3}H]–ösztradiollal) a receptort 0,1, 0,2, 0,4 és 0,6 nM névleges koncentrációban inkubálni kell 1 μM nem jelölt ösztradiol jelenlétében (nem specifikus kötődés) és annak hiányában (teljes kötődés). A specifikus kötődést, amely a teljes és a nem specifikus kötődés különbségeként határozható meg, ábrázolni kell a receptor névleges koncentrációja függvényében. A receptort abban a névleges koncentrációban kell használni a telítési és a kompetitív kötési kísérletek során, amelynél a specifikus kötődési értékei megegyeznek a hozzáadott radioaktívan jelölt ösztradiol kötési értékeinek 40 %-ával. A humán ösztrogénreceptor 0,2 nM-es végső koncentrációja többnyire eleget tesz ennek a feltételnek.

13. Amennyiben a 40 %-os feltétel több próbálkozás után sem teljesül, ellenőrizni kell, hogy nincsenek-e potenciális hibák a kísérlet elrendezésében. A 40 %-os feltétel nem teljesülése jelezheti azt is, hogy a rekombináns tételben nagyon csekély az aktív receptorok száma, ilyen esetben fontolóra kell venni másik receptortétel alkalmazását.

Telítési vizsgálat

14. A [^{3}H]17β-ösztradiolt kell kiértékelni nyolc növekvő koncentrációban, három ismétlésben, az alábbi három kitétellel (lásd a 2. táblázatot):

a. Nem jelölt 17β-ösztradiol nélkül és ösztrogénreceptorral. Ez alapján határozható meg a teljes kötődés a csak [^{3}H]17β-ösztradiolt tartalmazó lyukakban mért radioaktivitás alapján.

b. A jelölt 17β-ösztradiolhoz képest 2000-szeres koncentrációjú nem jelölt 17β-ösztradiol jelenlétében és ösztrogénreceptorral. Ez az állapot arra szolgál, hogy az aktív kötőhelyek telítődjenek nem jelölt 17β-ösztradiollal, így a lyukakban mért radioaktivitás alapján meghatározható a nem specifikus kötődés. A fennmaradó, receptorhoz kötődő radioaktív ösztrogének feltételezhetően nem specifikus helyre kötődőnek, mivel a nem jelölt ösztrogének olyan magas koncentrációban vannak jelen, hogy elfoglalják a receptor valamennyi szabad specifikus kötőhelyét.

c. Nem jelölt 17β-ösztradiol és ösztrogénreceptor nélkül (így meghatározható a teljes radioaktivitás).

A [^{3}H]-17β-ösztradiol és a nem jelölt 17β-ösztradiol oldatainak és a humán ösztrogénreceptor α-nak az elkészítése

15. A [^{3}H]-17β-ösztradiolból 40 nM koncentrációjú oldatot kell készíteni 1 μM [^{3}H]-17β-ösztradiol törzsoldatból DMSO-ban, úgy, hogy DMSO-t adunk hozzá (200 nM oldatot készítünk), majd szobahőmérsékleten a vizsgálati puffer hozzáadásával elkészítjük a 40 nM koncentrációjú oldatot. Ezzel a 40 nM koncentrációjú oldattal és a vizsgálati pufferrel szobahőmérsékleten el kell elkészíteni a [^{3}H]-17β-ösztradiol 0,313 nM-től 40 nM-ig terjedő oldatsorozatát (a 2. táblázat 12. sávja alapján). A 0,0313 és 4,0 nM közötti végső vizsgálati koncentrációtartományt úgy kapjuk meg, hogy ezekből az oldatokból 10 μl mennyiséget teszünk egy 96 lyukú mikrotiterlemez megfelelő vizsgálati lyukába (lásd a 2. és 3. táblázatot). A vizsgálati puffer elkészítését, a [^{3}H]-17β-ösztradiol eredeti törzsoldatának az ösztradiol specifikus aktivitásán alapuló kiszámítását, az oldatok elkészítését, valamint a koncentrációértékek meghatározását részletesen ismerteti a CERI protokoll (2).

16. A nem jelölt 17β-ösztradiol oldatait a 17β-ösztradiol 1 nM koncentrációjú törzsoldatából kell elkészíteni vizsgálati puffer hozzáadásával, nyolc növekvő koncentrációból álló, 0,625 μM-től 80 μM-ig terjedő induló koncentrációsorozatot készítve. A 0,0625 és 8 μM közötti végső vizsgálati koncentrációkat úgy kapjuk meg, hogy ezekből az oldatokból 10 μl mennyiséget elhelyezünk egy 96 lyukú mikrotiterlemez nem specifikus kötődés mérésére szolgáló vizsgálati lyukaiba (lásd a 2. és 3. táblázatot). A nem jelölt 17β-ösztradiol oldatainak elkészítését részletesen ismerteti a CERI protokoll (2).

17. A receptor azon koncentrációját kell alkalmazni, amelyik 40 %-os (± 10 %) specifikus kötődést mutat (lásd a 12–13. pontot). A humán ösztrogénreceptor α oldatot jéghideg vizsgálati pufferrel kell elkészíteni közvetlenül felhasználás előtt, vagyis azt követően, hogy előkészítettük a teljes kötődést és a nem specifikus kötődést mérő, valamint a csak a radioaktív ligandumot tartalmazó lyukakat.

18. A 96 lyukú mikrotiterlemezeket a 2. táblázatban foglaltak szerint készítik el, a [^{3}H]-17β-ösztradiol egyes koncentrációértékeit 3 ismétlésben vizsgálva. A [^{3}H]-17β-ösztradiol, a nem jelölt 17β-ösztradiol, a puffer és a receptor térfogatát a 3. táblázat ismerteti.

2. táblázat

Mikrotiterlemez elrendezése a telítési kötési vizsgálathoz

	1. (*)	2. (*)	3. (*)	4. (*)	5. (*)	6. (*)	7. (*)	8. (*)	9. (*)	10	11. (**)	12. (**)
	A TB méréséhez			A NSB méréséhez			Csak a radioaktív ligandum meghatározásához				Nem jelölt E2 oldatai a lemez 4–6. oszlopához	[^{3}H]E2 oldatai a lemez 1–9. oszlopához
A	0,0313 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0313 nM [^{3}H] E2+ 0,0625 μM E2+ ER			0,0313 nM				0,625 μM	0,313 nM
B	0,0625 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0625 nM [^{3}H] E2+ 0,125 μM E2+ ER			0,0625 nM				1,25 μM	0,625 nM
C	0,125 nM [^{3}H] E2+ ER			0,125 nM [^{3}H] E2+ 0,25 μM E2+ ER			0,125 nM				2,5 μM	1,25 nM
D	0,250 nM [^{3}H] E2+ ER			0,250 nM [^{3}H] E2+ 0,5 μM E2+ ER			0,250 nM				5 μM	2,5 nM
E	0,50 nM [H] E2+ ER			0,50 nM [^{3}H] E2+ 1 μM E2+ ER			0,50 nM				10 μM	5 nM
F	1,00 nM [^{3}H] E2+ ER			1,00 nM [^{3}H] E2+ 2 μM E2+ ER			1,00 nM				20 μM	10 nM
G	2,00 nM [^{3}H] E2+ ER			2,00 nM [^{3}H] E2+ 4 μM E2+ ER			2,00 nM				40 μM	20 nM
H	4,00 nM [^{3}H] E2+ ER			4,00 nM [^{3}H] E2+ 8 μM E2+ ER			4,00 nM				80 μM	40 nM

TB- teljes kötődés
NSB- nem specifikus kötődés
[^{3}H] E2- [^{3}H]17β-ösztradiol
E2- nem jelölt 17β-ösztradiol
(*) A táblázatban feltüntetett koncentrációértékek az egyes lyukakba adagolt végső koncentrációkat jelzik.
(**) A nem jelölt E2 és a [^{3}H]E2 oldatai külön lemezen is elkészíthetők.

3. táblázat

A reagens térfogatértékei a telítési mikrotiterlemezhez

Sáv száma		1	2	3	4	5	6	7. (*)	8. (*)	9. (*)
Előkészítési folyamat lépései		TB lyukak			NSB lyukak			Csak radioaktív ligandum		
A fenti reagens lyukak összetevőinek térfogata és hozzáadási sorrendje	Puffer	60 µl			50 µl			90 µl		
	nem jelölt E2 a 2. táblázat 11. sávjából	—			10 µl			—		
	[^{3}H]E2 a 2. táblázat 12. sávjából	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			—		
Reagens összes térfogata		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubáció		**EZT KÖVETŐEN REAGENS KÉT ÓRÁS INKUBÁLÁSA**						Radioaktivitás mérése közvetlenül az elkészítés után. Nincs inkubáció.		
Kezelés 0,4 % DCC-vel		**Igen**			**Igen**			**Nem**		
A 0,4 %-os DCC térfogata		100 µl			100 µl			—		
Szűrés		Igen			Igen			Nem		
PERCENKÉNTI BOMLÁS MÉRÉSE										
A szcintillációs folyadékhoz hozzáadott mérendő térfogat		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) Amennyiben a percenkénti bomlást mikrolemezekhez való számláló berendezéssel (LSC) mérik, akkor a csak a radioaktív ligandumot tartalmazó keverék nem készíthető el a TB és a NSB mérésére használt vizsgálati lemezen. A csak a radioaktív ligandumot tartalmazó keveréket külön lemezen kell elkészíteni.

(**) Ha a DCC-t centrifugálással különítik el, akkor a lyukak DCC-vel való átszennyezésének elkerülése érdekében az 50 µl felülúszót mikrolemezekhez való számláló berendezéssel kell mérni.

19. A teljes kötődés és a nem specifikus kötődés meghatározásához használt vizsgálati mikrotiterlemezeket két órán keresztül kell inkubálni, szobahőmérsékleten (22 °C és 28 °C között).

A humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődött [^{3}H]-17β-ösztradiol mérése

20. A két órás inkubációt követően a humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődött [^{3}H]-17β-ösztradiolt el kell különíteni a szabad [^{3}H]-17β-ösztradioltól, ehhez adjunk hozzá 100 µl 0,4 %-os jéghideg DCC szuszpenziót a lyukakhoz. Ezután a lemezeket 10 percre jégre kell helyezni, majd a reakciókeverék és a DCC szuszpenzió mikrotiterlemez szűrőn való átszűrésével el kell távolítani a DCC-t. A leszűrt anyagból 100 µl mennyiséget az LSC számláló berendezés csöveibe töltött szcintillációs folyadékba tesznek, és a folyadék szcintillációs számlálóval csövenként meghatározzák a (dpms-ben mért) percenkénti bomlást.

21. Amennyiben nem áll rendelkezésre mikrolemez szűrő, a DCC eltávolítható centrifugálással is. A humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődött [^{3}H]-17β-ösztradiolt tartalmazó 50 µl felülúszót különös óvatossággal kell kivenni, nehogy a DCC-hez hozzáérve átszennyezzük a lyukakat, majd szcintillációs számlálást végzünk.

22. A radioaktív ligandumot önmagában használják a vizsgálati lyukakba adagolt [^{3}H]-17β-ösztradiol percenkénti bomlásának (dpm) mérésére. A radioaktivitás mértékét közvetlenül az elkészítés után kell számszerűsíteni. Ezeket a lyukakat nem szabad inkubálni és DCC szuszpenzióval kezelni, tartalmukat közvetlenül a szcintillációs folyadékhoz kell adagolni. Ezek a mérőszámok azt jelzik, hogy mennyi dpms-ben kifejezett [^{3}H]-17β-ösztradiolt adtunk hozzá a teljes kötődést és a nem specifikus kötődést vizsgáló lyukakhoz.

Kompetitív kötési vizsgálat

23. A kompetitív kötési vizsgálat azt méri, hogy egy állandó koncentrációjú [^{3}H]-17β-ösztradiol milyen mértékben képes kötődni az adott vizsgálati vegyi anyag növekvő koncentrációja mellett. Egy vizsgálatmeneten belül minden koncentrációt három párhuzamos ismétlésben kell vizsgálni. Emellett minden vizsgálati vegyi anyagot három nem egyidejűleg végzett vizsgálatmenetben kell tesztelni. A vizsgálatot egy vagy több 96 lyukú mikrotiterlemezen kell elvégezni.

Kontrollok

24. A vizsgálat végrehajtása során minden egyes kísérletben párhuzamosan vizsgálni kell az oldószert és a kontrollanyagokat (a referenciaösztrogént, valamint a gyengén kötődő és a nem kötődő anyagot). Minden vizsgálatmenetben ugyanazon a lemezen vizsgálni kell a referenciaösztrogén teljes koncentrációgörbéjét és a kontrollanyagokat (vagyis a gyengén kötődő és a nem kötődő anyagot). Az összes többi lemeznek tartalmaznia kell i. az E2 és a gyengén kötődő anyag magas (maximális leszorítást, vagyis a radioaktívan jelölt ligandum szinte teljes leszorítását eredményező) és közepes (körülbelül IC_{50} hatást kiváltó) koncentrációját, három ismétlésben; ii. az oldószeres kontrollt és a nem specifikus kötődés mérését, három-három ismétlésben. A vizsgálati puffer, a [^{3}H]-17β-ösztradiol, a humán ösztrogénreceptor α és a vizsgálati vegyi anyag oldatainak elkészítési eljárását részletesen ismerteti a CERI protokoll (2).

Oldószeres kontroll:

25. Az oldószeres kontroll igazolja, hogy az oldószer nem lép kölcsönhatásra a vizsgálati rendszerrel, emellett méri a teljes kötődést (TB). Az ajánlott oldószer a DMSO. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag legmagasabb koncentrációja nem oldható DMSO-ban, akkor alternatívaként etanol is használható. A végső vizsgálati lyukakba adagolt DMSO koncentrációja 2,05 % legyen, ez az érték legfeljebb 2,5 %-ra növelhető abban az esetben, ha a vizsgálati vegyi anyag az eredeti koncentrációban nem oldható. A DMSO 2,5 % fölötti koncentrációkban való használatát kerülni kell, mert az oldószer magasabb koncentrációi befolyásolhatják a vizsgálati eredményeket. A DMSO-ban nem, de etanolban oldódó vizsgálati vegyi anyagok esetében a vizsgálati eredmények befolyásolása nélkül az etanol legfeljebb 2 %-os koncentrációban alkalmazható.

Puffer kontroll:

26. A puffer kontroll (BC) nem tartalmazhatja sem az oldószert, sem a vizsgálati vegyi anyagot, csak a vizsgálat összes többi összetevőjét. A puffer kontroll eredményeit összevetik az oldószeres kontroll eredményeivel annak ellenőrzésére, hogy az alkalmazott oldószer nincs hatással a vizsgálati rendszerre.

Erősen kötődő anyag (referenciaösztrogén)

27. A 17β-ösztradiol (CAS-száma: 50-28-2) az endogén ligandum, és magas affinitással kötődik az ösztrogénreceptor alfa altípusához. Minden humán ösztrogénreceptor α kompetitív kötési vizsgálathoz nem jelölt 17β-ösztradiollal el kell készíteni egy standard görbét, amely lehetővé teszi a variabilitás értékelését, ha a laboratóriumon belül egy későbbi időpontban ismét elvégzik a vizsgálatot. A nem jelölt 17β-ösztradiolból nyolc oldatot kell készíteni DMSO-ban és vizsgálati pufferben, a standard görbe létrehozásához a végső koncentrációkat a következő elosztásban kell a vizsgálati lyukakba helyezni: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8.5}$, 10^{-9}, $10^{-9.5}$, 10^{-10}, 10^{-11} M. A nem jelölt 17β–ösztradiol legmagasabb koncentrációja (1 μM) egyben a nem specifikus kötődést is jelzi. Ezt a koncentrációt a 4. táblázatban az „NSB” rövidítés különbözteti meg, bár ez is részét képezi a standard görbének.

Gyengén kötődő anyag

28. A vizsgálatba bele kell foglalni egy gyengén kötődő anyagot (a noretinodrel t (CAS-száma: 68-23-5) vagy alternatívaként a noretindront (CAS-száma: 68-22-4)), hogy igazolja az egyes kísérletek érzékenységét, és lehetővé tegye a variabilitás értékelését, ha a vizsgálat egy későbbi időpontban megismétlik. A gyengén kötődő anyagból nyolc oldatot kell készíteni DMSO-ban és vizsgálati pufferben, az anyagot a vizsgálati lyukakba a következő végső koncentrációkban kell elhelyezni: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6}, $10^{-6,5}$, 10^{-7}, $10^{-7,5}$, 10^{-8} és 10^{-9} M.

Nem kötődő anyag

29. Negatív (nem kötődő) kontrollanyagként oktil-trietoxi-szilánt (OTES, CAS-száma: 2943-75-1) kell alkalmazni. Biztosítja azt, hogy a vizsgálat végrehajtása során detektálni lehessen a humán ösztrogénreceptor α-hoz nem kötődő vizsgálati vegyi anyagokat. A nem kötődő anyagból nyolc oldatot kell készíteni DMSO-ban és vizsgálati pufferben, az anyagot a vizsgálati lyukakba a következő végső koncentrációkban kell elhelyezni: 10^{-3},10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10} M. Alternatív nem kötődő anyagként di-n-butil-ftalát (DBP, CAS-száma: 84-72-2) használható, ezt az anyagot azonban csak 10^{-4} M koncentrációig tesztelték. A DBP-ról kimutatták, hogy a vizsgálat során a maximális oldható koncentrációja a 10^{-4} M.

A humán ösztrogénreceptor α koncentrációja

30. A receptort abban a mennyiségben kell alkalmazni, amelyik 40 %-os (± 10 %) specifikus kötődést vált ki (lásd a 3. függelék 12–13. pontját). A humán ösztrogénreceptor α oldatot közvetlenül használat előtt kell elkészíteni a funkcionális humán ösztrogénreceptor α jéghideg vizsgálati pufferben való hígításával.

[^{3}H]-17β-ösztradiol

31. A [^{3}H]-17β-ösztradiolt 0,5 nM végső koncentrációban kell a vizsgálati lyukakba helyezni.

Vizsgálati vegyi anyagok

32. Első lépésként oldhatósági vizsgálatot kell végezni az egyes vizsgálati vegyi anyagok oldhatósági határértékének meghatározására, valamint a vizsgálati protokoll végrehajtása során alkalmazandó megfelelő koncentrációtartomány megállapítására. A vizsgálati vegyi anyagok oldhatósági határértékét először oldószerben kell meghatározni, majd a vizsgálati körülmények mellett meg kell erősíteni. A vizsgálatban tesztelt végső koncentrációjuk nem haladhatja meg az 1 mM-t. A koncentrációtartomány-behatároló vizsgálat magában foglal egy oldószeres kontrollt és a legmagasabb elfogadható koncentrációtól (pl. 1 mM, illetve az oldhatósági határértéktől függően ennél alacsonyabb koncentrációtól) induló, legalább 8 koncentrációból álló logaritmikus hígítási sorozatot, az esetlegesen tapasztalt zavarosságot vagy kicsapódást fel kell jegyezni (lásd még a 3. függelék 35. pontját). Miután meghatározták a vizsgálat során alkalmazandó koncentrációtartományt, a vizsgálati vegyi anyagokat 8 logaritmikus koncentrációban kell tesztelni, a koncentrációtartomány behatárolására szolgáló előzetes vizsgálatban meghatározott eloszlás szerint. A második és a harmadik kísérlet koncentrációértékeit szükség esetén úgy kell kiigazítani, hogy egy jobb koncentráció-válasz görbét adjanak.

33. A vizsgálati vegyi anyag oldatait megfelelő oldószerben kell elkészíteni (lásd a 3. függelék 25. pontját). Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag legmagasabb koncentrációja sem DMSO-ban, sem etanolban nem oldható, és a hozzáadott oldószer mennyiségének növelése miatt a végső vizsgálathoz használt csőben az oldószer koncentrációja túllépné az elfogadható határértéket, a legmagasabb koncentráció az eggyel alacsonyabb koncentrációra csökkenthető. Ebben az esetben hozzá lehet adni egy további koncentrációértéket a koncentrációsorozat alacsonyabb értékeket tartalmazó végéhez. A sorozat többi koncentrációértékét változatlanul kell hagyni.

34. A vizsgálati vegyi anyag mikrotiterlemezbe adagolt oldatait figyelemmel kell követni, mivel a vizsgálati vegyi anyag a vizsgálati lyukakba helyezést követően kicsapódhat. A kicsapódást tartalmazó vizsgálati lyukak adatait ki kell zárni a görbeillesztésből, és fel kell jegyezni az adatok kizárásának okát.

35. Amennyiben valamely vizsgálati vegyi anyag log(IC_{50}) értékére vonatkozólag léteznek más forrásokból származó korábbi adatok, érdemes úgy beállítani a hígítást, hogy geometriailag közelebb (pl. 0,5 log egységnyire) helyezkedjenek el a log(IC_{50}) várt értéke körül. A végső eredményeknek a log(IC_{50}) mindkét oldalán kellő távolságban eloszló koncentrációkat kell mutatniuk, beleértve a görbe tetejét és alját, hogy a kötési görbét megfelelően lehessen jellemezni.

Vizsgálati lemez elrendezése

36. A mikrotiterlemezeken fel kell címkézni a hatszoros inkubálásnak alávetett oldószeres kontrollt, a referenciaösztrogén (E2) legmagasabb koncentrációját – amely egyben a nem specifikus kötődés (NSB) mutatója –, a puffer kontrollt, a háromszor inkubált nem kötődő kontrollanyag (oktil-trietoxi-szilán) mind a nyolc koncentrációját, a referenciaösztrogén (E2) hét alacsonyabb koncentrációját, a gyengén kötődő anyag (noretinodrel vagy noretindron) nyolc koncentrációját és minden egyes vizsgálati vegyi anyag (TC) nyolc koncentrációját. Az alábbi 4. táblázat példát szolgáltat egy olyan lemezelrendezésre, amely biztosítja a referenciaösztrogén és a kontrollanyagok teljes koncentrációgörbéjét. A többi mikrotiterlemez a vizsgálati vegyi anyag mérésére szolgál, emellett tartalmazniuk kell a lemezen belüli ellenőrzésre szolgáló kontrollanyagokat, vagyis i. az E2 és a gyengén kötődő anyag magas (maximális leszorítást eredményező) és közepes (körülbelül IC_{50} hatást kiváltó) koncentrációját, három ismétlésben; ii. az oldószeres kontroll (ami a teljes kötődés mutatója) és a nem specifikus kötődés mérését, hat-hat ismétlésben (lásd az 5. táblázatot). A 3.3. függelék példát szolgáltat arra, hogy milyen lemezelrendezést lehet alkalmazni a kompetitív vizsgálatban három ismeretlen vizsgálati vegyi anyag teszteléséhez. A lemezelrendezési ábrán, valamint a 4. és az 5. táblázatban feltüntetett koncentrációértékek az egyes vizsgálati lyukakba adagolt végső koncentrációkat jelzik. Az E2 maximális koncentrációja 1×10^{-7} M legyen, a gyengén kötődő anyag legmagasabb koncentrációja pedig az 1. lemezen használt legmagasabb koncentráció legyen. Az IC_{50} koncentrációját a laboratóriumnak kell meghatároznia, a kontrollanyagok adatait tartalmazó adatbázisa alapján. Ennek az értéknek közelítenie kell a validálási tanulmányok során nyert értékhez (lásd az 1. táblázatot).

4. táblázat

A kompetitív kötési vizsgálathoz használt mikrotiterlemez azon elrendezése [1] [2], amely biztosítja a referenciaösztrogén és a kontrollanyagok teljes koncentrációgörbéjét (1. lemez)

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
	Puffer kontroll és pozitív kontroll (E2)			Enyhén pozitív (Noretinodrel)			Negatív kontroll (OTES)			TB és NSB		
A	Üres (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (oldószeres kontroll) (2,05 % DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10} M)			$1\times10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (10^{-6} M E2)		
D	E2 ($1\times10^{-9,5}$ M)			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	E2 (1×10^{-9} M)			$1\times10^{-6,5}$ M			1×10^{-6} M			Puffer kontroll		
F	E2 ($1\times10^{-8,5}$ M)			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
G	E2 (1×10^{-8} M)			$1\times10^{-5,5}$ M			1×10^{-4} M			Üres (radioaktívhoz) (**)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1\times10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

[1] Elrendezési minta minden kísérlethez alkalmazandó mikrotiterlemez standardokhoz.
[2] Ez a mikrotiterlemez-elrendezés az előző részekben ismertetett standardokhoz alkalmazandó hígítási lemezen készített oldatok alapján készült.
Ebben a példában a gyengén kötődő anyag a noretinodrel (NE).
(*) ténylegesen üres, nem használt lyuk.
(**) a lyukat nem használják az inkubáció alatt, de használják a teljes hozzáadott radioaktivitás ellenőrzésére.

5. táblázat

A kompetitív kötési vizsgálathoz használt mikrotiterlemez elrendezése, a vizsgálati vegyi anyagokhoz (TC) és a lemezen belüli ellenőrzésre szolgáló kontrollanyagokhoz használt további lemezekhez

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	1. vizsgálati vegyi anyag (TC-1)			2. vizsgálati vegyi anyag (TC-2)			3. vizsgálati vegyi anyag (TC-3)			Kontrollok		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E2 (1×10^{-7} M)		
B	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E_2 (IC_{50})		
C	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1\times10^{-4,5}$M)		
D	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC_{50})		
E	TC-1 (1×10^{-6} M)			TC-2 (1×10^{-6} M)			TC-3 (1×10^{-6} M)			NSB (10^{-6} M E2)		
F	TC-1 (1×10^{-5} M)			TC-2 (1×10^{-5} M)			TC-3 (1×10^{-5} M)					
G	TC-1 (1×10^{-4} M)			TC-2 (1×10^{-4} M)			TC-3 (1×10^{-4} M)			TB (Oldószeres kontroll)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

Ebben a példában a gyengén kötődő anyag a noretinodrel (NE).

A kompetitív kötési vizsgálat elvégzése

37. A 6. táblázatban szereplő teljes kötődést vizsgáló és üres (radioaktívhoz) lyukak kivételével minden lyukba 50 µl vizsgálati puffert kell adagolni, amelyet össze kell keverni 10 µl oldószerrel vagy referenciaösztrogénnel (E2), gyengén kötődő anyaggal, nem kötődő anyaggal, vizsgálati vegyi anyagokkal, majd 10 µl 5 nM koncentrációjú [^{3}H]-17β-ösztradiol oldattal. Ezt követően minden egyes lemezhez 30 µl jéghideg receptoroldatot kell adni, és a keveréket óvatosan össze kell keverni. Utolsó reagensként a humán ösztrogénreceptor α oldatot kell hozzáadni. A vizsgálati mikrotiterlemezeket két órán keresztül kell inkubálni, szobahőmérsékleten (22 °C és 28 °C között).

6. táblázat

A humán ösztrogénreceptor kompetitív kötési vizsgálat mikrotiterlemezeire helyezett vizsgálati összetevők térfogata

A sávok előkészítésének lépései		Nem TB lyukak	TB lyukak	Üres (radioaktívhoz)
A fenti reagens lyukak összetevőinek térfogata és hozzáadási sorrendje	Szobahőmérsékletű vizsgálati puffer	50 µl	60 µl	90 µl
	Nem jelölt E2, gyengén kötődő anyag, nem kötődő anyag, oldószer és vizsgálati vegyi anyagok (*)	10 µl	—	—
	[^{3}H]-17β-ösztradiol a végső, 0.5 nM (vagyis 5 nM) koncentráció biztosításához	10 µl	10 µl	10 µl
	hrERα a meghatározott koncentrációban (lásd a 12–13. pontot)	30 µl	30 µl	—
Teljes térfogat az egyes vizsgálati lyukakban		100 µl	100 µl	100 µl

(*) megfelelően előkészítve ahhoz, hogy az oldószer elfogadható koncentrációján belül elő lehessen állítani a végső koncentrációt.

38. Ezt követően a 3. függelék 21–23. pontjában a telítési kötési vizsgálatnál ismertetett módon minden lyukhoz hozzáadnak 100 µl jéghideg DCC szuszpenziót, hogy elkülönítsék a humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődött [^{3}H]-17β-ösztradiolt a szabad [^{3}H]-17β-ösztradioltól, majd megmérik a humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődött [^{3}H]-17β-ösztradiolok mennyiségét.

39. A G10–12 és H10–12 lyukakban (amelyeket a 4. táblázat üres (radioaktívhoz) címen jelöl) mérik a 10 µl mennyiségű [^{3}H] jelölt ösztradiol percenkénti bomlását. A 10 µl-nek megfelelő mennyiséget közvetlenül a szcintillációs folyadékhoz kell adni.

Elfogadhatósági kritériumok

Telítési kötési vizsgálat

40. A specifikus kötődési görbének a [^{3}H]-17β-ösztradiol fokozódó koncentrációban való alkalmazása miatt egy platóban kell végződnie, ami jelzi a humán ösztrogénreceptor α ligandummal való telítettségét.

41. A [^{3}H]-17β-ösztradiol 0,5 nM koncentrációjánál megfigyelt specifikus kötődésnek a minden vizsgálatmenetben hozzáadott teljes radioaktivitás mért átlagának 30–50 %-os elfogadhatósági tartományán belül kell maradnia. E tartománytól való esetenkénti kis mértékű elérés még elfogadható, de ha a vizsgálatmenetek eredménye következetesen kívül esik ezen a tartományon, illetve ha egy adott vizsgálatmenet eredménye jelentősen eltér tőle, akkor ki kell igazítani a fehérjekoncentrációt és meg kell ismételni a telítési vizsgálatot.

42. Az adatoknak egy lineáris Scatchard-plotot kell alkotniuk.

43. A nem specifikus kötődés nem lehet túlzott mértékű. A nem specifikus kötődés értéke jellemzően nem érheti el a teljes kötődés 35 %-át. Ugyanakkor a nem specifikus kötődés aránya esetenként meghaladhatja ezt a határértéket, ha a radioaktívan jelölt 17β-ösztradiol legalacsonyabb vizsgált koncentrációjánál nagyon alacsony percenkénti bomlást mérnek.

Kompetitív kötési vizsgálat

44. A nem jelölt 17β-ösztradiol növekvő koncentrációban leszorítja a [^{3}H]-17β-ösztradiolt a receptorról, és ez összhangban van az egy kötőhelyes kompetitív kötéssel.

45. A referenciaösztrogén (vagyis a 17β-ösztradiol) IC_{50} és K_d értékének nagyjából egyenlőnek kell lennie a [^{3}H]-17β-ösztradiol moláris koncentrációjával; a disszociációs állandót a telítési kötési vizsgálatban határozzák meg.

46. A teljes specifikus kötődésnek rendre a 40 ± 10 %-os elfogadhatósági tartományon belül kell maradnia, ha a vizsgálatmenetekben az egyes lyukakhoz hozzáadott összes radioaktívan jelölt anyag átlagos mért koncentrációja 0,5 nM volt. E tartománytól való esetenkénti kis mértékű elérés még elfogadható, de ha a vizsgálatmenetek eredménye következetesen kívül esik ezen a tartományon, illetve ha egy adott vizsgálatmenet eredménye jelentősen eltér ettől, akkor ki kell igazítani a fehérjekoncentrációt.

47. Az oldószer nem módosíthatja a vizsgálat érzékenységét vagy megismételhetőségét. Az oldószeres kontroll (Tb-ként jelölve) eredményeit összevetik a puffer kontroll eredményeivel annak ellenőrzésére, hogy az alkalmazott oldószer nincs hatással a vizsgálati rendszerre. Amennyiben a TB kontroll és a puffer kontroll hasonló eredményre vezet, akkor az oldószer nem befolyásolja a vizsgálatot.

48. A nem kötődő anyag maximális 10^{-3} M (OTES) vagy 10^{-4} M (DBP) koncentrációnál legfeljebb 25 % [^{3}H]-17β-ösztradiolt szoríthat le a humán ösztrogénreceptor α-ról.

49. A CERI humán ösztrogénreceptor-kötési vizsgálat validálási tanulmányából származó adatok alapján a referenciaösztrogénre és két gyengén kötődő anyagra (pl. noretinodrel , noretindron) vonatkozva teljesítménykritériumokat dolgoztak ki (2. referencia N. függeléke). A validálási tanulmányban részt vevő négy laboratórium 95 %-os konfidenciaintervallumot adott meg az átlag ± SD (n) értékéhez minden kontroll vizsgálatmenetben. 95 %-os konfidenciaintervallumot határoztak meg a görbeillesztési paraméterekre (vagyis a görbe tetejére, aljára, a Hill-meredekségre és a Log IC_{50}-re), a referenciaösztrogénre és a gyengén kötődő anyagokra, valamint a gyengén kötődő anyagok referenciaösztrogénhez viszonyított Log_{10}RBA értékére vonatkozólag. Az 1. táblázat ismerteti a görbeillesztési paraméterek várt tartományait, amelyek használhatók teljesítménykritériumként. A gyakorlatban az IC_{50} tartománya a receptor preparátum kísérleti úton meghatározott K_d értékétől és a ligandum vizsgálatban használt koncentrációjától függően kissé változó lehet.

50. A potenciális vizsgálati vegyi anyagok széles skálája, valamint potenciális affinitásuk és az eredmények (pl. teljes görbe, részleges görbe, nem illeszthető görbe) változatossága miatt a vizsgálati vegyi anyagok görbeillesztési paramétereire nézve nem dolgoztak ki teljesítménykritériumokat. Egy adott vizsgálati vegyi anyag egyes vizsgálatmeneteiből származó eredmények értékelése során azonban szakmai megítélés alapján kell dönteni. A vizsgálati vegyi anyag megfelelő koncentrációtartományát kell használni ahhoz, hogy egyértelműen meg lehessen határozni a kompetitív görbe (pl. 90–100 %-os kötődést jelző) platóját. A vizsgálati vegyi anyag különböző koncentrációin történő ismétlések eltérései közötti és a három független vizsgálatmenet közötti variabilitásnak észszerű mértéken belül kell maradnia és tudományosan védhetőnek kell lennie. Egy adott vizsgálati vegyi anyag minden vizsgálatmenetében elvégzett kontrollok eredményeinek meg kell közelíteniük a CERI vizsgálat teljesítménymutatóit, és összhangban kell lenniük minden releváns laboratórium történeti kontrolladataival.

AZ ADATOK ELEMZÉSE

Telítési kötési vizsgálat

51. Mérni kell mind a teljes, mind a nem specifikus kötődést. Ezen értékek alapján számolható ki a [^{3}H]-17β-ösztradiol növekvő koncentrációin létrejött egyensúlyi állapotokban kiváltott specifikus kötődés úgy, hogy a teljes kötődésből kivonják a nem specifikus kötődést. A specifikus kötődés és a [^{3}H]-17β-ösztradiol koncentrációi közötti függvényt ábrázoló grafikon a maximális specifikus kötődésre jellemző platóban végződik, amely azt az állapotot jelzi, amikor a humán ösztrogénreceptor α telítődött [3H]-17β-ösztradiollal. Emellett az adatok elemzése dokumentálja, hogy a [^{3}H]-17β-ösztradiol egyetlen, nagy affinitású kötőhelyhez kapcsolódik. A nem specifikus, a teljes és a specifikus kötődést egy telítési kötési görbén kell ábrázolni. Az adatokat a továbbiakban nem-lineáris regressziós analízissel kell elemezni (pl. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995), végül pedig egy Scatchard-plot grafikonon ábrázolni.

52. Az adatelemzés során kizárólag a teljes kötődési adatok alapján meg kell határozni a B_{max} és a K_d értékét, feltételezve, hogy a nem specifikus kötődés lineáris, más módszer alkalmazását indokolni kell. A legjobban illeszkedő görbét pedig robusztus regresszióval kell meghatározni, az ettől való eltérést indokolni kell. A robusztus regresszió alkalmazásának módszerét meg kell adni. Abban az esetben, ha a B_{max} és a K_d értékét a telítési kötési adatok alapján határozzák meg, mindig korrigálni kell a ligandum koncentrációjának csökkenését (például a Swillens, 1995 által leírt módszerrel).

Kompetitív kötési vizsgálat

53. A kompetitív kötési görbe a [^{3}H]-17β-ösztradiol specifikus kötődésének és a kompetítor (log_{10} egységekben feltüntetett) koncentrációjának összefüggését ábrázolja. A vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely meggátolja a [^{3}H]-17β-ösztradiol maximális specifikus kötődésének 50 %-át, az IC_{50} érték.

54. A pozitív kontrollanyagok (pl. a referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag) becsült log(IC_{50}) értékének meghatározásához egy megfelelő nem-lineáris görbeillesztő szoftvert kell használni, amely illeszteni tudja egy négyparaméteres Hill-egyenlet görbéjét (pl. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). A görbék illesztése során a görbe tetejét, alját, meredekségét jelző értékeket és a log(IC_{50}) értékét általában szabadon ábrázolják. A legjobban illeszkedő görbét robusztus regresszióval kell meghatározni, az ettől való eltérést indokolni kell. A ligandum csökkenését nem kell korrigálni. A kezdeti analízist követően minden kötési görbét ellenőrizni kell, hogy megfelelően illeszkedik-e a modellre. A gyengén kötődő anyag relatív kötési affinitását a gyengén kötődő anyag log (IC_{50}) értékének a 17β-ösztradiol log (IC_{50}) értékéhez viszonyított arányaként kell meghatározni. A pozitív kontrollok és a nem kötődő kontroll eredményeit a vizsgálat e 3. függelék 44–49. pontjában ismertetett teljesítménymutatói alapján kell értékelni.

55. Az összes vizsgálati vegyi anyag adatait lépésenként kell elemezni, biztosítva ezáltal az adatok megfelelő elemzését és a kompetitív kötési görbék helyes osztályozását. Javasolt vizsgálati anyagonként minden vizsgálat megkezdésekor egy szabványosított adatelemzést végezni, amely megegyezik a referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag kontrolljainál alkalmazott analízissel (lásd e 3. függelék 54. pontját). Az adatelemzés végeztével technikailag ellenőrizni kell a görbeillesztési paramétereket, valamint vizuálisan is ellenőrizni kell, hogy az adatok mennyire illeszkednek az egyes vizsgálatmenetek kompetitív kötési görbéjéhez. Amennyiben a technikai ellenőrzés során megfigyelhető a specifikusan kötődő [^{3}H]-17β-ösztradiol arányának koncentrációfüggő csökkenése, a vizsgálati vegyi anyagok egyes koncentrációit tartalmazó ismétlések közötti csekély eltérés és a három vizsgálatmenet görbeillesztési paramétereinek következetessége jó indikátorai annak, hogy a vizsgálatot és az adatelemzést megfelelően hajtották végre.

Az adatok értelmezése

56. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődő anyagnak minősül, ha az adatokra illeszthető kötési görbe, és a válaszgörbe legalsó pontja az adattartomány 50 %-a alatt helyezkedik el (1. ábra).

57. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, valamely vizsgálati vegyi anyag akkor tekinthető humán ösztrogénreceptor α-hoz nem kötődő anyagnak, ha:

— az adataira illeszthető kötési görbe, és az adatokra illesztett válaszgörbe legalsó pontja az adattartomány 75 %-a felett helyezkedik el, vagy

— az adataira nem illeszthető kötési görbe, és az adatok koncentrációcsoportjai közül a legalsó simítatlan átlagos kötési arány 75 % felett helyezkedik el.

58. A vizsgálati vegyi anyag válasza akkor minősül kétértelműnek, ha a fenti feltételek egyike sem teljesül (vagyis az adatokra illesztett válaszgörbe legalsó pontja 76 és 51 % között helyezkedik el).

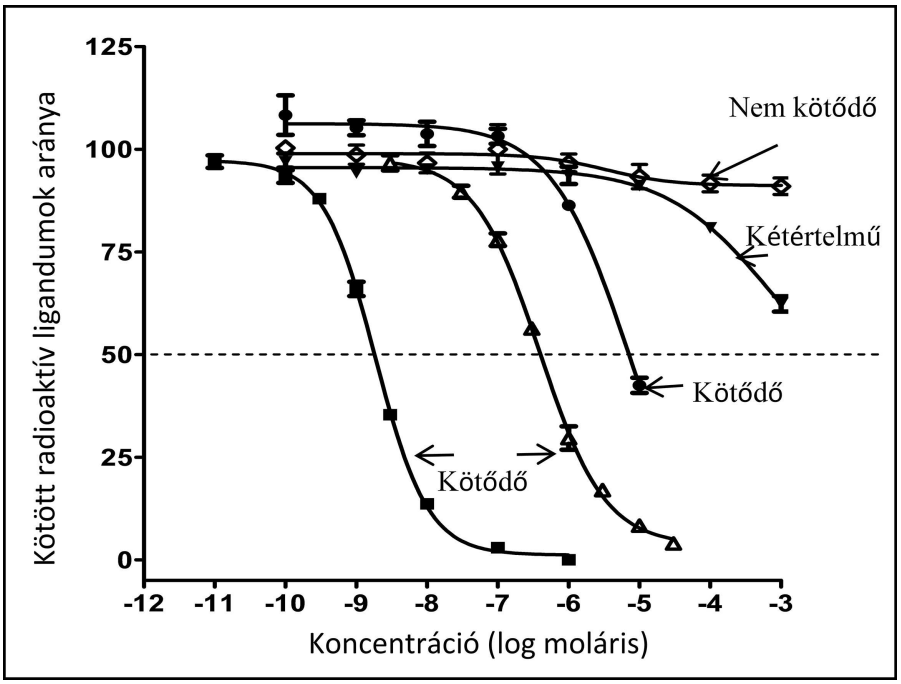
7. táblázat

A vizsgálati vegyi anyagok kompetitív kötési görbén alapuló osztályba sorolásának kritériumai

Besorolás	Kritériumok
Kötődő[a]	Az adatokra illeszthető kötési görbe. A **válaszgörbe legalsó pontja az adattartomány 50 %-a alatt helyezkedik el.**
Nem kötődő[b]	Ha az adatokra illeszthető kötési görbe, az **adattartományra illesztett válaszgörbe legalsó pontja 75 %-a felett helyezkedik el.** Ha az adatokra nem illeszthető kötési görbe, az **adatok koncentrációcsoportjai közül a legalsó simítatlan átlagos kötési arány 75 % felett helyezkedik el.**
Kétértelmű[c]	Bármely vizsgálatmenet, amelynek eredménye sem a kötődő, sem a nem kötődő kategóriába nem sorolható (pl. az adatokra illesztett válaszgörbe legalsó pontja 76 és 51 % között helyezkedik el).

1. ábra

Példák a vizsgálati vegyi anyagok kompetitív kötési görbén alapuló osztályba sorolására.



59. A vizsgálati vegyi anyag egy laboratóriumon belül elvégzett több vizsgálatmenetének eredményét összesítik úgy, hogy egy számértéket társítanak minden vizsgálatmenethez, majd meghatározzák a vizsgálatmenetek átlagát (lásd a 8. táblázatot). A laboratórium vizsgálatmeneteinek összesített eredményét azután összevetik az egyes vizsgálati vegyi anyagok várt besorolásával.

8. táblázat

Az egy laboratóriumon belül több vizsgálatmenetben vizsgálati vegyi anyagok osztályba sorolásának módszere,

Számérték társítása az egyes vizsgálatmenetekhez:	
Besorolás	**Számérték**
Kötődő	2
Kétértelmű	1
Nem kötődő	0
Besorolás a vizsgálatmenetek átlagos számértéke alapján:	
Besorolás	**Számérték**
Kötődő	Átlag ≥ 1,5
Kétértelmű	0,5 ≤ Átlag < 1,5
Nem kötődő	Átlag < 0,5

VIZSGÁLATI JELENTÉS

60. Lásd a vizsgálati módszer „A humán ÖSZTROGÉNRECEPTOR-KÖTÉSI VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” részének 24. pontját.

3.1. függelék

Szakkifejezések Listája

[^{3}H]E2: radioaktív tríciummal jelölt 17β-ösztradiol.

DCC: dextránbevonatú aktívszén.

E2: nem jelölt 17β-ösztradiol (semleges).

Vizsgálati puffer: 10 mM trisz-HCl (pH-értéke 7,4), amely a következőket tartalmazza: 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO3, 10 % glicerin, 0,2 mM leupeptin, 1 mM ditiotreitol és 10 mg/ml szarvasmarha szérum albumin.

hrERα: humán rekombináns ösztrogénreceptor alfa (ligandumkötő domén).

Ismétlés: egyike azon lyukaknak, amelyek azonos mintát tartalmaznak azonos koncentrációban, és vizsgálatuk egy adott vizsgálatmeneten belül, párhuzamosan zajlik. E protokoll keretén belül a vizsgálati vegyi anyagok minden koncentrációját három ismétlésben tesztelik; vagyis a vizsgálati vegyi anyagok minden koncentrációját egyidejűleg három ismétlésben vizsgálják.

Vizsgálatmenet: párhuzamosan vizsgált mikrotiterlemez minden mintája, amely minden szükséges információt biztosít a vizsgálati vegyi anyagok humán ösztrogénreceptor α-hoz való kötődésének jellemzéséhez (nevezetesen a vizsgálati lyukba adagolt összes [^{3}H]-17β-ösztradiol, a [^{3}H]-17β-ösztradiol maximális kötődése a hrERα-hoz, nem specifikus kötődés és a vizsgálati vegyi anyagok különböző koncentrációi által előidézett teljes kötődés). Egy vizsgálatmenet állhat koncentrációnként egyetlen vizsgálati lyukból is (vagyis egy ismétlésből), mivel azonban ez a protokoll három ismétlésben való tesztelést ír elő, egy vizsgálatmenet koncentrációnként három vizsgálati lyukat foglal magában. Emellett a protokoll meghatározza azt is, hogy vegyi anyagonként három független (azaz nem egyidejűleg lefolytatott) vizsgálatmenetre van szükség.

3.2. függelék

MINTÁK ELRENDEZÉSE A KOMPETITÍV KÖTÉSI VIZSGÁLATHOZ

Lemez	**Pozíció**	**Ismétlés**	**Lyuk típusa**	**Lyuk kódja**	**Koncentráció kódja**	**Kompetítor induló koncentrációja (M)**	**hrER törzs (µl)**	**Puffer térfogata (µl)**	**Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)**	**Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)**	**Végső térfogat (µl)**	**Kompetítor végső koncentrációja (M)**
Sz	A1	1	Üres	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
Sz	A2	2	Üres	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
Sz	A3	3	Üres	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
Sz	B1	1	nem jelölt E2	Sz	S1	1,00 E^{-10}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-11}
Sz	B2	2	nem jelölt E2	Sz	S1	1,00 E^{-10}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-11}
Sz	B3	3	nem jelölt E2	Sz	S1	1,00 E^{-10}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-11}
Sz	C1	1	nem jelölt E2	Sz	S2	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}
Sz	C2	2	nem jelölt E2	Sz	S2	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}
Sz	C3	3	nem jelölt E2	Sz	S2	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}
Sz	D1	1	nem jelölt E2	Sz	S3	3,16 E^{-9}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-10}
Sz	D2	2	nem jelölt E2	Sz	S3	3,16 E^{-9}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-10}

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
Sz	D3	3	nem jelölt E2	Sz	S3	3,16 E^{-9}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-10}
Sz	E1	1	nem jelölt E2	Sz	S4	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
Sz	E2	2	nem jelölt E2	Sz	S4	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
Sz	E3	3	nem jelölt E2	Sz	S4	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
Sz	F1	1	nem jelölt E2	Sz	S5	3,16 E^{-8}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-9}
Sz	F2	2	nem jelölt E2	Sz	S5	3,16 E^{-8}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-9}
Sz	F3	3	nem jelölt E2	Sz	S5	3,16 E^{-8}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-9}
Sz	G1	1	nem jelölt E2	Sz	S6	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
Sz	G2	2	nem jelölt E2	Sz	S6	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
Sz	G3	3	nem jelölt E2	Sz	S6	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
Sz	H1	1	nem jelölt E2	Sz	S7	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
Sz	H2	2	nem jelölt E2	Sz	S7	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
Sz	H3	3	nem jelölt E2	Sz	S7	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
Sz	A4	1	noretinodrel	NE	WP1	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
Sz	A5	2	noretinodrel	NE	WP1	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
Sz	A6	3	noretinodrel	NE	WP1	1,00 E^{-08}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
Sz	B4	1	noretinodrel	NE	WP2	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
Sz	B5	2	noretinodrel	NE	WP2	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
Sz	B6	3	noretinodrel	NE	WP2	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
Sz	C4	1	noretinodrel	NE	WP3	3,16 E^{-7}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-8}
Sz	C5	2	noretinodrel	NE	WP3	3,16 E^{-7}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-8}
Sz	C6	3	noretinodrel	NE	WP3	3,16 E^{-7}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-8}
Sz	D4	1	noretinodrel	NE	WP4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
Sz	D5	2	noretinodrel	NE	WP4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
Sz	D6	3	noretinodrel	NE	WP4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
Sz	E4	1	noretinodrel	NE	WP5	3,16 E^{-6}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-7}

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
Sz	E5	2	noretinodrel	NE	WP5	3,16 E^{-6}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-7}
Sz	E6	3	noretinodrel	NE	WP5	3,16 E^{-6}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-7}
Sz	F4	1	noretinodrel	NE	WP6	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
Sz	F5	2	noretinodrel	NE	WP6	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
Sz	F6	3	noretinodrel	NE	WP6	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
Sz	G4	1	noretinodrel	NE	WP7	3,16 E^{-5}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-6}
Sz	G5	2	noretinodrel	NE	WP7	3,16 E^{-5}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-6}
Sz	G6	3	noretinodrel	NE	WP7	3,16 E^{-5}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-6}
Sz	H4	1	noretinodrel	NE	WP8	3,16 E^{-4}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-5}
Sz	H5	2	noretinodrel	NE	WP8	3,16 E^{-4}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-5}
Sz	H6	3	noretinodrel	NE	WP8	3,16 E^{-4}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-5}
Sz	A7	1	OTES	N	OTES1	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
Sz	A8	2	OTES	N	OTES1	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}
Sz	A9	3	OTES	N	OTES1	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}
Sz	B7	1	OTES	N	OTES2	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
Sz	B8	2	OTES	N	OTES2	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
Sz	B9	3	OTES	N	OTES2	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
Sz	C7	1	OTES	N	OTES3	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
Sz	C8	2	OTES	N	OTES3	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
Sz	C9	3	OTES	N	OTES3	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
Sz	D7	1	OTES	N	OTES4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
Sz	D8	2	OTES	N	OTES4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
Sz	D9	3	OTES	N	OTES4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
Sz	E7	1	OTES	N	OTES5	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
Sz	E8	2	OTES	N	OTES5	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
Sz	E9	3	OTES	N	OTES5	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
Sz	F7	1	OTES	N	OTES6	1,00 E^{-4}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-5}
Sz	F8	2	OTES	N	OTES6	1,00 E^{-4}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-5}
Sz	F9	3	OTES	N	OTES6	1,00 E^{-4}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-5}
Sz	G7	1	OTES	N	OTES7	1,00 E^{-3}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-4}
Sz	G8	2	OTES	N	OTES7	1,00 E^{-3}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-4}
Sz	G9	3	OTES	N	OTES7	1,00 E^{-3}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-4}
Sz	H7	1	OTES	N	OTES8-DBP7	1,00 E^{-2}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-3}
Sz	H8	2	OTES	N	OTES88	1,00 E^{-2}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-3}
Sz	H9	3	OTES	N	OTES8	1,00 E^{-2}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-3}
Sz	A10	1	teljes kötődés	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
Sz	A11	2	teljes kötődés	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
Sz	A12	3	teljes kötődés	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
Sz	B10	4	teljes kötődés	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	-

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
Sz	B11	5	teljes kötődés	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
Sz	B12	6	teljes kötődés	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—
Sz	C10	1	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S1	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
Sz	C11	2	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S2	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
Sz	C12	3	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S3	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
Sz	D10	4	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S4	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
Sz	D11	5	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S5	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
Sz	D12	6	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S6	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
Sz	E10	1	Puffer kontroll	BC	BC1	—	—	100	—	—	100	—
Sz	E11	2	Puffer kontroll	BC	BC2	—	—	100	—	—	100	—
Sz	E12	3	Puffer kontroll	BC	BC3	—	—	100	—	—	100	—
Sz	F10	4	Puffer kontroll	BC	BC4	—	—	100	—	—	100	—
Sz	F11	5	Puffer kontroll	BC	BC5	—	—	100	—	—	100	—
Sz	F12	6	Puffer kontroll	BC	BC6	—	—	100	—	—	100	—
Sz	G10 (*)	1	Üres (radioaktív-hoz)	Radi-oaktív	H1	—	90	—	10	—	100	-

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
Sz	G11 (*)	2	Üres (radioaktív-hoz)	Radi-oaktív	H2	—	90	—	10	—	100	—
Sz	G12 (*)	3	Üres (radioaktív-hoz)	Radi-oaktív	H3	—	90	—	10	—	100	—
Sz	H10 (*)	4	Üres (radioaktív-hoz)	Radi-oaktív	H4	—	90	—	10	—	100	—
Sz	H11 (*)	5	Üres (radioaktív-hoz)	Radi-oaktív	H5	—	90	—	10	—	100	—
Sz	H12	6	Üres (radioaktív-hoz)	Radi-oaktív	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	1. ismeretlen	U1	1	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}
P1	A2	2	1. ismeretlen	U1	1	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}
P1	A3	3	1. ismeretlen	U1	1	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}
P1	B1	1	1. ismeretlen	U1	2	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
P1	B2	2	1. ismeretlen	U1	2	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
P1	B3	3	1. ismeretlen	U1	2	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
P1	C1	1	1. ismeretlen	U1	3	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
P1	C2	2	1. ismeretlen	U1	3	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
P1	C3	3	1. ismeretlen	U1	3	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
P1	D1	1	1. ismeretlen	U1	4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
P1	D2	2	1. ismeretlen	U1	4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
P1	D3	3	1. ismeretlen	U1	4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
P1	E1	1	1. ismeretlen	U1	5	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
P1	E2	2	1. ismeretlen	U1	5	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
P1	E3	3	1. ismeretlen	U1	5	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
P1	F1	1	1. ismeretlen	U1	6	1,00 E^{-4}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-5}
P1	F2	2	1. ismeretlen	U1	6	1,00 E^{-4}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-5}
P1	F3	3	1. ismeretlen	U1	6	1,00 E^{-4}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-5}
P1	G1	1	1. ismeretlen	U1	7	1,00 E^{-3}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-4}
P1	G2	2	1. ismeretlen	U1	7	1,00 E^{-3}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-4}
P1	G3	3	1. ismeretlen	U1	7	1,00 E^{-3}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-4}
P1	H1	1	1. ismeretlen	U1	8	1,00 E^{-2}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-3}
P1	H2	2	1. ismeretlen	U1	8	1,00 E^{-2}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-3}

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
P1	H3	3	1. ismeretlen	U1	8	1,00 E^{-2}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-3}
P1	A4	1	2. ismeretlen	U2	1	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}
P1	A5	2	2. ismeretlen	U2	1	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}
P1	A6	3	2. ismeretlen	U2	1	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}
P1	B4	1	2. ismeretlen	U2	2	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
P1	B5	2	2. ismeretlen	U2	2	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
P1	B6	3	2. ismeretlen	U2	2	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
P1	C4	1	2. ismeretlen	U2	3	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
P1	C5	2	2. ismeretlen	U2	3	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
P1	C6	3	2. ismeretlen	U2	3	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
P1	D4	1	2. ismeretlen	U2	4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
P1	D5	2	2. ismeretlen	U2	4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
P1	D6	3	2. ismeretlen	U2	4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
P1	E4	1	2. ismeretlen	U2	5	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
P1	E5	2	2. ismeretlen	U2	5	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
P1	E6	3	2. ismeretlen	U2	5	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
P1	F4	1	2. ismeretlen	U2	6	1,00 E^{-4}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-5}
P1	F5	2	2. ismeretlen	U2	6	1,00 E^{-4}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-5}
P1	F6	3	2. ismeretlen	U2	6	1,00 E^{-4}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-5}
P1	G4	1	2. ismeretlen	U2	7	1,00 E^{-3}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-4}
P1	G5	2	2. ismeretlen	U2	7	1,00 E^{-3}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-4}
P1	G6	3	2. ismeretlen	U2	7	1,00 E^{-3}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-4}
P1	H4	1	2. ismeretlen	U2	8	1,00 E^{-2}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-3}
P1	H5	2	2. ismeretlen	U2	8	1,00 E^{-2}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-3}
P1	H6	3	2. ismeretlen	U2	8	1,00 E^{-2}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-3}
P1	A7	1	3. ismeretlen	U3	1	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}
P1	A8	2	3. ismeretlen	U3	1	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}
P1	A9	3	3. ismeretlen	U3	1	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
P1	B7	1	3. ismeretlen	U3	2	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
P1	B8	2	3. ismeretlen	U3	2	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
P1	B9	3	3. ismeretlen	U3	2	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
P1	C7	1	3. ismeretlen	U3	3	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
P1	C8	2	3. ismeretlen	U3	3	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
P1	C9	3	3. ismeretlen	U3	3	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
P1	D7	1	3. ismeretlen	U3	4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
P1	D8	2	3. ismeretlen	U3	4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
P1	D9	3	3. ismeretlen	U3	4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
P1	E7	1	3. ismeretlen	U3	5	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
P1	E8	2	3. ismeretlen	U3	5	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
P1	E9	3	3. ismeretlen	U3	5	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
P1	F7	1	3. ismeretlen	U3	6	1,00 E^{-4}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-5}
P1	F8	2	3. ismeretlen	U3	6	1,00 E^{-4}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-5}

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
P1	F9	3	3. ismeretlen	U3	6	1,00 E^{-4}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-5}
P1	G7	1	3. ismeretlen	U3	7	1,00 E^{-3}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-4}
P1	G8	2	3. ismeretlen	U3	7	1,00 E^{-3}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-4}
P1	G9	3	3. ismeretlen	U3	7	1,00 E^{-3}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-4}
P1	H7	1	3. ismeretlen	U3	8	1,00 E^{-2}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-3}
P1	H8	2	3. ismeretlen	U3	8	1,00 E^{-2}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-3}
P1	H9	3	3. ismeretlen	U3	8	1,00 E^{-2}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-3}
P1	A10	1	E2 kontroll (max)	Sz	$E2_{max}1$	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,00 E^{-7}
P1	A11	2	E2 kontroll (max)	Sz	$E2_{max}$ 2	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,00 E^{-7}
P1	A12	3	E2 kontroll (max)	Sz	$E2_{max}$ 3	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,00 E^{-7}
P1	B10	1	E2 kontroll (IC_{50})	Sz	$E2IC_{50}1$	$E2IC_{50}$x1-0	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$
P1	B11	2	E2 kontroll (IC_{50})	Sz	$E2IC_{50}2$	$E2IC_{50}$x1-0	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$
P1	B12	3	E2 kontroll (IC_{50})	Sz	$E2IC_{50}3$	$E2IC_{50}$x1-0	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
P1	C10	1	NE kontroll (max)	Sz	Ne_{max} 1	1,00 $E^{-3,5}$	30	50	10	10	100	1,00 $E^{-4,5}$
P1	C11	2	NE kontroll (max)	Sz	Ne_{max} 2	1,00 $E^{-3,5}$	30	50	10	10	100	1,00 $E^{-4,5}$
P1	C12	3	NE kontroll (max)	Sz	Ne_{max} 3	1,00 $E^{-3,5}$	30	50	10	10	100	1,00 $E^{-4,5}$
P1	D10	1	NE kontroll (IC_{50})	Sz	$NEIC_{50}$1	$NEIC_{50}$ x10	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	D11	2	NE kontroll (IC_{50})	Sz	$NEIC_{50}$2	$NEIC_{50}$ x10	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	D12	3	NE kontroll (IC_{50})	Sz	$NEIC_{50}$3	$NEIC_{50}$ x10	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	E10	1	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S1	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
P1	E11	2	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S2	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
P1	E12	3	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S3	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
P1	F10	4	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S4	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
P1	F11	5	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S5	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
P1	F12	6	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S6	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
P1	G10	1	teljes kötődés	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	teljes kötődés	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	teljes kötődés	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
P1	H10	4	teljes kötődés	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	teljes kötődés	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	teljes kötődés	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	-

(*) A „radioaktív” kifejezéssel jelölt lyukak az inkubálás alatt üresek. A 10 µl-t kizárólag a szcintillációs számlálás céljából adják hozzá a lyukakhoz.

4. függelék

A HUMÁN ÖSZTROGÉNRECEPTOR KOMPETITÍV KÖTÉSI VIZSGÁLATBÓL NYERT ADATOK ELEMZÉSÉNEK SZEMPONTJAI

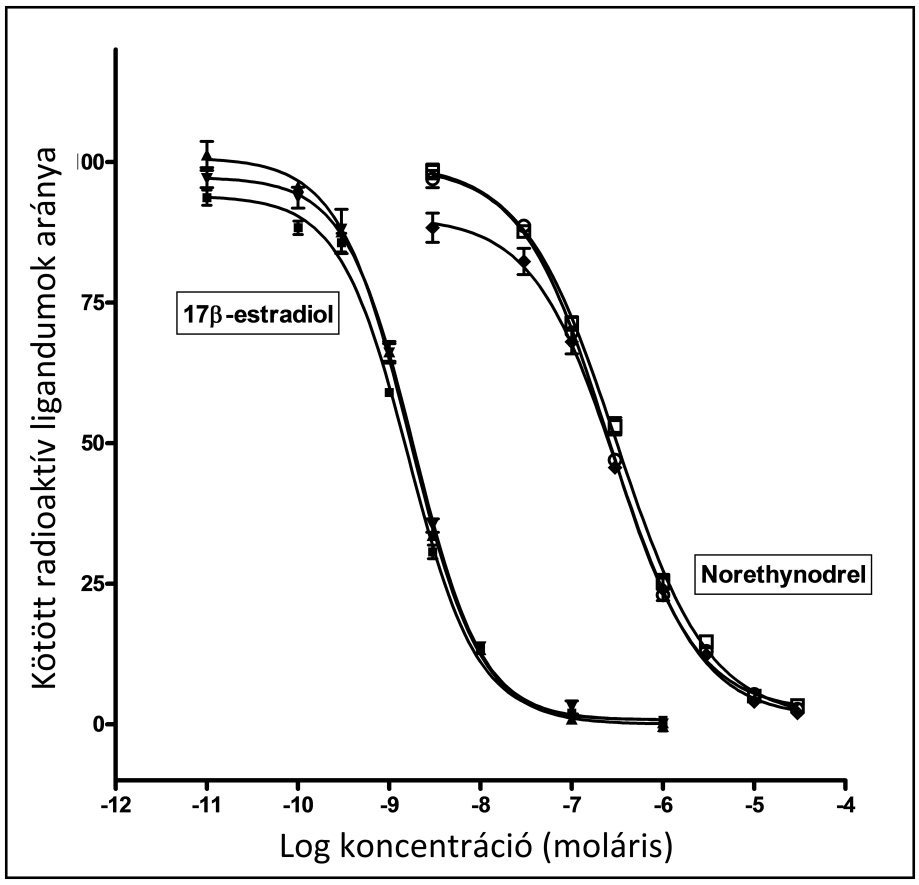
1. A humán ösztrogénreceptor α kompetitív kötési vizsgálat azt méri, hogy milyen mértékben képes egy állandó koncentrációban alkalmazott [^{3}H]-17β-ösztradiol kötődni egy adott vizsgálati vegyi anyag növekvő koncentrációjának jelenlétében. A kompetitív kötési görbe a [^{3}H]-17β-ösztradiol specifikus kötődésének és a kompetítor ($\log_{10}$ egységekben feltüntetett) koncentrációjának összefüggését ábrázolja. A vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely meggátolja a [^{3}H]-17β-ösztradiol maximális specifikus kötődésének 50 %-át, az IC_{50}.

A referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag adatainak elemzése (1)

2. A kontroll vizsgálatmenetekből nyert adatokat (vagyis a [^{3}H]-17β-ösztradiol specifikus kötődésének arányát és a kontrollanyag logaritmikus koncentrációit) a további elemzés céljára transzformálják. A pozitív kontrollanyagok (pl. a referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag) becsült log(IC_{50}) értékének meghatározásához egy megfelelő nem-lineáris görbeillesztő szoftvert kell használni, amely meg tudja rajzolni a négyparaméteres Hill-egyenlet görbéjét (pl. BioSoft; GraphPad Prism) (2). A görbe illesztése során a görbe tetejét, alját, meredekségét jelző értékeket és a log(IC_{50}) értékét általában szabadon ábrázolják. A legjobban illeszkedő görbét robusztus regresszióval kell meghatározni, az ettől való eltérést indokolni kell. A robusztus regresszió alkalmazásának módszerét meg kell adni. A Freyberger–Wilson és a CERI humán ösztrogénreceptor vizsgálata során nem kellett korrigálni a ligandum csökkenését, de ha szükséges, fontolóra vehető a korrekció alkalmazása. A kezdeti analízist követően minden kötési görbét ellenőrizni kell, hogy megfelelően illeszkedik-e a modellre. A gyengén kötődő anyag relatív kötési affinitását a gyengén kötődő anyag log (IC_{50}) értékének a 17β-ösztradiol log (IC_{50}) értékéhez viszonyított arányaként lehet meghatározni. A pozitív kontrollok és a nem kötődő kontroll eredményeit a vizsgálati módszerben meghatározott vizsgálati teljesítménymutatók és elfogadhatósági kritériumok szerint kell értékelni (20. pont, a 2. függelék (Freyberger–Wilson vizsgálat) 41–51. pontja és a 3. függelék (CERI vizsgálat) 41–51. pontja). A referenciaösztrogén és gyengén kötődő anyag 3 vizsgálatmenetére vonatkozólag az 1. ábra hoz példákat.

1. ábra

Példák a referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag kompetitív kötési görbéire



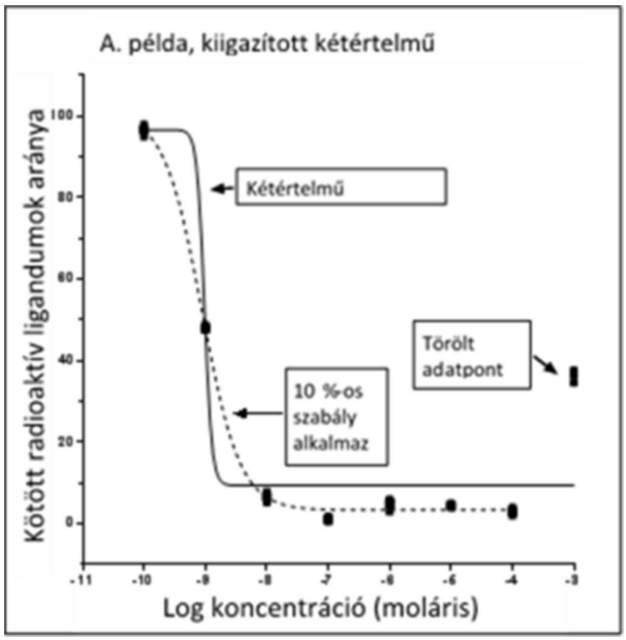
A vizsgálati vegyi anyagok adatainak elemzése

3. Az összes vizsgálati vegyi anyag adatait lépésenként kell elemezni, biztosítva ezáltal az adatok megfelelő elemzését és a kompetitív kötési görbék helyes osztályozását. Vizsgálati vegyi anyagonként minden vizsgálatmenet megkezdésekor egy szabványosított adatelemzést kell végezni, amely megegyezik a referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag kontrolljainál alkalmazott analízissel. Az adatelemzés végeztével technikailag ellenőrizni kell a görbeillesztési paramétereket, valamint vizuálisan is ellenőrizni kell, hogy az adatok mennyire illeszkednek az egyes vizsgálatmenetek kompetitív kötési görbéjéhez. Amennyiben a technikai ellenőrzés során megfigyelhető a specifikusan kötődő [^{3}H]-17β-ösztradiol arányának koncentrációfüggő csökkenése, a vegyi anyagok egyes koncentrációit tartalmazó ismétlések közötti csekély eltérés és a három vizsgálatmenet görbeillesztési paramétereinek következetessége jó indikátorai annak, hogy a vizsgálatot és az adatelemzést megfelelően hajtották végre. Egy adott vizsgálati vegyi anyag egyes vizsgálatmeneteiből származó eredmények értelmezése során szakmai megítélés alapján kell dönteni, és a vizsgálati vegyi anyagok kötődő vagy nem kötődő kategóriába sorolásához használt adatoknak tudományosan védhetőnek kell lenniük.

4. Időnként előfordulhatnak olyan adatok, amelyekre fokozottabb figyelmet kell fordítani ahhoz, hogy a humán ösztrogénreceptor-kötési adatokat megfelelően lehessen elemezni és értelmezni. Az előző tanulmányok során előálltak olyan helyzetek, amikor a kompetitív receptor kötési adatok elemzését és értelmezését megnehezítette a legmagasabb koncentrációban vizsgálati vegyi anyagok specifikus kötődési arányának megugrása (2. ábra). Ez egy jól ismert probléma, ami kompetitív receptor kötődési vizsgálatok protokolljának használatakor fordul elő (3). Ezekben az esetekben alacsonyabb koncentrációértékeknél koncentrációfüggő választ figyeltek meg, de amint a vizsgálati vegyi anyag koncentrációja megközelíti az oldhatósági határértéket, a [^{3}H]-17β-ösztradiol leszorítása már nem csökken. Ilyenkor a magasabb koncentrációk eredménye azt jelzi, hogy elérték a vizsgálat biológiai hatásának határát. Ez a jelenség gyakran kapcsolódik a vizsgálati vegyi anyag magas koncentrációknál megnyilvánuló oldhatatlanságához vagy kicsapódásához, ugyanakkor jelentheti azt is, hogy a vegyi anyag legmagasabb koncentrációinál a dextránbevonatú aktívszén az elkülönítési folyamat során már nem képes megkötni a szabad radioaktívan jelölt ligandumokat. Ha ezek az adatpontok is részt vesznek a kompetitív kötési adatok szigmoid görbére illesztésében, az esetenként az adott vizsgálati vegyi anyag receptorkötési potenciáljának helytelen kategorizálásához vezethet (2. ábra). Ennek elkerülése érdekében a Freyberger–Wilson és a CERI ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatának protokolljai biztosítják annak lehetőségét, hogy az elemzésből kizárják azokat az adatpontokat, amelyek esetében az ismétlések [3H]17β-ösztradiol specifikus kötődési arányának átlagértéke legalább 10 %-kal meghaladja a valamely alacsonyabb koncentrációnál megfigyelt átlagértéket (ez az úgynevezett 10 %-os szabály). Ezt a szabályt egy görbére egyszer lehet alkalmazni, és csak akkor, ha legalább 6 koncentráció adatai megmaradnak, hogy a görbe alapján megfelelő kategóriába lehessen sorolni a vizsgálati vegyi anyagot.

2. ábra

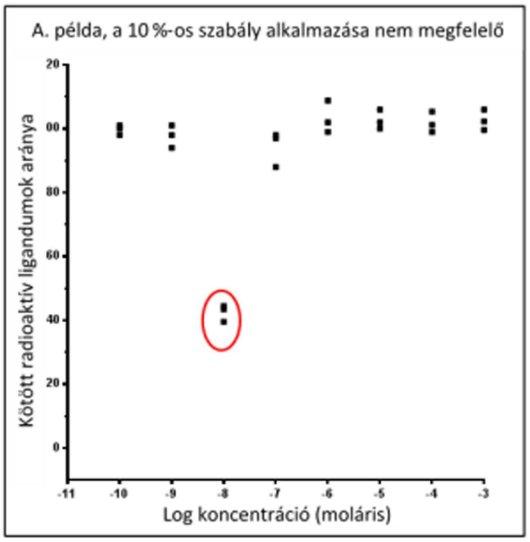
Példák a 10 %-os szabályt alkalmazó és nem alkalmazó kompetitív kötési görbékre

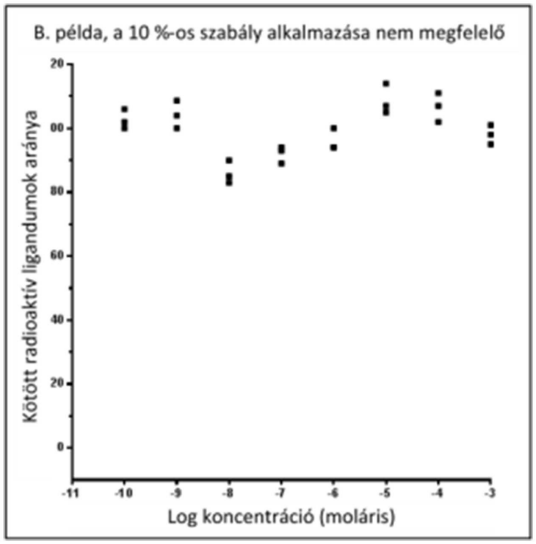


5. A görbék korrigálására szolgáló 10 %-os szabály használatát alaposan mérlegelni kell, és csak azokban az esetekben szabad alkalmazni, amikor minden jel arra utal, hogy a receptorhoz kötődő anyagról van szó. A Freyberger–Wilson humán ösztrogénreceptor-kötési vizsgálat validálási tanulmányának keretében végzett kísérletek során megfigyelték, hogy a 10 %-os szabály alkalmazása esetenként nem szándékolt és előre nem látható következményekhez vezetett. Azok a vegyi anyagok, amelyek nem lépnek kölcsönhatásba a receptorral (vagyis a valódi nem kötődő anyagok) a radioaktív ligandumok közel 100 %-os kötésénél gyakran mutattak 10 %-nál nagyobb variabilitást a vizsgált koncentrációtartományban. Ha a legalacsonyabb értéket alacsony koncentráció idézi elő, a 10 %-os szabály alkalmazásakor előfordulhat, hogy az összes magasabb koncentráció adatait törölik az elemzésből, pedig e koncentrációk adatai hasznosak lennének a vegyi anyag nem kötődőként való azonosításához. A 3. ábra olyan helyzetekre hoz példát, ahol a 10 %-os szabály alkalmazása nem megfelelő.

3. ábra

Példák olyan kompetitív kötési adatokra, amelyek esetében a 10 %-os szabály alkalmazása nem megfelelő





Hivatkozások

(1) OECD (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERa)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(2) Motulsky H. and Christopoulos A. (2003). *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, pp 187-191. Www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf

(3) Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. Toxicological Sci. 94(1):46-56.

B.71. A BŐRSZENZIBILIZÁCIÓS KÁROS KIMENETI ÚT (AOP) EGYIK KULCSFONTOSSÁGÚ ESEMÉNYÉVEL, A DENDRITIKUS SEJTEK AKTIVÁCIÓJÁVAL FOGLALKOZÓ *IN VITRO* BŐRSZENZIBILIZÁCIÓS VIZSGÁLATOK

ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

A dendritikus sejtek aktivációján mint fő eseményen alapuló vizsgálati módszer

1. A bőrszenzibilizáló anyagok a vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) által globálisan harmonizált rendszere (ENSZ-GHS) (1), valamint az Európai Unió (EU) anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendelete (CLP-rendelet) ([1]) szerint olyan anyagok, amelyek a bőrrel való érintkezést követően allergiás válaszreakciót váltanak ki. A bőrszenzibilizációt előidéző főbb biológiai eseményeket illetően általános egyetértés van. A bőrszenzibilizációhoz kapcsolódó kémiai és biológiai mechanizmusokról már rendelkezésre álló ismereteket az OECD AOP-programjának keretében kidolgozott káros kimeneti út (Adverse Outcome Pathway, AOP) (2) foglalja össze a molekuláris kiváltó eseménytől a köztes eseményeken át a káros hatásig, amely az allergiás kontakt bőrgyulladás. A bőrszenzibilizációs káros kimeneti út esetében a molekuláris kiváltó esemény (vagyis az első kulcsfontosságú esemény) az elektrofil anyagok és a bőrben lévő fehérjék nukleofil centrumai között létrejövő kovalens kötés. E káros kimeneti úton a második kulcsfontosságú esemény a keratinsejtekben következik be, többek között gyulladást okozó válaszreakciók, valamint konkrét sejtjelző útvonalakhoz, például az antioxidáns/elektrofil válaszelemtől (ARE) függő útvonalakhoz kapcsolódó génexpresszió-változások formájában. A harmadik kulcsfontosságú esemény a dendritikus sejtek (DC) aktivációja, melynek értékelése jellemzően konkrét sejtfelületi markerek, kemokinek és citokinek expressziója alapján történik. A negyedik kulcsfontosságú esemény a T-sejtek aktivációja és proliferációja, melynek közvetett értékelése az egereken alkalmazott lokális nyirokcsomó-vizsgálati módszer (LLNA) (3) keretében történik.

2. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 442E. vizsgálati iránymutatásában (2017) leírt módszerrel. A vizsgálati módszer a bőrszenzibilizációs káros kimeneti út egyik kulcsfontosságú eseményének, a dendritikus sejtek aktivációjának mechanizmusaival foglalkozó in vitro vizsgálatokat ismerteti (2). Olyan vizsgálatokat foglal magában, amelyekkel elősegíthető a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok ENSZ-GHS és CLP-rendelet szerinti megkülönböztetése.

   A vizsgálati módszer az alábbi vizsgálatokat ismerteti:

   — emberi sejtvonal aktiválási vizsgálat (h-CLAT);

   — U937 sejtvonal aktiválási vizsgálat (U-SENS™);

   — Interleukin-8 riportergén vizsgálat (IL-8 Luc vizsgálat).

3. Az e vizsgálati módszer és az annak megfelelő OECD vizsgálati iránymutatás részét képező vizsgálatok adatgenerálási eljárásaik és a mért értékek tekintetében különbözhetnek egymástól, mindazonáltal megkülönböztetés nélkül használhatók arra, hogy eleget tegyenek a bőrszenzibilizációs káros kimeneti út egyik kulcsfontosságú eseményének, a dendritikus sejtek aktivációjának vizsgálati eredményeire vonatkozó nemzeti követelményeknek, ugyanakkor előnyükre válik az adatok kölcsönös elfogadása az OECD-megállapodás szerint.

([1]) Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról, HL L 353/1., 2008.12.31.

A kulcsfontosságú eseményen alapuló vizsgálati módszer alá tartozó vizsgálatok háttere és elvei

4. A bőrszenzibilizáció vizsgálata jellemzően vizsgált állatokon történő vizsgálatot foglal magában. A tengerimalacokon alkalmazott klasszikus módszerek, vagyis a Magnusson–Kligman-féle tengerimalac-maximizációs vizsgálat (GPMT) és a Bühler-féle vizsgálat (B.6. vizsgálati módszer) (4) a bőrszenzibilizáció indukciós és kiváltási fázisával egyaránt foglalkozik. Az egereken alkalmazott vizsgálatok – a lokális nyirokcsomó-vizsgálati módszer (LLNA, B.42. vizsgálati módszer) (3) és két nem radioaktív változata, az LLNA: DA (B.50. vizsgálati módszer) (5) és az LLNA: BrdU-ELISA (B.51. vizsgálati módszer) (6) – mindegyike csak az indukciós válaszreakciót vizsgálja, és szintén elfogadottá váltak, mivel állatjólét szempontjából előnyösebbek, mint a tengerimalacon végzett vizsgálatok, és objektív mérést tesznek lehetővé a bőrszenzibilizáció indukciós fázisában.

5. Nemrégiben olyan mechanisztikus alapú in chemico és in vitro vizsgálati módszereket fogadtak el, amelyek a bőrszenzibilizációs káros kimeneti út első kulcsfontosságú eseményével (B.59. vizsgálati módszer; közvetlen peptidreaktivitási vizsgálat (7)) és második kulcsfontosságú eseményével (B.60. vizsgálati módszer; ARE-Nrf2 luciferáz alapú vizsgálati módszer (8)) foglalkoznak, és hozzájárulnak a vegyi anyagok bőrszenzibilizációs veszélyességi potenciáljának értékeléséhez.

6. A vizsgálati módszerben ismertetett vizsgálatok mennyiségileg meghatározzák a monociták és a dendritikus sejtek szenzibilizáló anyagokkal való kezelést követően beinduló aktivációs folyamata által a sejtfelületi marker(ek) (pl. CD54, CD86) expressziójában előidézett változásokat, vagy a dendritikus sejtek aktivációja által egy citokin, az IL-8 expressziójában előidézett változásokat. A bőrszenzibilizáló anyagokról kimutatták, hogy a dendritikus sejtek aktivációjában részt vevő (2) sejtmembrán markerek (pl. CD40, CD54, CD80, CD83 és CD86), gyulladást okozó citokinek (pl. az interleukin-1 béta és a tumor nekrózis faktor alfa) és számos kemokin (pl. az IL-8 (CXCL8) és a CCL3) expresszióját (9) (10) (11) (12) idézik elő.

7. Mindazonáltal, mivel a dendritikus sejtek aktivációja csupán egyike a bőrszenzibilizációs káros kimeneti út kulcsfontosságú eseményeinek (2) (13), a dendritikus sejtek aktivációjának markereit mérő vizsgálatokkal előállított információk önmagukban nem feltétlenül elegendőek ahhoz, hogy megállapítható legyen a vegyi anyagok bőrszenzibilizáló potenciálja van annak hiánya. Ezért az e vizsgálati módszerben leírt vizsgálatokkal kapott adatokat ajánlatos integrált vizsgálati és értékelési megközelítések keretében alkalmazni a bőrszenzibilizáló (ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategória) és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetésének támogatására olyan egyéb, releváns kiegészítő információkkal együtt, mint a bőrszenzibilizációs káros kimeneti út más kulcsfontosságú eseményeivel foglalkozó in vitro vizsgálatok eredményei, valamint a nem vizsgálatalapú módszerekkel, köztük a kémiai analógokból kereszthivatkozással kapott adatok (13). Közzétettek példákat az e vizsgálatokkal kapott adatok kidolgozott megközelítésekkel – vagyis az alkalmazott információforrások és az előrejelzéseket lehetővé tévő adatfeldolgozás tekintetében szabványosított megközelítésekkel – történő használatára (13), amelyek az integrált vizsgálati és értékelési megközelítések hasznos elemeként alkalmazhatók.

8. Az e vizsgálati módszerben leírt vizsgálatok nem alkalmazhatók önmagukban sem a bőrszenzibilizáló anyagoknak az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1A. és 1B. alkategóriába sorolására azon hatóságok által, amelyek alkalmazzák e két opcionális alkategóriát, sem a hatáserősség előrejelzésére a biztonsági értékeléssel kapcsolatos döntésekhez. A szabályozási kerettől függően azonban az e módszerekkel kapott pozitív eredmény önmagában is felhasználható a vegyi anyagok ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába sorolására.

9. E vizsgálati módszer esetében a „vizsgálati vegyi anyag" kifejezés a vizsgálat tárgyát képező vegyi anyagra vonatkozik ([1]), és nem a vizsgálatok egy összetevőből álló anyagok, több összetevőből álló anyagok és/vagy keverékek vizsgálatára való alkalmazhatóságához kapcsolódik. Jelenleg kevés információ áll rendelkezésre a vizsgálatok több összetevőből álló anyagokra és keverékekre való alkalmazhatóságával kapcsolatban (14) (15). Mindazonáltal a vizsgálatok technikailag alkalmazhatók több összetevőből álló anyagok és keverékek vizsgálatára. E vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt azonban meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért ([2]). Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény. Ezenfelül a több összetevőből álló anyagok vagy keverékek vizsgálata során figyelembe kell venni a citotoxikus összetevőknek a megfigyelt válaszreakciókkal való lehetséges kölcsönhatását.

([1]) 2013 júniusában az OECD együttes ülése megállapodott abban, hogy ahol csak lehetséges, az OECD új és átdolgozott vizsgálati iránymutatásaiban következetesebben alkalmazzák a „vizsgálati vegyi anyag" kifejezést a vizsgálat tárgyát képező vegyi anyagra.
([2]) Ezt a mondatot a WNT 2014. áprilisi ülése javasolta és hagyta jóvá.

SZAKIRODALOM

(1) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Elérhető a következő címen:https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Elérhető a következő címen:http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En.

(3) E melléklet B.42., Helyi nyirokcsomó-vizsgálat című fejezete.

(4) E melléklet B.6., Bőrszenzibilizáció című fejezete.

(5) E melléklet B.50., Bőrszenzibilizáció: helyi nyirokcsomó-vizsgálat: DA című fejezete.

(6) E melléklet B.51., Bőrszenzibilizáció: helyi nyirokcsomó-vizsgálat: BrdU-ELISA című fejezete.

(7) E melléklet B.59., In chemico bőrszenzibilizáció: közvetlen peptid reaktivitás vizsgálat (DPRA) című fejezete.

(8) E melléklet B.60., *In Vitro* bőrszenzibilizáció: ARE-Nrf2 luciferáz alapú vizsgálati módszer című fejezete.

(9) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol 9:271-96.

(10) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. J Exp Med 180:1841-7.

(11) Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. Eur J Immunol 27:3031-8.

(12) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl2 and DNCB. J Invest Dermatol 120:390-8.

(13) OECD (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen:https://community.oecd.org/community/iatass.

(14) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, 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.

(15) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

1. függelék

IN VITRO BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ: EMBERI SEJTVONAL AKTIVÁLÁSI VIZSGÁLAT (H-CLAT)

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

1. A h-CLAT mennyiségileg meghatározza a THP-1 humán monocita leukémia sejtvonal monocitáinak és dendritikus sejtjeinek a szenzibilizáló anyagokkal való kezelést követően beinduló aktivációs folyamata által a sejtfelületi marker(ek) (CD86 és CD54) expressziójában előidézett változásokat (1) (2). Ezt követően a CD86 és a CD54 sejtfelületi marker mért expressziós szintjét a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetésének alátámasztására használják fel.

2. A h-CLAT-ot az Állatkísérletek Alternatíváinak Uniós Referencialaboratóriuma (EURL ECVAM) által koordinált validálási vizsgálatban értékelték, az EURL ECVAM tudományos tanácsadó bizottsága (ESAC) pedig független szakértői értékelésnek vetette alá. A rendelkezésre álló bizonyítékok, valamint a szabályozó hatóságok és az érdekeltek álláspontja alapján az EURL ECVAM a h-CLAT-ot integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében történő alkalmazásra ajánlotta (3) a veszélyességi osztályozás és címkézés céljából a bőrszenzibilizáló és nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetésének alátámasztására. A h-CLAT-ból származó adatok és más információk együttes használatára fellelhetők példák a szakirodalomban (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

3. A h-CLAT-ról bebizonyosodott, hogy áthelyezhető a sejttenyésztési technikák és az áramlási citometriás elemzés terén tapasztalattal rendelkező laboratóriumokba. A vizsgálattól várható előrejelzések reprodukálhatóságának mértéke a laboratóriumokon belül és között mintegy 80 % (3) (12). A validálási vizsgálatban (13) és más közzétett tanulmányokban (14) kapott eredmények összességében azt jelzik, hogy a hCLAT a bőrszenzibilizáló (azaz az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozó) anyagokat az LLNA vizsgálati módszer eredményeihez képest 85 %-os (N=142) pontossággal különbözteti meg a nem szenzibilizáló anyagoktól, 93 % az érzékenysége (94/101), a specifikussága pedig 66 % (27/41) (az EURL ECVAM által végzett ismételt elemzés alapján (12), amely figyelembe vette az összes rendelkezésre álló adatot, ugyanakkor a 4. pontban leírtak szerint figyelmen kívül hagyta a 3,5-nél nagyobb Log Kow értékkel rendelkező vegyi anyagok negatív eredményét). A h-CLAT nagyobb valószínűséggel vezet hamis negatív előrejelzésekhez olyan vegyi anyagoknál, amelyeknek alacsonytól mérsékeltig terjedő a szenzibilizáló hatása (azaz az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1B. alkategóriába tartozó anyagoknál), mint a rendkívül bőrszenzibilizáló hatást mutató vegyi anyagoknál (azaz az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1A. alkategóriába tartozó anyagoknál) (4) (13) (15). Ezek az információk összességében azt jelzik, hogy a h-CLAT módszer érdemben hozzájárul a bőrszenzibilizáció veszélyeinek azonosításához. A h-CLAT mint önálló vizsgálat esetében itt megadott pontossági értékek azonban csak irányadóak, ugyanis a vizsgálatot az integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében más információforrásokkal együtt és az Általános bevezetés 7. és 8. pontjának rendelkezéseivel összhangban kell figyelembe venni. Ezen túlmenően a bőrszenzibilizáció nem állatokon alkalmazott módszereinek értékelésekor nem szabad megfeledkezni arról, hogy az LLNA vizsgálat, valamint más állatkísérletek nem feltétlenül tükrözik teljes egészében az embernél fennálló helyzetet.

4. Az aktuálisan rendelkezésre álló adatok alapján a h-CLAT módszerről bebizonyosodott, hogy különféle szerves funkciós csoportokat, reakciómechanizmusokat, (in vivo vizsgálatok során meghatározott) bőrszenzibilizáló hatásokat és fizikai-kémiai tulajdonságokat képviselő vizsgálati vegyi anyagokra alkalmazható (3) (14) (15). A h-CLAT módszer olyan vizsgálati vegyi anyagokra alkalmazandó, amelyek megfelelő oldószerben/vivőanyagban (lásd a 14. pontot) oldhatók, vagy azokkal stabil diszperziót alkotnak (azaz olyan kolloidot vagy szuszpenziót, amelyben a vizsgálati vegyi anyag nem ülepedik le, illetve nem válik szét az oldószertől/vivőanyagtól különböző fázisokra). A 3,5-nél magasabb log Kow értékkel rendelkező vizsgálati vegyi anyagok általában hamis negatív eredményre vezetnek (14). Ezért a 3,5-nél magasabb log Kow értékkel rendelkező vizsgálati vegyi anyagok negatív eredményét figyelmen kívül kell hagyni. Ugyanakkor a 3,5-nél magasabb log Kow értékkel rendelkező vizsgálati vegyi anyagok pozitív eredménye még felhasználható a vizsgálati vegyi anyag bőrszenzibilizáló anyagként való azonosításának alátámasztására. Ezen túlmenően az alkalmazott sejtvonal korlátozott metabolikus képessége (16) és a kísérleti körülmények miatt különösen a pro-haptének (azaz például a P450 enzim közreműködésével enzimatikus aktivációt igénylő anyagok) és a lassú oxidációs rátájú pre-haptének (azaz az oxidációval aktiválódó anyagok) is negatív eredményre vezethetnek a h-CLAT vizsgálatban (15). A h-CLAT vizsgálat alkalmas fluoreszcens vizsgálati vegyi anyagok értékelésére (17); mindazonáltal azok az erősen fluoreszcens vizsgálati vegyi anyagok, amelyek a fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC), illetve a propídium-jodiddal (PI) azonos hullámhosszon bocsátják ki a fényt, zavarják az áramlási citometriás észlelést, ezért FITC-vel összekapcsolt ellenanyagok, illetve propídium-jodid használatával nem értékelhetők megfelelően. Ilyen esetben használhatók más fluorokrómmal jelzett ellenanyagok vagy más citotoxikus markerek, ha például az 1.2. függelékben szereplő jártassági tesztanyagok vizsgálata révén bizonyítást nyer, hogy a FITC-vel jelzett ellenanyagokhoz (lásd a 24. pontot) vagy a propídium-jodidhoz (lásd a 18. pontot) hasonló eredményt biztosítanak. A fentiek fényében: a negatív eredményeket a közölt korlátokra tekintettel és az integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretébe tartozó egyéb információforrásokkal együtt kell értelmezni. Olyan esetekben, amikor bizonyítékkal igazolható, hogy a h-CLAT módszer nem alkalmazható más, konkrét vegyianyag-kategóriákra, a módszert nem szabad e vegyianyag-kategóriákra alkalmazni.

5. A fentieknek megfelelően a h-CLAT módszer elősegíti a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetését. Hozzájárulhat azonban a szenzibilizáló hatás erősségének értékeléséhez is (4) (5) (9), ha az integrált vizsgálati és értékelési megközelítéshez hasonló integrált megközelítések keretében alkalmazzák. Lehetőleg humán adatokon alapuló további munkára van azonban szükség annak meghatározásához, hogy a h-CLAT eredményei hogyan járulhatnak hozzá a hatáserősség vizsgálatához.

6. A fogalommeghatározások az 1.1. függelékben találhatók.

A VIZSGÁLAT ELVE

7. A h-CLAT módszer egy in vitro vizsgálat, amely mennyiségileg meghatározza a THP-1 humán monocita leukémia sejtvonal sejtjein kifejeződő sejtfelületi markerek (CD86 és CD54) expressziójában a vizsgálati vegyi anyaggal való 24 órás kezelés révén bekövetkező változásokat. Ezek a sejtfelszíni molekulák a monocita THP-1 aktiváció jellegzetes markerei, és képesek imitálni a dendritikus sejtek aktivációját, ami kulcsszerepet játszik a T-sejtek aktiválásában. A sejtfelületi markerek expressziójának változásait áramlási citometriával mérik, miután a sejteket megfestették fluorokrómmal jelzett ellenanyagokkal. Ezzel egyidejűleg citotoxicitási méréseket is végeznek annak felméréséhez, hogy a citotoxikus koncentrációknál alacsonyabb koncentráció mellett fokozódik-e a felületi markerek expressziója. Meghatározzák a felületi markerek oldószeres/vivőanyagos kontrollhoz viszonyított relatív fluoreszcencia-intenzitását, amelyet az előrejelzési modellben (lásd a 26. pontot) felhasználnak a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetésének alátámasztására.

A JÁRTASSÁG BIZONYÍTÁSA

8. A B.71. vizsgálati módszer e függelékben ismertetett vizsgálatának rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak az 1.2. függelékben felsorolt tíz jártassági tesztanyag felhasználásával igazolniuk kell szakmai jártasságukat. Ezenfelül a vizsgálat felhasználóinak történeti adatbázist kell fenntartaniuk, amely tartalmazza a reaktivitási tesztekből (lásd a 11. pontot), valamint a pozitív és az oldószeres/vivőanyagos kontrollokból (lásd a 20–22.pontot) származó adatokat, ezekkel az adatokkal igazolva a vizsgálat laboratóriumon belüli hosszú távú reprodukálhatóságát.

ELJÁRÁS

9. Ez a vizsgálat az állatkísérletek alternatív módszereire vonatkozó adatbázis-szolgáltatás (DB-ALM) h-CLAT-ot érintő 158. protokollján (18) alapul, amely az EURL ECVAM által koordinált validálási vizsgálathoz használt protokoll. A h-CLAT módszer laboratóriumi végrehajtása és alkalmazása során e protokoll alkalmazása ajánlott. Az alábbiakban a h-CLAT módszer főbb összetevőinek és eljárásainak leírása található; a módszer a következő két lépésből áll: *dózisbehatároló vizsgálat* és *CD86/CD54 expresszió mérése*.

Sejtek előkészítése

10. A h-CLAT módszer végrehajtásához a THP-1 humán monocita leukémia sejtvonalat kell használni. Ajánlatos a (TIB-202™) sejteket egy megfelelő minősítéssel rendelkező sejtbankból, például az Amerikai Fajtakultúra Gyűjteményből beszerezni.

11. A THP-1 sejteket 10 % magzati borjú szérummal (FBS), 0,05 mM 2-merkaptoetanollal, 100 egység/ml penicillinnel és 100 μg/ml sztreptomicinnel kiegészített RPMI-1640 tápoldatban, valamint 37°C-os, 5 %-os CO_2-tartalmú és vízgőzzel telített környezetben kell tenyészteni. A tápfolyadékból a penicillin és a sztreptomicin elhagyható. Ez esetben azonban a felhasználóknak például az 1.2. függelékben felsorolt jártassági tesztanyagok tesztelésével meg kell bizonyosodniuk arról, hogy az antibiotikumok hiánya a tápfolyadékban nem befolyásolja az eredményt. A fertőzés kockázatának minimalizálása érdekében minden esetben a megfelelő sejttenyésztési gyakorlatok szerint kell eljárni, függetlenül attól, hogy van-e antibiotikum a sejttenyésztő tápfolyadékban. A THP-1 sejteket 2–3 naponta 0,1–0.2 × 10^6 sejt/ml sűrűségben rutinszerűen leoltják. A sejtek fenntartása során meg kell őrizni a 0,1–1,0 × 10^6 sejt/ml sejtsűrűséget. A vizsgálatban való felhasználásuk előtt a sejteket egy reaktivitási teszt során minősíteni kell. A sejtek reaktivitási tesztjét a felolvasztásuk után két héttel kell elvégezni, a pozitív kontrollanyagokkal, vagyis a 2,4-dinitro-klór-benzollal (DNCB) (CAS-száma: 97-00-7, legalább 99 %-os tisztaságban) és a nikkel-szulfáttal ($NiSO_4$) (CAS-száma: 10101-97-0, legalább 99 %-os tisztaságban), valamint a negatív kontrollanyaggal, a tejsavval (LA) (CAS-száma: 50-21-5, legalább 85 % tisztaságban). Mind a DNCB-nak, mind a $NiSO_4$-nak pozitív választ, a tejsavnak pedig negatív választ kell kiváltania a CD86 és a CD54 sejtfelületi markernél egyaránt. A vizsgálathoz kizárólag a reaktivitási tesztben megfelelt sejtek használhatók. A sejtek a felolvasztásukat követően két hónapig szaporíthatók. A sejteket legfeljebb 30 alkalommal szabad passzálni. A reaktivitási tesztet a 20–24. pontban leírt eljárások szerint kell végrehajtani.

12. A vizsgálathoz a THP-1 sejteket vagy 0,1 × 10^6 sejt/ml vagy 0,2 × 10^6 sejt/ml sűrűségben átoltják, majd sejttenyésztő lombikban az előbbi esetben 72 óráig, az utóbbiban pedig 48 óráig előtenyésztik. Fontos, hogy közvetlenül az előtenyésztési időszak végét követően a sejttenyésztő lombikban minden (a fenti két előtenyésztési körülmény egyikét alkalmazó) kísérletben a sejtek sűrűsége nagyjából azonos legyen, mert közvetlenül az előtenyésztési időszak végét követően a sejttenyésztő lombikban fennálló sejtsűrűség befolyásolhatja az allergének által kiváltott CD86/CD54 expressziót (19). A vizsgálat napján a sejttenyésztő lombikból begyűjtött sejteket frissen készített tápfolyadékban 2 × 10^6 sejt/ml sűrűségben újraszuszpendálják. Ezt követően a sejteket elhelyezik egy 24 lyukú, lapos fenekű lemezben (500 µl, lyukanként 1 × 10^6 sejt) vagy egy 96 lyukú, lapos fenekű lemezben (80 µl, lyukanként 1,6 × 10^5 sejt).

Dózisbehatároló vizsgálat

13. A *dózisbehatároló vizsgálat* során meghatározzák a CV75 értéket, azaz a vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációját, amely az oldószeres/vivőanyagos kontrollhoz képest 75 %-os sejtéletképességet (CV) idéz elő. A CV75 értéket arra használják, hogy meghatározzák a vizsgálati vegyi anyagok koncentrációját a *CD86/CD54* expresszió méréséhez (lásd a 20–24. pontot).

A vizsgálati vegyi anyagok és a kontrollanyagok előkészítése

14. A vizsgálati vegyi anyagokat és a kontrollanyagokat a vizsgálat napján kell előkészíteni. A h-CLAT módszerben a vizsgálati vegyi anyagokat feloldják vagy stabilan diszpergálják (lásd még a 4. pontot) sóoldatban vagy tápoldatban, mint az első számú oldószer/vivőanyag választás, vagy dimetil-szulfoxidban (DMSO, legalább 99 %-os tisztaságban), mint második oldószer/vivőanyag választás, ha a vizsgálati vegyi anyag az előző két oldószerben/vivőanyagban nem oldható vagy nem diszpergálható stabilan, a végső koncentráció 100 mg/ml (sóoldat vagy tápoldat használata esetén) vagy 500 mg/ml (DMSO használata esetén). A fentiektől eltérő oldószerek/vivőanyagok megfelelő tudományos indokolással szintén használhatók. Figyelembe kell venni azt is, hogy a vizsgálati vegyi anyag mennyire stabil a végső oldószerben/vivőanyagban.

15. A vizsgálati vegyi anyagok 100 mg/ml (sóoldat vagy tápoldat használata esetén) vagy 500 mg/ml (DMSO használata esetén) törzsoldatából kiindulva az alábbi hígítási lépéseket kell elvégezni:

— Ha az oldószer/vivőanyag sóoldat vagy tápoldat: A megfelelő oldószer/vivőanyag használatával nyolc törzsoldatot (nyolc koncentrációt) készítenek, kétszeres oldatsorozatban. E törzsoldatokat ezután a tápfolyadékban 50-szeresükre tovább kell hígítani (munkaoldatok). Amennyiben a lemezre helyezett legnagyobb, 1 000 µg/ml-es végső koncentráció nem toxikus, a legmagasabb koncentrációértéket egy új citotoxicitási vizsgálatban újból meg kell határozni. A sóoldatban vagy tápoldatban feloldott vagy stabilan diszpergált vizsgálati vegyi anyagok lemezre helyezett végső koncentrációja nem haladhatja meg az 5 000 µg/ml értéket.

— Ha az oldószer/vivőanyag DMSO: A megfelelő oldószer/vivőanyag használatával nyolc törzsoldatot (nyolc koncentrációt) készítenek, kétszeres oldatsorozatban. E törzsoldatokat ezután a tápfolyadékban 250-szeresükre tovább kell hígítani (munkaoldatok). A lemezre helyezett végső koncentráció még akkor sem haladhatja meg az 1 000 µg/ml értéket, ha ez a koncentráció nem toxikus.

Végül pedig felhasználják a munkaoldatokat a kezeléshez, ehhez a kétszeres továbbhígítás érdekében azonos mennyiségű munkaoldatot adnak hozzá a lemezen lévő THP-1 sejtszuszpenzióhoz (lásd a 17. pontot), a lemez végleges koncentrációértékei általában 7,81–1 000 µg/ml tartományban helyezkednek el.

16. A h-CLAT módszerben alkalmazott oldószeres/vivőanyagos kontroll a tápfolyadék (a tápfolyadékban vagy sóoldatban feloldott vagy stabilan diszpergált vizsgálati vegyi anyagok esetében (lásd a 4. pontot)) vagy a DMSO (a DMSO-ban feloldott vagy stabilan diszpergált vizsgálati vegyi anyagok esetében), amelyet egyetlen végső, 0,2 %-os koncentrációban vizsgálnak a lemezen. Az oldószeres/vivőanyagos kontrollt a munkaoldatokhoz alkalmazott eljárás szerint kell hígítani (lásd a 15. pontot).

A vizsgálati vegyi anyagok és a kontrollanyagok alkalmazása

17. A 15. és a 16. pontban leírt módon elkészített tápfolyadékot vagy munkaoldatokat 1: 1 térfogatszázalék arányban össze kell keverni a 24 lyukú vagy 96 lyukú lapos fenekű lemezen elkészített sejtszuszpenziókkal (lásd a 12. pontot). A kezelt lemezeket ezt követően 24 óráig (±0,5 óra) 37°C-on 5 % CO_2 jelenlétében inkubálják. Ügyelni kell az illékony vizsgálati vegyi anyagok elpárolgásának elkerülésére, valamint a lyukak vizsgálati vegyi anyagokkal való keresztszennyeződésének elkerülésére, például a lemezek befedhetők fóliával a vizsgálati vegyi anyagokkal való inkubálás előtt (20).

Festés propídium-jodiddal

18. A 24 órás (±fél óra) kezelést követően a sejteket mintacsövekbe helyezik át és centrifugálással kinyerik őket. A felülúszót eltávolítják, a maradék sejtet pedig 0,1 % borjú szérum albuminnal kiegészített 200 µl (96 lyukú lemez esetén) vagy 600 µl (24 lyukú lemez esetén) foszfátpuffert tartalmazó sóoldattal (festő puffer) újraszuszpendálják. 200 µl sejtszuszpenziót áthelyeznek egy 96 lyukú, gömbölyű fenekű lemezre (96 lyukú lemez használata esetén) vagy mikrocsőbe (24 lyukú lemez használata esetén), majd két alkalommal átmossák 200 µl (96 lyukú lemez használata esetén) vagy 600 µl (24 lyukú lemez használata esetén) festő pufferrel. Végül a sejteket (pl. 400 µl) festő pufferben újraszuszpendálják, és hozzáadnak (pl. 20 µl) propídium-jodidot (a propídium-jodid végső koncentrációja lehet például 0,625 µg/ml). Más citotoxicitási markerek, például 7-amino-aktinomicin D (7-AAD), tripankék vagy egyéb markerek is alkalmazhatók, amennyiben az alternatívaként használt festékről például az 1.2. függelékben felsorolt jártassági tesztanyagok tesztelésével kimutatták, hogy a propídium-jodidhoz hasonló eredményekre vezet.

Citotoxicitás mérése áramlási citometriával és a CV75 érték megbecslésével

19. A propídium-jodid (PI) felvételét áramlási citometriával elemzik az FL-3 adatgyűjtő csatornán. Összesen 10 000 élő (PI negatív) sejt adatait gyűjtik össze. A sejtéletképességet az alábbi egyenlet alapján kalkulálja ki a citométer elemzőprogramja. Alacsony sejtéletképességnél az elhalt sejtekkel együtt legfeljebb 30 000 sejt adatait gyűjtik össze. Ennek alternatívája lehet az, amikor az adatokat az elemzés elindításától számítva egy percen át gyűjtik.

$$Sejtéletképesség = \frac{élő\ sejtek\ száma}{összegyűjtött\ sejtek\ száma\ összesen} \times 100$$

A CV75 értéket (lásd a 13. pontot), vagyis azt a koncentrációt, amelynél a THP-1 sejtek túlélési aránya 75 % (a toxicitás 25 %), logaritmikus-lineáris interpolációval számítják ki, az alábbi egyenlet alapján:

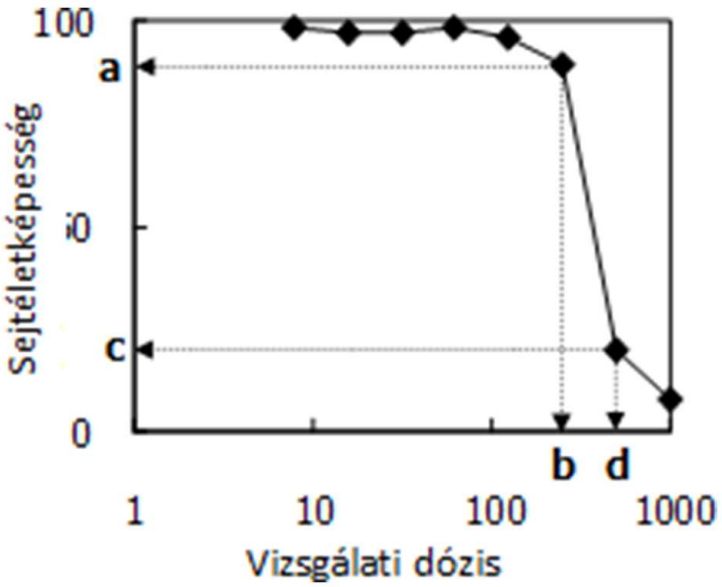
$$Log\ CV75 = \frac{(75 - c) \times Log(b) - (75 - a) \times Log(d)}{a - c}$$

ahol:

a = a 75 % feletti sejtéletképesség minimumértéke

c = a 75 % alatti sejtéletképesség maximumértéke

b és d = az a és c sejtéletképességet előidéző koncentrációk



A CV75 érték más módon is meghatározható, amennyiben (pl. a jártassági tesztanyagok tesztelésével) igazolható, hogy az nem befolyásolja az eredményt.

CD86/CD54 expresszió mérése

A vizsgálati vegyi anyagok és a kontrollanyagok előkészítése

20. A vizsgálati vegyi anyagokat feloldják vagy stabilan diszpergálják a megfelelő oldószerben/vivőanyagban (sóoldat, tápoldat vagy DMSO; lásd a 14. pontot). A vizsgálati vegyi anyagokat elsőként a *dózisbehatároló vizsgálatban* (lásd a 19. pontot) meghatározott CV75 érték 1,2-szerese 100-szorosának (sóoldat vagy tápoldat esetén) vagy 500-szorosának (DMSO esetén) megfelelő koncentrációra hígítják. Amennyiben a CV75 érték nem határozható meg (ha a *dózisbehatároló vizsgálatban* nem figyeltek meg kellő mértékű citotoxicitást), az induló koncentrációérték a vizsgálati vegyi anyag egyes oldószerekkel/vivőanyagokkal készített legmagasabb oldható vagy stabilan diszpergált koncentrációja legyen. A lemezre helyezett végső koncentráció azonban nem haladhatja meg az 5 000 μg/ml értéket (sóoldat vagy tápoldat esetén), illetve az 1 000 μg/ml értéket (DMSO esetén). Ezt követően a megfelelő oldószer/vivőanyag használatával 1,2-szeres oldatsorozatot készítenek (nyolc koncentrációval 100×1,2 × CV75 és 100×0,335 × CV75 között (sóoldat vagy tápoldat esetén), illetve 500×1,2 × CV75 és 500×0,335 × CV75 között (DMSO esetén)), létrehozva ezzel a h-CLAT módszerrel vizsgálandó törzsoldatokat (egy adagolási minta megtalálható a DB-ALM 158. protokolljában). A törzsoldatokat ezután a tápfolyadékban 50-szeresükre (sóoldat vagy tápfolyadék esetén), illetve 250-szeresükre (DMSO esetén) továbbhígítják (elkészítve a munkaoldatokat). Ezeket a munkaoldatokat végül felhasználják a kezeléshez, ehhez kétszeres hígítási tényező alkalmazásával elkészítik a lemezre helyezett végső oldatokat. Amennyiben az eredmények nem teljesítik a 29. és a 30. pontban szereplő sejtéletképességi kritériumokat, a CV75 értékének pontosabb meghatározása érdekében a *dózisbehatároló vizsgálat* megismételhető. A CD86/CD54 expresszió mérésére csak 24 lyukú lemezek használhatók.

21. Az oldószeres/vivőanyagos kontrollt a 16. pontban leírtak szerint kell elkészíteni. A h-CLAT módszerben alkalmazott pozitív kontrollanyag a DNCB (lásd a 11. pontot), amelynek törzsoldatait DMSO-ban készítik el, a törzsoldatokat pedig a 20. pontban foglaltak szerint hígítják. A *CD86/CD54 expresszió mérése* során pozitív kontrollanyagként használt DNCB-t egyetlen végső (általában 4,0 μg/ml) koncentrációban vizsgálják a lemezen. Ahhoz, hogy 4,0 μg/ml koncentrációjú DNCB kerüljön a lemezre, DMSO-ban elkészítik a DNCB 2 mg/ml koncentrációjú törzsoldatát, majd a törzsoldatot tápfolyadékban a 250-szeresére hígítva elkészítik a 8 μg/ml koncentrációjú munkaoldatot. A pozitív kontrollanyag koncentrációjaként használható a DNCB CV75 értéke, amelyet minden vizsgálólaboratóriumban meghatároznak. Alkalmazhatók más, megfelelő pozitív kontrollok is, ha rendelkezésre állnak dokumentált adatok hasonló vizsgálatmenet-elfogadhatósági kritériumok származtatásához. A pozitív kontrollanyag egyetlen végső koncentrációban kerül a lemezre, amely nem haladhatja meg az 5 000 μg/ml értéket (sóoldat vagy tápoldat esetén), illetve az 1 000 μg/ml értéket (DMSO esetén). A vizsgálatmenet elfogadhatósági kritériumai megegyeznek a vizsgálati vegyi anyag elfogadhatósági kritériumaival (lásd a 29. pontot), az utolsó kritériumot leszámítva, mivel a pozitív kontrollanyagot egyetlen koncentrációban vizsgálják.

A vizsgálati vegyi anyagok és a kontrollanyagok alkalmazása

22. Minden vizsgálati vegyi anyag és kontrollanyag esetében egy kísérletre van szükség az előrejelzéshez. Valamennyi kísérlet legalább két független *CD86/CD54 expresszió mérési* vizsgálatmenetből áll (lásd a 26–28. pontot). Mindegyik független vizsgálatmenetet más-más napon kell elvégezni, illetve a vizsgálatmenetek ugyanazon a napon is elvégezhetők, ha minden vizsgálatmenethez: a) a vizsgálati vegyi anyag és az ellenanyag oldatok egymástól független, frissen készített törzsoldatait és munkaoldatait használják és b) egymástól függetlenül begyűjtött sejteket (vagyis különböző sejttenyésztő lombikból gyűjtött sejteket) használnak; a sejtek azonban származhatnak ugyanabból a passzálásból. A vizsgálati vegyi anyagok és kontrollanyagok elkészített munkaoldatait (500 μl) 1: 1 arányban összekeverik 500 μl szuszpendált (1 x 10^6) sejttel, majd a sejteket a 20. és 21. pontban leírtak szerint 24 óráig (± fél óra) inkubálják. Minden vizsgálatmenetben elegendő a vizsgálati vegyi anyag és a kontrollanyag egyes koncentrációit egy replikátumban mérni, mivel az előrejelzést legalább két független vizsgálatmenet alapján határozzák meg.

Sejtek festése és adatok elemzés

23. A 24 órás (± fél óra) kezelést követően a sejteket a 24 lyukú lemezről mintacsövekbe helyezik, centrifugálással begyűjtik, majd 1 ml festő pufferben kétszer átmossák (szükség esetén be lehet iktatni további mosási lépéseket). A mosást követően a sejtek növekedését meggátolják 600 μl blokkoló oldattal (festő puffer 0,01 tömegszázalékos globulinnal (II-es, III-as Cohn-frakció, humán eredetű; SIGMA, #G2388-10G vagy azzal egyenértékű)), majd a sejteket 4°C-on 15 percre inkubálják. A blokkolást követően a sejteket három egyenlő 180 μl mennyiségű részre osztva 96 lyukú gömbölyű fenekű lemezbe vagy mikrocsőbe helyezik.

24. A centrifugálást követően a sejteket 4°C-on 30 percen át festik 50 μl FITC-vel jelzett anti-CD86, anti-CD54 vagy egér IgG1 (izotípus) ellenanyagokkal. A h-CLAT-ra vonatkozó 158. sz. DB-ALM protokollban (18) leírt ellenanyagokat kell alkalmazni festő pufferrel való 3: 25 térfogatszázalékos hígításban a CD86 esetében (BD-PharMingen, #555657; Fun-1 klón), illetve 3: 50 térfogatszázalékos hígításban a CD54 esetében (DAKO, #F7143; 6.5B5 klón) és az IgG1 esetében (DAKO, #X0927). Az ellenanyagok hígítási tényezőjét a vizsgálat kidolgozói határozták meg az alapján,

hogy ezek biztosították a legjobb jel-zaj arányt. A vizsgálat kidolgozói által szerzett tapasztalatok arra utalnak, hogy az ellenanyagok fluoreszcencia-intenzitása a különböző tételeknél általában konzisztens. A legmegfelelőbb vizsgálati koncentrációértékek meghatározásához azonban a felhasználók fontolóra vehetik az ellenanyagok saját laboratóriumi körülményeik mellett történő titrálását. Más fluorokrómmal jelzett anti-CD86 és/vagy anti-CD54 ellenanyagok is alkalmazhatók, amennyiben például az 1.2. függelékben felsorolt jártassági tesztanyagok tesztelésével kimutatták, hogy a FITC-vel összekapcsolt ellenanyagokhoz hasonló eredményekre vezetnek. Megjegyzendő, hogy a h-CLAT-ra vonatkozó 158. sz. DB-ALM protokollban (18) leírt ellenanyag klón vagy forgalmazó lecserélése befolyással lehet az eredményekre. Miután legalább kétszer átmosták 150 µl festék pufferrel, a sejteket (pl. 400 µl) festék pufferben újraszuszpendálják, és hozzáadják a PI oldatot (pl. 20 µl mennyiségben, amellyel elérhető a végső 0,625 µg/ml koncentráció) vagy egy másik citotoxicitási marker oldatát (lásd a 18. pontot). A CD86 és a CD54 expressziójának mértékét és a sejtéletképességet áramlási citometriával elemzik.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Az adatok kiértékelése

25. A CD86 és a CD54 kifejeződését áramlási citometriával elemzik az FL-1 adatgyűjtő csatornán. A pozitív kontrollként szolgáló sejtek és a vegyi anyaggal kezelt sejtek CD86 és CD54 relatív fluoreszcencia-intenzitását (RFI) a fluoreszcencia-intenzitás mértani középértéke (MFI) alapján és az alábbi egyenlet szerint számítják ki:

$$RFI = \frac{\textit{Vegyi anyaggal kezelt sejtek MFI} - \textit{je} - \textit{vegyi anyaggal kezelt izotípusos kontrollsejtek MFI} - \textit{je}}{\textit{oldósz./vivőanyaggal kez. kontr.sejtek MFI} - \textit{je} - \textit{oldósz./vivőanyaggal kez./izotíp.kontr.sejtek MFI} - \textit{je}} \times 100$$

Az izotípusos kontrollként szolgáló sejtek életképességét (amelyeket egér IgG1 (izotípus) ellenanyagokkal festettek meg) szintén a 19. pontban feltüntetett egyenlettel határozzák meg.

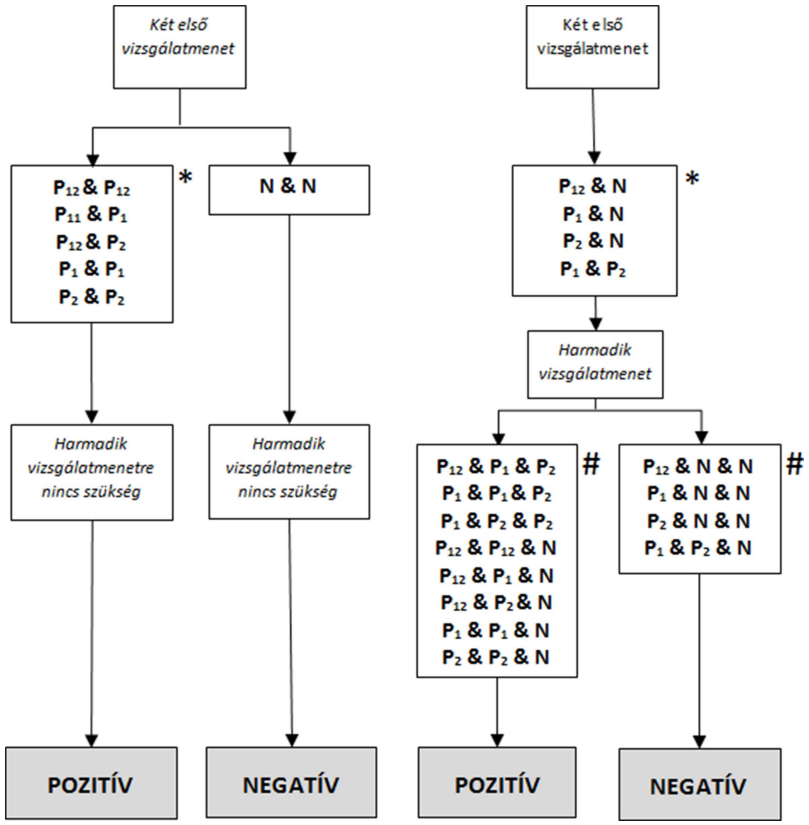
Előrejelzési modell

26. A *CD86/CD54* expressziós mérésnél minden vizsgálati vegyi anyagot legalább két független vizsgálatmenetben tesztelnek, amelyek alapján meghatározzák a (POZITÍV vagy NEGATÍV) előrejelzést. A h-CLAT előrejelzés akkor minősül POZITÍVNAK, ha két független vizsgálatmenetből kettőben vagy három független vizsgálatmenetből legalább kettőben az alábbi feltételek legalább egyike teljesül, minden egyéb esetben a h-CLAT előrejelzés negatívnak minősül (1. ábra):

— a CD86 relatív fluoreszcencia-intenzitása bármely vizsgált koncentrációban legalább 150 % (legalább 50 %-os sejtéletképesség mellett);

— a CD54 relatív fluoreszcencia-intenzitása bármely vizsgált koncentrációban legalább 200 % (legalább 50 %-os sejtéletképesség mellett).

27. A fentiek alapján, ha az első két vizsgálatmenet pozitív eredménnyel zárult a CD86 és/vagy a CD54 esetében, akkor a h-CLAT vizsgálat előrejelzése POZITÍVNAK tekintendő, és harmadik vizsgálatmenetre nincs szükség. Hasonlóképpen, ha az első két vizsgálatmenet mindkét marker tekintetében negatív, akkor a h-CLAT előrejelzése NEGATÍVNAK minősül (figyelembe véve a 30. pontban foglaltakat), és harmadik vizsgálatmenetre nincs szükség. Ha azonban az első két vizsgálatmenet eredményei legalább az egyik marker (CD54 vagy CD86) esetében nem egyeznek, el kell végezni egy harmadik vizsgálatmenetet, és a végső előrejelzés a három független vizsgálatmenet többségi eredményén (a háromból kettőjén) fog alapulni. Ezzel kapcsolatban megjegyzendő, hogy ha két független vizsgálatmenetben az egyik csak a CD86 tekintetében pozitív (a továbbiakban P_1) és a másik csak a CD54 esetében pozitív (a továbbiakban P_2), harmadik vizsgálatmenetre van szükség. Amennyiben a harmadik vizsgálatmenet mindkét marker esetében negatív eredménnyel jár (a továbbiakban N), akkor a h-CLAT vizsgálat előrejelzése NEGATÍVNAK tekintendő. Másfelől viszont, ha a harmadik vizsgálatmenet bármelyik marker (P_1 vagy P_2) esetében vagy mindkét marker (a továbbiakban P_{12}) esetében pozitív eredménnyel zárul, a h-CLAT vizsgálat előrejelzése POZITÍVNAK tekintendő.



1. ábra: A h-CLAT módszerben alkalmazott előrejelzési modell. A h-CLAT-tal végzett előrejelzést integrált értékelési és vizsgálati megközelítés keretében, valamint az Általános bevezetés 7. és 8. pontjának rendelkezéseivel összhangban kell figyelembe venni.

P_1: csak a CD86 tekintetében pozitív vizsgálatmenet; P_2: csak a CD54 tekintetében pozitív vizsgálatmenet; P_{12}: a CD54 és a CD86 tekintetében egyaránt pozitív vizsgálatmenet; N: sem a CD54, sem a CD86 tekintetében nem pozitív vizsgálatmenet.

*A keretekben az első két vizsgálatmenet eredményeinek releváns kombinációi szerepelnek, az eredmények sorrendjétől függetlenül.

#A keretek a három vizsgálatmenetből származó eredmények releváns kombinációit jelenítik meg az első két vizsgálatmenet fenti keretben látható eredményei alapján, nem tükrözik viszont az eredmények sorrendjét.

28. A h-CLAT vizsgálat által pozitívként előrejelzett vizsgálati vegyi anyagok esetében opcionálisan két hatáserősséget jelző koncentrációérték (EC) állapítható meg, a CD86 esetében az EC_{150} és a CD54 esetében az EC_{200}, vagyis az a koncentráció, amelynél a vizsgálati vegyi anyagok relatív fluoreszcencia-intenzitása 150, illetve 200 százalék. Ezek az EC-értékek hozzájárulhatnak a szenzibilizáló hatás erősségének értékeléséhez (9), ha az integrált vizsgálati és értékelési megközelítéshez hasonló integrált megközelítések keretében alkalmazzák őket (4) (5) (6) (7) (8). Az alábbi egyenletekkel lehet kiszámítani értéküket:

$$EC\ 150\ (CD86\ esetén) = B_{conc} + [(150 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC\ 200\ (CD54\ esetén) = B_{conc} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

ahol

az A_{konc} az a μg/ml-ben megadott legalacsonyabb koncentráció, amelynél a relatív fluoreszcencia-intenzitás nagyobb mint 150 (CD86) vagy 200 (CD54)

a B_{konc} az a μg/ml-ben megadott legmagasabb koncentráció, amelynél a relatív fluoreszcencia-intenzitás kisebb mint 150 (CD86) vagy 200 (CD54)

az A_{RFI} az a legalacsonyabb koncentrációjú relatív fluoreszcencia-intenzitás, ahol a relatív fluoreszcencia-intenzitás nagyobb mint 150 (CD86) vagy 200 (CD54)

a B_{RFI} az a legmagasabb koncentrációjú relatív fluoreszcencia-intenzitás, ahol a relatív fluoreszcencia-intenzitás kisebb mint 150 (CD86) vagy 200 (CD54)

Az EC_{150} és az EC_{200} érték pontosabb meghatározása érdekében szükség lehet arra, hogy a *CD86/CD54 expresszió mérését* három független vizsgálatmenetben végezzék el. Ez esetben a végső EC_{150} és EC_{200} értéket a három független vizsgálatmenetben kiszámolt EC-értékek középértékeként határozzák meg. Amikor három független vizsgálatmenetből csupán kettőben teljesülnek a pozitív előrejelzés kritériumai (lásd a 26–27. pontot), a két kiszámított EC_{150} vagy EC_{200} érték közül a magasabbat fogadják el.

Elfogadhatósági kritériumok

29. A h-CLAT módszer alkalmazásakor az alábbi elfogadhatósági kritériumoknak kell teljesülniük (22) (27).

— A tápoldatos és az oldószeres/vivőanyagos kontroll sejtéletképességének meg kell haladnia a 90 %-ot.

— Az oldószeres/vivőanyagos kontrollban sem a CD86, sem a CD54 relatív fluoreszcencia-intenzitása nem haladhatja meg a pozitív besoroláshoz szükséges kritériumot (CD86 esetén RFI ≥ 150 % és CD54 esetén RFI ≥ 200 %). Az oldószeres/vivőanyagos kontroll relatív fluoreszcencia-intenzitását a 25. pontban szereplő képlet alapján kell kiszámolni (a „vegyi anyag MFI értéke" helyett az „oldószer/vivőanyag MFI értékét", az „oldószer/vivőanyag MFI értéke" helyett pedig a „tápoldatos kontroll MFI értékét" kell használni).

— Mind a tápoldatos kontroll, mind az oldószeres/vivőanyagos kontroll során a CD86 és a CD54 esetében megállapított fluoreszcencia-intenzitás mértani középértékének izotípusos kontrollhoz viszonyított aránya meg kell, hogy haladja a 105 %-ot.

— A pozitív kontroll (DNCB) során a CD86 és a CD54 relatív fluoreszcencia-intenzitásának teljesítenie kell a pozitív besoroláshoz szükséges kritériumot (CD86 esetén RFI ≥ 150 és CD54 esetén RFI ≥ 200), 50 %-nál nagyobb sejtéletképesség mellett.

— A vizsgálati vegyi anyaggal elért sejtéletképességnek minden vizsgálatmenetben legalább négy vizsgált koncentrációban meg kell haladnia az 50 %-ot.

30. A negatív eredmény csak akkor elfogadható, ha a vizsgálati vegyi anyag legmagasabb vizsgált koncentrációja (vagyis a 20. pontban ismertetett oldatsorozat szerint az 1,2 × CV75) 90 %-nál alacsonyabb sejtéletképességet eredményez. Amennyiben az 1,2 × CV75 koncentráció által kiváltott sejtéletképesség eléri vagy meghaladja a 90 %-ot, a negatív eredményt figyelmen kívül kell hagyni. Ilyen esetben ajánlatos a CV75 újbóli meghatározásával pontosítani a dózisválasztást. Amennyiben azonban a vizsgálati vegyi anyag maximális vizsgált koncentrációja 5 000 μg/ml sóoldatban (illetve tápoldatban vagy más oldószerben/vivőanyagban), 1 000 μg/ml DMSO-ban vagy a legmagasabb még oldható koncentráció, a negatív eredmény 90 % fölötti sejtéletképesség esetén is elfogadható.

Vizsgálati jegyzőkönyv

31. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag

Egy összetevőből álló anyag

— kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;

— fizikai megjelenés, Log Kow, vízoldékonyság, DMSO-ban való oldhatóság, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;

— tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;

— vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— vizsgált koncentráció(k);

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;

— az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében.

Több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítójával (lásd fent), tisztaságával, mennyiségi előfordulásával és releváns fizikai-kémiai tulajdonságaival (lásd fent) jellemezve; amennyiben rendelkezésre állnak;

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság, DMSO-ban való oldhatóság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;

— molekulatömeg vagy látszólagos molekulatömeg ismert összetételű keverékek/polimerek esetén, vagy a vizsgálat lebonyolítása szempontjából releváns egyéb információ;

— vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— vizsgált koncentráció(k);

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;

— az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében.

Kontrollok

Pozitív kontroll

— kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;

— fizikai megjelenés, log K_{ow}, vízoldékonyság, DSMO-ban való oldhatóság, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak és szükség szerint;

— tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;

— vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— vizsgált koncentráció(k);

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;

— adott esetben hivatkozás a pozitív történeti kontrollok eredményeire, amelyek a vizsgálatmenet elfogadhatósági kritériumainak való megfelelőséget bizonyítják.

Negatív és oldószeres/vivőanyagos kontroll

— kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;

— tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;

— fizikai megjelenés, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben a vizsgálati iránymutatásban említett kontroll oldószerektől/vivőanyagoktól eltérő oldószerek/vivőanyagok használatosak, és amennyiben rendelkezésre állnak;

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;

— az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében.

Vizsgálati körülmények

— a megbízó, a vizsgálatot végző laboratórium és a vizsgálatvezető neve és címe;

— az alkalmazott vizsgálat leírása;

— használt sejtvonal, annak tárolási feltételei és eredete (például az a létesítmény, ahonnan beszerezték);

— az alkalmazott áramlási citometria rendszer (pl. modell) és annak műszerbeállításai, valamint az alkalmazott globulin, ellenanyagok és citotoxicitási markerek;

— a vizsgálat végrehajtásában való, a jártassági tesztanyagok vizsgálatával megszerzett laboratóriumi jártasság bizonyítására alkalmazott eljárás és a vizsgálat idővel reprodukálható teljesítményének bizonyítására alkalmazott eljárás, pl. a dokumentált kontrolladatok és/vagy a dokumentált reaktivitási vizsgálatok adatai.

A vizsgálat elfogadhatósági kritériumai

— az oldószeres/vivőanyagos kontroll során kapott sejtéletképesség, MFI és RFI az elfogadhatósági tartományokkal való összevetésben;

— a pozitív kontroll során kapott sejtéletképesség és RFI az elfogadhatósági tartományokkal való összevetésben;

— a vizsgálati vegyi anyag minden vizsgált koncentrációjában mért sejtéletképesség.

A vizsgálat menete

— az alkalmazott vizsgálatmenetek száma;

— a vizsgálati vegyi anyag koncentrációi, alkalmazása és a használt expozíciós idő (ha eltér az ajánlottól);

— az alkalmazott értékelési és döntési kritériumok leírása;

— a vizsgálati eljárás bármilyen változtatásának leírása.

Eredmények

— az egyes vizsgálatmenetekben a vizsgálati vegyi anyaggal és a pozitív kontrollal kapott adatok táblázatba foglalása, feltüntetve a CV75 értéket (ha alkalmazandó), a fluoreszcencia-intenzitás mértani középértékét, a relatív fluoreszcencia-intenzitást, a sejtéletképességi értékeket, az EC_{150}/EC_{200} értéket (ha alkalmazandó), valamint a vizsgálati vegyi anyag előrejelzési modell szerinti besorolását;

— adott esetben bármely más releváns észrevétel leírása.

Az eredmények tárgyalása

— a h-CLAT módszerrel kapott eredmények tárgyalása;

— a vizsgálat eredményeinek integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében történő tárgyalása, amennyiben rendelkezésre állnak más releváns információk.

Következtetések

SZAKIRODALOM

(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. A dokumentum az alábbi helyről elérhető:https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. J Appl Toxicol. 35, 1318-1332.

(5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. J Appl Toxicol. 35, 1333-1347.

(6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potencials. Regul Toxicol Parmacol. 63, 489-504.

(7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol. 69, 371-379.

(8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Parmacol. 71, 337-351.

(9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. Arch Toxicol. 89, 2355-2383.

(10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. J Appl Toxicol. DOI 10.1002/jat.3281.

(11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. Toxicol. *In Vitro* 26, 1150-60.

(12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). A dokumentum az alábbi helyről elérhető: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 A dokumentum az alábbi helyről elérhető: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, NishiyamaN, 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 metabolizin 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^{th} report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.

(18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. A dokumentum az alábbi helyről elérhető:http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

(19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamato K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70-82.

(20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, , Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89-96.

(21) OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 2005, 96 pp.

(22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No 168. Elérhető a következő címen:http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En

(23) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Elérhető a következő címen:http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).

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

1.1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: a vizsgálattal kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálat megfelelőségének mutatója, és relevanciájának egyik szempontja. A kifejezés gyakran használatos az „egyezés" szó megfelelőjeként, amely arra utal, hogy egy adott vizsgálat milyen arányban szolgáltat helyes eredményeket (21).

Káros kimeneti út (Adverse Outcome Pathway, AOP): valamely megcélzott vegyi anyag vagy hasonló vegyi anyagok csoportjának kémiai szerkezetéből kiinduló, a molekuláris kiváltó eseményen keresztül az érintett in vivo eredményig végbemenő eseménysorozat (22).

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

CV75: 75 %-os sejtéletképességet eredményező becsült koncentráció.

EC150: a CD86 expressziója során 150 %-os relatív fluoreszcencia-intenzitást eredményező koncentrációk.

EC200: a CD54 expressziója során 200 %-os relatív fluoreszcencia-intenzitást eredményező koncentrációk.

Áramlási citometria: citometrikus technika, amelyben a folyadékáramban szuszpendált sejtek egyenként áthaladnak egy fókuszált gerjesztő fénynyalábon, amely a sejtekre és összetevőire jellemző minták szerint szóródik szét; a sejteket gyakran fluoreszcens markerekkel jelölik meg, amelyek az abszorbeált fényt eltérő frekvenciákon bocsátják ki.

Veszély: valamely anyag vagy helyzet azon sajátossága, hogy káros hatásokat képes előidézni az élő szervezet, rendszer vagy (al)populáció anyagnak való expozíciójakor.

Integrált vizsgálati és értékelési megközelítés: valamely vegyi anyag vagy vegyianyag-csoport veszélyeinek azonosításához (potenciál), jellemzéséhez (hatáserősség) és/vagy biztonsági értékeléséhez (potenciál, hatáserősség és expozíció) alkalmazott strukturált megközelítés, amely stratégiai szempontból beépít és mérlegel minden olyan releváns adatot, amely hozzájárul a lehetséges veszélyre és/vagy kockázatra és/vagy a további célirányos és ezért minimális vizsgálat szükségességére vonatkozó szabályozói döntéshozatalhoz.

Tápoldatos kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó kezeletlen replikátum. Ezt a mintát a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt mintákkal és más kontrollmintákkal együtt kell feldolgozni annak megállapításához, hogy az oldószer/vivőanyag kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati rendszerrel.

Keverék: két vagy több anyagot tartalmazó elegy vagy oldat.

Egy összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben az egyik fő összetevő legalább 80 tömegszázalékban van jelen.

Több összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben egynél több fő összetevő legalább 10 tömegszázalékban, de 80 tömegszázalékot nem meghaladó koncentrációban van jelen. A több összetevőből álló anyag gyártási folyamat eredménye. A keverék és a több összetevőből álló anyag között az a különbség, hogy a keverék két vagy több anyag összekeverésével, kémiai reakció nélkül jön létre. A több összetevőből álló anyag kémiai reakció eredménye.

Pozitív kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó anyaggal kezelt replikátum. Annak biztosítása érdekében, hogy a pozitív kontrollban jelentkező hatás időbeli változását fel lehessen mérni, a pozitív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Pre-haptének: abiotikus átalakulás révén szenzibilizálóvá váló vegyi anyagok.

Pro-haptének: olyan vegyi anyagok, amelyek enzimatikus aktivációt igényelnek bőrszenzibilizáló hatásuk kifejtéséhez.

Relatív fluoreszcencia-intenzitás (RFI): a vegyi anyaggal kezelt sejteknél mért fluoreszcencia-intenzitás mértani középértékének (MFI) az oldószerrel/vivőanyaggal kezelt sejteknél mért fluoreszcencia-intenzitás mértani középértékéhez viszonyított relatív értéke.

Relevancia: a vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálat pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (21).

Megbízhatóság: a vizsgálat laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. Megállapítása a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság, valamint a laboratóriumon belüli megismételhetőség kiszámításával történik (21).

Vizsgálatmenet: egy vizsgálatmenet során egy vagy több vizsgálati vegyi anyagot vizsgálnak egy párhuzamos oldószeres/vivőanyagos kontrollal és egy pozitív kontrollal.

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálat helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálat pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálat relevanciájának megítélésében (21).

Festő puffer: 0,1 % borjú szérum albuminnal kiegészített foszfátpuffert tartalmazó sóoldat.

Oldószeres/vivőanyagos kontroll: valamely vizsgálati rendszernek a vizsgálati vegyi anyagon kívüli összes összetevőjét tartalmazó kezeletlen minta, amely azonban magában foglalja az alkalmazott oldószert/vivőanyagot. Az ugyanabban az oldószerben/vivőanyagban feloldott vagy stabilan diszpergált vizsgálati vegyi anyaggal kezelt minták esetében a kiindulási érték létrehozásához használatos. Párhuzamos tápoldatos kontrollal elvégzett vizsgálata esetén ez a minta azt is bizonyítja, hogy az oldószer/vivőanyag kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati rendszerrel.

Specificitás: a vizsgálat elvégzésével helyesen besorolt összes negatív/inaktív vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (21).

Anyag: olyan természetes állapotban előforduló vagy gyártási eljárásból származó kémiai elem és vegyületei, amely a stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagot és az alkalmazott eljárásból származó szennyező anyagokat is tartalmazhat, de nem tartalmaz olyan oldószert, amely az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltoztatása nélkül elkülöníthető.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

A vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete által globálisan harmonizált rendszere (ENSZ-GHS): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (23).

UVCB: ismeretlen szerkezetű vagy változó összetételű, összetett reakcióban keletkezett vagy biológiai eredetű anyagok.

Érvényes vizsgálat: olyan vizsgálat, amely kellően relevánsnak és megbízhatónak minősül egy adott célra, és amely tudományosan megalapozott elveken alapul. Egy-egy vizsgálat abszolút értelemben soha nem érvényes, kizárólag meghatározott céllal összefüggésben (21).

1.2. függelék

JÁRTASSÁGI TESZTANYAGOK

A B.71. vizsgálati módszer e függelékben ismertetett vizsgálatának rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak igazolniuk kell szakmai jártasságukat oly módon, hogy az 1. táblázatban javasolt 10 anyagra vonatkozóan a h-CLAT vizsgálattal várható előrejelzést helyesen kapják meg, továbbá a 10 jártassági tesztanyag közül legalább 8 esetében referenciatartományba eső CV75, EC_{150} és EC_{200} értékeket kapnak. A jártassági tesztanyagok kiválasztása oly módon történt, hogy az a bőrszenzibilizáció veszélye esetén bekövetkező különféle válaszreakciók tartományát illetően reprezentatív legyen. A kiválasztás többi kritériuma az volt, hogy a vegyi anyagok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők legyenek, azokra vonatkozóan kiváló minőségű in vivo referenciaadatok álljanak rendelkezésre, és a h-CLAT módszer alapján kiváló minőségű in vitro adatok álljanak rendelkezésre. A h-CLAT módszerhez rendelkezésre állnak publikált referenciaadatok is (3) (14).

1. táblázat

A h-CLAT módszerben való szakmai jártasság bizonyításához ajánlott anyagok

Jártassági tesztanyagok	CAS-szám	Halmazállapot	In vivo előrejelzés (1)	CV75 referencia-tartomány µ g/ml-ben (2)	h-CLAT eredmények CD86 esetén (EC_{150} referencia-tartomány µg/ml-ben) (2)	h-CLAT eredmények CD54 esetén (EC_{200} referencia-tartomány µg/ml-ben) (2)
2,4-dinitro-klór-benzol	97-00-7	Szilárd	Szenzibilizáló (szélsőségesen)	2-12	Pozitív (0,5-10)	Pozitív (0,5-15)
4-Fenilén-diamin	106-50-3	Szilárd	Szenzibilizáló (erősen)	5-95	Pozitív (<40)	Negatív (>1,5) (3)
Nikkel-szulfát	10101-97-0	Szilárd	Szenzibilizáló (mérsékelten)	30-500	Pozitív (<100)	Pozitív (10–100)
2-merkapto-benzotiazol	149-30-4	Szilárd	Szenzibilizáló (mérsékelten)	30-400	Negatív (>10) (3)	Pozitív (10-140)
R(+)-limonén	5989-27-5	Folyadék	Szenzibilizáló (enyhén)	>20	Negatív (>5) (3)	Pozitív (<250)
Imidazolidinil-urea	39236-46-9	Szilárd	Szenzibilizáló (enyhén)	25–100	Pozitív (20-90)	Pozitív (20-75)
Izopropanol	67-63-0	Folyadék	Nem szenzibilizáló	>5 000	Negatív (>5 000)	Negatív (>5 000)
Glicerin	56-81-5	Folyadék	Nem szenzibilizáló	>5 000	Negatív (>5 000)	Negatív (>5 000)
Tejsav	50-21-5	Folyadék	Nem szenzibilizáló	1500-5 000	Negatív (>5 000)	Negatív (>5 000)
4-Aminobezoesav	150-13-0	Szilárd	Nem szenzibilizáló	> 1 000	Negatív (>1 000)	Negatív (>1 000)

Rövidítések: CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám.

(1) Az in vivo veszélyekre (és a hatáserősségre) vonatkozó előrejelzés LLNA-adatokon alapul (3) (14). Az in vivo hatáserősség levezetése az ECETOC által javasolt kritériumok segítségével történik (24).

(2) A megfigyelt dokumentált értékek alapján (13) (25).

(3) Az ismert adatok alapján többnyire negatív eredményeket hozott ez a marker, ezért az esetek többségében negatív eredmény várható. A megadott tartományt a néhány pozitív történeti eredmény alapján határozták meg. Pozitív eredmény esetén az EC-értéknek az ismert referenciatartományon belül kell lennie.

2. függelék

IN VITRO BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ: U937 SEJTVONAL AKTIVÁLÁSI VIZSGÁLAT (U-SENS™)

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

1. Az U-SENS™ vizsgálat mennyiségileg meghatározza az U937 humán hisztiocitikus limfóma sejtvonal monocitáinak és dendritikus sejtjeinek a szenzibilizáló anyagokkal való kezelést követően beinduló aktivációs folyamata által a sejtfelületi marker (CD86) expressziójában előidézett változást (1). A CD86 sejtfelületi marker U937 sejtvonalban mért expressziós szintjét felhasználják a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetésének alátámasztására.

2. Az U-SENS™ vizsgálatot egy, a L'Oréal által koordinált validálási vizsgálatban (2) értékelték, majd az állatkísérletek alternatív módszereinek uniós referencialaboratóriumának (EURL ECVAM) tudományos tanácsadó bizottsága (ESAC) elvégezte a vizsgálat független szakértői értékelését (3). A rendelkezésre álló bizonyítékok, valamint a szabályozó hatóságok és az érdekeltek álláspontja alapján az U-SENS™ vizsgálatot az EURL ECVAM (4) integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében történő alkalmazásra ajánlotta, a bőrszenzibilizáló és nem szenzibilizáló anyagok veszélyességi osztályozás és címkézés céljából történő megkülönböztetésének alátámasztására. A bőrszenzibilizációs integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében alkalmazott adatintegrálás és egyedi információforrások strukturált megközelítéseire vonatkozó jelentéstételről szóló iránymutatásában az OECD beszámol számos, különböző vizsgálati stratégiát és előrejelzési modellt ismertető esettanulmányról. A különféle kidolgozott megközelítések egyike az U-SENS™ vizsgálaton alapul (5). Az U-SENS™ alkalmazásából származó adatok és más információk, egyebek mellett a dokumentált adatok és az ismert hiteles humán adatok (6) együttes használatára a szakirodalom hoz példákat (4) (5) (7).

3. Az U-SENS™ vizsgálatról bebizonyosodott, hogy áthelyezhető a sejttenyésztési technikák és az áramlási citometriás elemzés terén tapasztalattal rendelkező laboratóriumokba. A vizsgálattól várható előrejelzések reprodukálhatóságának mértéke laboratóriumon belül mintegy 90 %, laboratóriumok között pedig 84 % (8). A validálási vizsgálatban (8) és más közzétett tanulmányokban (1) kapott eredmények összességében azt jelzik, hogy az U-SENS™ a bőrszenzibilizáló (azaz az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozó) anyagokat az LLNA vizsgálati módszer eredményeihez képest 86 %-os (N=166) pontossággal különbözteti meg a nem szenzibilizáló anyagoktól, 91 % az érzékenysége (118/129), a specifikussága pedig 65 % (24/37). A humán vizsgálatokból származó eredményekkel összevetve a bőrszenzibilizáló (vagyis az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozó) anyagokat 77 %-os (N=101) pontossággal különbözteti meg a nem szenzibilizáló anyagoktól, 100 % az érzékenysége (58/58), míg a specifikussága 47 % (20/43). Az LLNA módszerrel összevetve az U-SENS™ nagyobb valószínűséggel ad hamis negatív előrejelzést olyan vegyi anyagoknál, amelyeknek alacsonytól mérsékeltig terjedő a szenzibilizáló hatása (azaz az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1B. alkategóriába tartozó anyagoknál), mint a rendkívül bőrszenzibilizáló hatást mutató vegyi anyagoknál (azaz az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1A. alkategóriába tartozó anyagoknál) (1) (8) (9). Ezek az információk összességében azt jelzik, hogy az U-SENS™ vizsgálat érdemben hozzájárul a bőrszenzibilizáció veszélyének azonosításához. Az U-SENS™ mint önálló vizsgálat esetében itt megadott pontossági értékek azonban csak irányadóak, ugyanis a vizsgálatot az integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében más információforrásokkal együtt és az Általános bevezetés 7. és 8. pontjának rendelkezéseivel összhangban kell figyelembe venni. Ezen túlmenően a bőrszenzibilizáció nem állatokon alkalmazott módszereinek értékelésekor nem szabad megfeledkezni arról, hogy az LLNA vizsgálat, valamint más állatkísérletek nem feltétlenül tükrözik teljes egészében az embernél fennálló helyzetet.

4. A jelenleg rendelkezésre álló adatok alapján az U-SENS™ vizsgálatról megállapították, hogy alkalmazható különféle szerves funkciós csoportokat, fizikai-kémiai tulajdonságokat, (in vivo vizsgálatok során meghatározott) bőrszenzibilizáló hatásokat és a bőrszenzibilizációval összefüggésbe hozható reakciómechanizmusok spektrumát (Michael-akceptor, Schiff-bázis képződés, aciltranszfer ágens, bimolekuláris nukleofil szubsztitúció [SN2] vagy aromás nukleofil szubsztitúció [SNAr]) képviselő vizsgálati vegyi anyagokra (ezen belül kozmetikai összetevőkre, pl. tartósítószerekre, felületaktív anyagokra, hatóanyagokra, festékekre) (1) (8) (9) (10). Az U-SENS™ vizsgálat olyan vizsgálati vegyi anyagokra alkalmazandó, amelyek megfelelő oldószerben/vivőanyagban (lásd a 13. pontot) oldhatók vagy azokkal stabil diszperziót alkotnak (azaz olyan kolloidot vagy szuszpenziót, amelyben a vizsgálati vegyi anyag nem ülepedik le, illetve nem válik szét az oldószertől/vivőanyagtól különböző fázisokra). Az U-SENS™ megfelelően előrejelezte azon vegyi anyagok besorolását is, amelyek az adatbázisban pre-hapténokként (oxidációval aktiválódó anyagokként) vagy pro-hapténokként (például a P450 enzim közreműködésével enzimatikus aktivációt igénylő anyagokként) tartottak nyilván (1) (10).A membránt károsító anyagok viszont álpozitív eredményre vezethetnek a CD86 expressziójának nem specifikus növelése miatt, mivel az in vivo referenciabesoroláshoz képest kapott 7 álpozitív eredményből 3 felületaktív anyagnál fordult elő (1). Bár a felületaktív anyagokkal elért pozitív eredményeket körültekintően kell mérlegelni, a felületaktív anyagok negatív eredménye használható a vizsgálati vegyi anyag nem bőrszenzibilizáló anyagként való azonosításának alátámasztására. Az U-SENS™ vizsgálat alkalmas fluoreszcens vizsgálati

vegyi anyagok értékelésére (1), mindazonáltal azok az erősen fluoreszcens vizsgálati vegyi anyagok, amelyek a fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC), illetve a propídium-jodiddal (PI) azonos hullámhosszon bocsátják ki a fényt, zavarják az áramlási citometriás észlelést, ezért FITC-vel összekapcsolt ellenanyagokkal (potenciális hamis negatív eredmény), illetve propídium-jodiddal (nem mérhető életképesség) nem értékelhetők megfelelően. Ilyen esetben használhatók más fluorokrómmal jelzett ellenanyagok vagy más citotoxicitási markerek, ha például a 2.2. függelékben szereplő jártassági tesztanyagok vizsgálata révén bizonyítást nyert, hogy a FITC-vel jelzett ellenanyagokhoz vagy a propídium-jodidhoz (lásd a 18. pontot) hasonló eredményt biztosítanak. A fentiek fényében: a felületaktív anyagokkal kapott pozitív eredményeket és az erősen fluoreszcens vizsgálati vegyi anyagokkal elért negatív eredményeket a közölt korlátokra tekintettel és az integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretébe tartozó egyéb információforrásokkal összefüggésben kell értelmezni. Olyan esetekben, amikor bizonyítékkal igazolható, hogy az U-SENS™ vizsgálat nem alkalmazható más, konkrét vegyianyag-kategóriákra, a vizsgálatot nem szabad e vegyianyag-kategóriákra alkalmazni.

5. A fentieknek megfelelően az U-SENS™ vizsgálat elősegíti a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetését. Hozzájárulhat azonban a szenzibilizáló hatás erősségének értékeléséhez is, ha az integrált vizsgálati és értékelési megközelítéshez hasonló integrált megközelítések keretében alkalmazzák. Lehetőleg humán adatokon alapuló további munkára van azonban szükség annak meghatározásához, hogy az U-SENS™ eredményei hogyan járulhatnak hozzá a hatáserősség vizsgálatához.

6. A fogalommeghatározások a 2.1. függelékben találhatók.

A Vizsgálat Elve

7. Az U-SENS™ vizsgálat egy in vitro eljárás, amely a vizsgálati vegyi anyaggal való 45 ±3 órás kezelést követően mennyiségileg meghatározza a CD86 sejtfelületi markernek egy humán hisztiocitikus limfóma sejtvonal, az U937 sejtekben történő kifejeződésében előidézett változásokat. A CD86 sejtfelületi marker az U937 sejtek aktivációjának egyik jellegzetes markere. A CD86 egy ismert kostimuláló molekula, amely képes imitálni a monociták aktivációját, ami kulcsszerepet játszik a T-sejtek elsődleges aktiválásában. A CD86 sejtfelületi marker expressziójának változásait áramlási citometriával mérik, miután a sejteket megfestették, többnyire fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) jelzett ellenanyagokkal. Ezzel egyidejűleg citotoxicitás-méréseket is végeznek (például propídium-jodiddal) annak felméréséhez, hogy a citotoxikus koncentrációknál alacsonyabb koncentráció mellett fokozódik-e a CD86 felületi marker expressziója. Meghatározzák a CD86 felületi marker oldószeres/vivőanyagos kontrollhoz viszonyított stimulációs indexét (S.I.), amit felhasználnak az előrejelzési modellben (lásd a 19. pontot) a bőrszenzibilizáló és nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetésének alátámasztására.

A Jártasság Bizonyítása

8. A B.71. vizsgálati módszer e függelékben ismertetett vizsgálatának rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak a 2.2. függelékben felsorolt tíz jártassági tesztanyag in vitro módszerekre vonatkozó bevált gyakorlatokkal összhangban történő felhasználásával igazolniuk kell szakmai jártasságukat (11). Ezenfelül a vizsgálat felhasználóinak történeti adatbázist kell fenntartaniuk, amely tartalmazza a reaktivitási tesztekből (lásd a 11. pontot), valamint a pozitív és az oldószeres/vivőanyagos kontrollokból (lásd a 15–16. pontot) származó adatokat, ezekkel az adatokkal igazolva a vizsgálat laboratóriumon belüli hosszú távú reprodukálhatóságát.

Eljárás

9. Ez a vizsgálat az állatkísérletek alternatív módszereire vonatkozó adatbázis-szolgáltatás (DB-ALM) U-SENS™-t érintő 183. protokollján (12) alapul. Az U-SENS™ vizsgálat laboratóriumi végrehajtása és igénybevétele során alkalmazni kell a szabványműveleti eljárásokat. Az U-SENS™ vizsgálat automatizált rendszerrel is elvégezhető, ha például a 2.2. függelékben felsorolt jártassági tesztanyagok vizsgálatával kimutatták, hogy hasonló eredményekre vezet. Az alábbiakban az U-SENS™ főbb összetevőinek és eljárásainak leírása található.

Sejtek előkészítése

10. Az U-SENS™ vizsgálat végrehajtásához az U937 humán hisztiocitikus limfóma sejtvonalat (13) kell használni. Ajánlatos a (CRL1593.2 klón) sejteket egy megfelelő minősítéssel rendelkező sejtbankból, például az Amerikai Fajtakultúra Gyűjteményből beszerezni.

11. Az U937 sejteket 10 % magzati borjú szérummal (FCS), 2 mM L-glutaminnal, 100 egység/ml penicillinnel és 100 µg/ml sztreptomicinnel kiegészített RPMI-1 640 tápoldatban (teljes tápoldat), valamint 37 °C-os, 5 %-os CO_2-tartalmú és vízgőzzel telített környezetben kell tenyészteni. Az U937 sejteket 2 vagy 3 naponta 1,5 vagy 3×10^5 sejt/ml sűrűségben rutinszerűen passzálják. A sejtsűrűség nem lépheti túl a 2×10^6 sejt/ml mennyiséget, a tripankék festékkizárásos teszttel mért sejtéletképességnek pedig legalább 90 %-osnak kell lennie (ez a felolvasztást követő első passzálásra nem vonatkozik). A vizsgálatban való felhasználásuk előtt a sejtek, a magzati borjú szérum és az ellenanyagok minden tételét egy reaktivitási teszt során minősíteni kell. A sejtek reaktivitási tesztjét a pozitív kontrollanyaggal, a pikrilszulfonsavval (2,4,6-trinitro-benzol-szulfonsav: TNBS) (CAS-száma: 2 508-19-2, legalább 99 %-os tisztaságban) és a negatív kontrollanyaggal, a tejsavval (LA) (CAS-száma: 50-21-5, legalább 85 %-os tisztaságban) kell végrehajtani, legalább egy héttel a felolvasztásukat követően. A reaktivitási tesztben mindkét kontrollanyag esetén hat végső koncentrációt kell tesztelni (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 µg/ml és tejsav: 1, 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml). A teljes tápoldatban feloldott TNBS-nak a CD86 pozitív és koncentrációfüggő válaszát kell előidéznie (pl. amikor egy pozitív eredményt, vagyis legalább 150-es CD86 S.I. értéket adó koncentrációt követő koncentrációérték a CD86 ennél magasabb S.I. értékét váltja ki), a teljes tápoldatban feloldott tejsavnak pedig a CD86 negatív válaszát kell előidéznie (lásd a 21. pontot). A vizsgálathoz kizárólag a reaktivitási tesztben 2 alkalommal megfelelt sejttételek használhatók. A sejtek a felolvasztásukat követően hét hétig szaporíthatók. A sejteket legfeljebb 21 alkalommal szabad passzálni. A reaktivitási tesztet a 18-22. pontban leírt eljárások szerint kell végrehajtani.

12. A vizsgálathoz az U937 sejteket vagy 3×10^5 sejt/ml vagy 6×10^5 sejt/ml sűrűségben átoltják, majd sejttenyésztő lombikban az előbbi esetben 2 napig, az utóbbiban pedig 1 napig előtenyésztik. A fentiektől eltérő előtenyésztési körülmények is alkalmazhatók, ha megfelelő tudományos indokolással támasztják alá alkalmazásukat, és ha például a 2.2. függelékben felsorolt jártassági tesztanyagok vizsgálatával kimutatták, hogy hasonló eredményekhez vezetnek. A vizsgálat napján a sejttenyésztő lombikból begyűjtött sejteket frissen készített tápfolyadékban 5×10^5 sejt/ml sűrűségben újraszuszpendálják. Ezt követően a sejteket egy 96 lyukú, lapos fenekű lemezre helyezik 100 µl mennyiségben (lyukanként $0,5 \times 10^5$ sejt végső sejtsűrűségben).

A vizsgálati vegyi anyagok és a kontrollanyagok előkészítése

13. A vizsgálat előtt felmérik az anyagok oldhatóságát. Ebből a célból a vizsgálati vegyi anyagokat 50 mg/ml koncentrációban feloldják vagy stabilan diszpergálják teljes tápoldatban, mint az első számú oldószer választás, vagy dimetil-szulfoxidban (DMSO, ≥ 99 %-os tisztaságban), mint második oldószer/vivőanyag választás, ha a vizsgálati vegyi anyag a teljes tápoldatos oldószerben/vivőanyagban nem oldható. A vizsgálati vegyi anyagot a vizsgálathoz 0,4 mg/ml végső koncentrációban oldják fel a teljes tápoldatban, amennyiben a vegyi anyag oldható ebben az oldószerben/vivőanyagban. Ha a vegyi anyag csak DMSO-ban oldható, akkor 50 mg/ml-es koncentrációban oldják fel. A fentiektől eltérő oldószerek/vivőanyagok megfelelő tudományos indokolással szintén használhatók. Figyelembe kell venni azt is, hogy a vizsgálati vegyi anyag mennyire stabil a végső oldószerben/vivőanyagban.

14. A vizsgálati vegyi anyagokat és a kontrollanyagokat a vizsgálat napján kell előkészíteni. Mivel dózisbehatároló vizsgálatra nem kerül sor, az első vizsgálatmenetben 6 végső koncentrációt kell vizsgálni (1, 10, 20, 50, 100 és 200 µg/ml) a megfelelő oldószerben/vivőanyagban, amely vagy a teljes tápoldat, vagy 0,4 % DMSO-t tartalmazó tápoldat. A további vizsgálatmenetekben a megfelelő oldószerben/vivőanyagban legalább 4 munkaoldatot (vagyis legalább 4 koncentrációt) kell készíteni a vizsgálati vegyi anyagokból 0,4 mg/ml-től kezdve teljes tápoldat használata esetén, vagy 50 mg/ml-től kezdve DMSO használata esetén. A munkaoldatokat végül felhasználják a kezeléshez, ehhez a további kétszeres hígítás (12) érdekében a lemezbe helyezett munkaoldat térfogatával megegyező térfogatú U937 sejtszuszpenziót (lásd a fenti 11. pontot) adagolnak a munkaoldatokhoz. Az esetleges további vizsgálatmenetekben alkalmazott legalább 4 koncentrációt az előző vizsgálatmenetek eredményei alapján határozzák meg (8). A következő végső koncentrációértékek használhatók: 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 és 200 µg/ml. A maximális végső koncentráció a 200 µg/ml. Amennyiben a CD86 már 1 µg/ml koncentrációnál pozitív választ eredményez, akkor a 0,1 µg/ml koncentráció értékelésével megkeresik a vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációját, amely nem indukál pozitív küszöbérték feletti CD86 kifejeződést. Ha a CD86 kifejeződés során pozitív koncentráció-válasz figyelhető meg, minden vizsgálatmenetben ki kell számolni az EC_{150} értéket (ez a vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amelynél a CD86 eléri a pozitív besoroláshoz szükséges 150 %-os küszöbértéket, lásd a 19. pontot). Amikor a vizsgálati vegyi anyag által előidézett

pozitív CD86 válasz nem hozható összefüggésbe a koncentrációval, akkor előfordulhat, hogy az U-SENS™-re vonatkozó 183. sz. DB-ALM protokollban leírtak szerint (12) az EC_{150} érték a vizsgálat szempontjából nem releváns. Amikor csak lehetséges, minden vizsgálatmenetben meg kell határozni CV70 értéket (12) (ez a vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amelynél a citotoxicitás eléri a 70 %-os küszöbértéket, lásd a 19. pontot). Annak megállapításához, hogy a CD86 expresszió növekedése összefüggésben áll-e a koncentráció növekedésével, a használható koncentrációk közül kiválasztott koncentrációértékeknek egyenletesen kell eloszlaniuk az EC_{150} (vagy a legmagasabb, még negatív eredményhez vezető, nem citotoxikus koncentráció) és a CV70 (vagy a megengedett legmagasabb koncentráció, vagyis 200 μg/ml) között. Vizsgálatmenetenként legalább 4 koncentrációt kell vizsgálni, amelyek közül legalább kettőnek meg kell egyeznie az előző vizsgálatmenet(ek)ben alkalmazott koncentrációkkal, hogy összehasonlíthatók legyenek az eredmények.

15. Az U-SENS™ vizsgálatban alkalmazott oldószeres/vivőanyagos kontroll a teljes tápoldat (a teljes tápoldatban feloldott vagy stabilan diszpergált vizsgálati vegyi anyagok esetében) (lásd a 4. pontot) vagy a 0,4 % DMSO-t tartalmazó teljes tápoldat (a DMSO-ban feloldott vagy stabilan diszpergált vizsgálati vegyi anyagok esetében).

16. Az U-SENS™ vizsgálat során használt pozitív kontrollanyag a TNBS (lásd a 11. pontot), amelyet teljes tápoldatban készítenek el. A CD86 expresszió mérésénél pozitív kontrollanyagként használt TNBS-t egyetlen végső (50 μg/ml) koncentrációban vizsgálják a lemezen, amely 70 % feletti sejtéletképességet biztosít. Ahhoz, hogy 50 μg/ml koncentrációjú TNBS kerüljön a lemezre, teljes tápoldatban elkészítik a TNBS 1 M (azaz 293 mg/ml) koncentrációjú törzsoldatát, majd a törzsoldatot teljes tápoldattal a 2 930-szorosára hígítva elkészítik a 100 μg/ml koncentrációjú munkaoldatot. Negatív kontrollanyagként tejsavat (LA, CAS-száma: 50-21-5) kell alkalmazni, teljes tápoldatban 200 μg/ml koncentrációban feloldva (amelyet 0,4 mg/ml koncentrációjú törzsoldatból készítenek el). Minden vizsgálatmenet valamennyi lemezén a teljes tápoldatból álló kezeletlen kontrollt, az oldószeres/vivőanyagos kontrollt, a negatív és a pozitív kontrollt egyaránt triplikátumban kell elkészíteni (12). Alkalmazhatók más, megfelelő pozitív kontrollok is, ha rendelkezésre állnak dokumentált adatok hasonló vizsgálatmenet-elfogadhatósági kritériumok származtatásához. A vizsgálatmenet elfogadhatósági kritériumai megegyeznek a vizsgálati vegyi anyag elfogadhatósági kritériumaival (lásd a 12. pontot).

A vizsgálati vegyi anyagok és a kontrollanyagok alkalmazása

17. A 14–16. pontban leírt módon elkészített oldószeres/vivőanyagos kontrollt vagy munkaoldatokat 1: 1 térfogatszázalék arányban összekeverik a 96 lyukú lapos fenekű lemezen elkészített sejtszuszpenziókkal (lásd a 12. pontot). A kezelt lemezeket ezt követően 45 óráig (±3 óra) 37 °C-on 5 % CO_2 jelenlétében inkubálják. Inkubálás előtt a lemezeket félig áteresztő membránnal lezárják, hogy megelőzzék az illékony vizsgálati vegyi anyagok elpárolgását és a vizsgálati vegyi anyagokkal kezelt sejtek közötti keresztszennyeződés kialakulását (12).

Sejtfestés

18. A 45 órás (±3 óra) inkubálást követően a sejteket V-aljú mikrotiterlemezekbe helyezik át és centrifugálással kinyerik őket. A vizsgálat kimenetelét zavaró oldhatósági problémát jelez, ha a 45 ±3 órás kezelés utáni inkubálást követően (még sejtfestés előtt) mikroszkóp alatt kristályok vagy cseppek figyelhetők meg. A felülúszót eltávolítják, a maradék sejteket pedig egyszer átmossák 100 μl jéghideg, 5 % magzati borjú szérummal kiegészített, foszfátpuffert tartalmazó sóoldattal (festő pufferrel). A centrifugálást követően a sejteket 100 μl festő pufferben újraszuszpendálják, majd 30 percen keresztül, 4 °C-on, fénytől védve megfestik 5 μl (pl. 0,25 μg) FITC-vel jelzett anti-CD86 vagy egér IgG1 (izotípus) ellenanyagokkal. Az U-SENS™-re vonatkozó 183. sz. DB-ALM protokollban (12) leírt ellenanyagokat kell használni (a CD86 esetében: BD-PharMingen #5556 57 Fun-1 klón vagy Caltag/Invitrogen #MHCD8601 BU63 klón; az IgG1 esetében: BD-PharMingen #5557 48 vagy Caltag/Invitrogen #GM4992). A vizsgálat kidolgozói által szerzett tapasztalatok arra utalnak, hogy az ellenanyagok fluoreszcencia-intenzitása a különböző tételeknél általában konzisztens. A vizsgálathoz használhatók a reaktivitási tesztben megfelelt egyéb ellenanyag klónok vagy forgalmazók is (lásd a 11. pontot). A legmegfelelőbb vizsgálati koncentráció meghatározásához azonban a felhasználók fontolóra vehetik az ellenanyagok saját laboratóriumi körülményeik mellett történő titrálását. Más detektálási rendszerek, többek között

fluorokrómmal jelzett anti-CD86 ellenanyagok is alkalmazhatók, amennyiben például a 2.2. függelékben felsorolt jártassági tesztanyagok tesztelésével kimutatták, hogy a FITC-vel összekapcsolt ellenanyagokhoz hasonló eredményekre vezetnek. Miután 100 µl festő pufferrel kétszer, 100 µl jéghideg PBS-sel egyszer átmosták a sejteket, újraszuszpendálják őket jéghideg PBS-ben (pl. 125 µl-ben, ha a mintákat manuálisan, csövenként elemzik, vagy 50 µl-ben, ha automatikus mintavevő lemezt használnak), majd propídium-jodid oldatot adnak hozzájuk (3 µg/ml végső koncentrációban). Más citotoxicitási markerek – például 7-amino-aktinomicin D (7-AAD) vagy tripankék – is alkalmazhatók, amennyiben az alternatívaként használt festékről például a 2.2. függelékben felsorolt jártassági tesztanyagok vizsgálatával kimutatták, hogy a propídium-jodidhoz hasonló eredményekre vezet.

Áramlási citometria elemzés

19. A CD86 expressziójának mértékét és a sejtéletképességet áramlási citometriával elemzik. A sejteket a méretük (FSC, előrefelé irányuló szórás) és granuláltságuk (SCC, oldalra irányuló szórás) alapján felhődiagramon (logaritmikus skálán) ábrázolják, amely lehetővé teszi az első kapun (R1) kiválasztott sejtpopuláció egyértelmű azonosítását és a sejttöredékek eltávolítását. Lyukanként összesen 10 000 célsejt adatait gyűjtik össze az R1 kapuzás során. Az azonos R1 kapunál mért sejteket FL3 vagy FL4/SSC arányt vizsgáló felhődiagramon jelenítik meg. Az élő sejteket egy második, R2 kapu elhelyezésével különítik el, amelynek segítségével kiválasztják a propídium-jodid negatív sejtpopulációt (FL3 vagy FL4 csatorna). A sejtéletképességet az alábbi egyenlet alapján kalkulálja ki a citométer elemzőprogramja. Alacsony sejtéletképességnél az elhalt sejtekkel együtt akár 20 000 sejt adatait is összegyűjthetik. Ennek alternatívája lehet az, amikor az adatokat az elemzés elindításától számítva egy percen át gyűjtik.

$$Sejtéletképesség = \frac{élő\ sejtek\ száma}{összegyűjtött\ sejtek\ száma\ összesen} \times 100$$

Ezt követően megmérik az R2 kapuval kiválasztott élő sejtek közötti FL1 pozitív sejtek arányát (R1-en belül). Az élő sejteken (R2) a CD86 sejtfelületi kifejeződését FL1/SSC arányt vizsgáló felhődiagrammal elemzik.

A teljes tápoldatot/IgG1-et tartalmazó lyukak esetében az elemző markert a fő sejtpopuláció közelébe helyezik, hogy a teljes tápoldat kontrollok IgG1 ellenanyagai a 0,6–0,9 %-os céltartományba essenek.

A színinterferenciát az FITC-vel jelzett IgG1 felhődiagram eltolódása jelzi (IgG1 FL1 S.I. mértani középértéke ≥ 150 %).

A kezeletlen vagy 0,4 %-os DMSO-val kezelt kontrollsejtek és a vegyi anyaggal kezelt sejtek CD86 expressziójának stimulációs indexét (S.I.) az alábbi egyenlettel számítják ki:.

$$S.I. = \frac{CD86^{+}\text{kezelt sejtek \%} - a - IgG1^{+}\textit{kezelt sejtek \%} - a}{CD86^{+}\text{kontrollsejtek \%} - a - IgG1^{+}\text{kontrollsejtek \%}} \times 100$$

A kezeletlen kontrollsejtek $IgG1^{+}$ aránya: az elemző markerrel jelölt FL1 pozitív IgG1 sejtek aránya (elfogadhatósági tartomány: legalább 0,6 % és kisebb mint 1,5 %, lásd a 22. pontot) az élő kezeletlen sejtekhez képest.

A kontroll/kezelt sejtek $IgG1^{+}/CD86^{+}$ aránya: az FL1 pozitív IgG1/CD86 sejtek elemző marker áthelyezése nélkül mért aránya az élő kontroll/kezelt sejtekhez képest.

Adatok És Jelentés

Az adatok kiértékelése

20. Az U-SENS™ vizsgálatban az alábbi paramétereket kell kiszámítani: CV70 érték, vagyis az a koncentráció, amely az U937 sejtek 70 %-os túlélését eredményezi (30 %-os citotoxicitás) és az EC_{150} érték, vagyis az a koncentráció, amelynél a vizsgálati vegyi anyag 150 %-os CD86 stimulációs indexet (S.I.) idéz elő.

A CV70 értéket logaritmikus-lineáris interpolációval számítják ki, az alábbi egyenlet alapján:

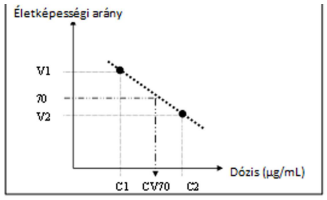
CV70 = C1 + [(V1 – 70) / (V1 – V2) * (C2 – C1)]

ahol:

V1 = a 70 % feletti sejtéletképesség minimumértéke

V2 = a 70 % alatti sejtéletképesség maximumértéke

C1 és C2 = a V1 és V2 sejtéletképességet előidéző koncentráció



A CV70 érték más módon is meghatározható, amennyiben (pl. a jártassági tesztanyagok tesztelésével) igazolható, hogy az nem befolyásolja az eredményt.

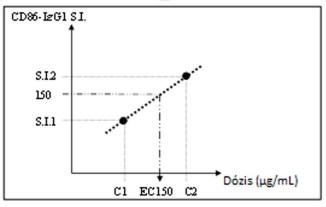
A EC150 értéket logaritmikus-lineáris interpolációval számítják ki, az alábbi egyenlet alapján:

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

ahol:

C1 az a µg/ml-ben megadott legmagasabb koncentráció, amelynél a CD86 stimulációs indexe kisebb mint 150 % (S.I. 1);

C2 az a µg/ml-ben megadott legalacsonyabb koncentráció, amelynél a CD86 stimulációs indexe legalább 150 % (S.I. 2).



Az EC150 és CV70 érték kiszámolása

— minden vizsgálatmenet esetében: az egyes EC150 és CV70 értékek annak meghatározására szolgálnak, hogy a CD86 expressziójának növekedése összefüggésben áll-e a koncentráció növekedésével (lásd a 14. pontot),

— az átlagos sejtéletképesség alapján meghatározzák az összesített CV70 értéket (12),

— a CD86 értékek átlagos stimulációs indexe alapján meghatározzák az összesített EC150 értéket, amely szerint az U-SENS™ vizsgálatban előrejelzik a vizsgálati vegyi anyag POZITÍV besorolását (lásd a 21. pontot) (12).

Előrejelzési modell

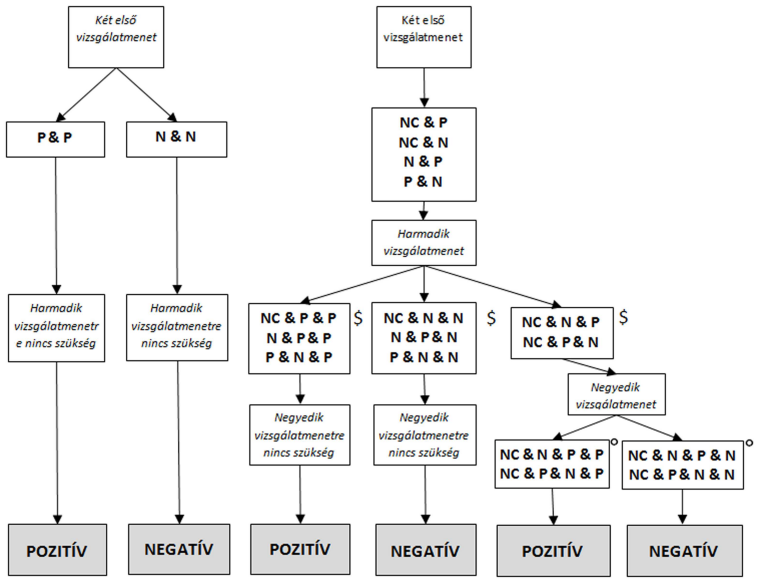
21. A CD86 expressziós mérésnél minden vizsgálati vegyi anyagot legalább négy koncentrációban és legalább két független (különböző napokon végzett) vizsgálatmenetben tesztelnek, amelyek alapján meghatározzák a (NEGATÍV vagy POZITÍV) előrejelzést.

— Az U-SENS™ vizsgálat egyes vizsgálatmeneteinek eredménye akkor negatív (a továbbiakban N), ha a CD86 stimulációs indexe valamennyi nem citotoxikus koncentrációban (amikor a sejtéletképesség ≥ 70 %) kisebb mint 150 %, és ha nem állt elő a vizsgálat kimenetelét zavaró körülmény (citotoxicitási, oldhatósági interferencia: lásd a 18. pontot, vagy színinterferencia: lásd a 19. pontot, függetlenül az interferenciát előidéző nem citotoxikus koncentrációktól). Minden más esetben: a CD86 stimulációs indexe eléri vagy meghaladja a 150 %-ot és/vagy interferenciát figyeltek meg, akkor az U-SENS™ egyes vizsgálatmeneteinek eredménye pozitív (a továbbiakban P).

— Az U-SENS™ vizsgálat előrejelzése akkor tekinthető NEGATÍVNAK, ha legalább két független vizsgálatmenet negatív (N) eredménnyel zárult (1. ábra). Ha az első két vizsgálatmenet mindegyike negatív (N) eredményre vezetett, az U-SENS™ vizsgálat előrejelzése NEGATÍVNAK minősül, és harmadik vizsgálatmenetre nincs szükség.

— Az U-SENS™ vizsgálat előrejelzése akkor tekinthető POZITÍVNAK, ha legalább két független vizsgálatmenet pozitív (P) eredménnyel zárult (1. ábra). Ha az első két vizsgálatmenet mindegyike pozitív (P) eredményre vezetett, az U-SENS™ vizsgálat előrejelzése POZITÍVNAK minősül, és harmadik vizsgálatmenetre nincs szükség.

— Mivel dózisbehatároló vizsgálatra nem kerül sor, ez alól kivételt képez az az eset, amikor az első vizsgálatmeneten a CD86 stimulációs indexe csak a legmagasabb nem citotoxikus koncentrációban éri el vagy haladja meg a 150 %-ot. Ekkor a vizsgálatmenetet NEM MEGGYŐZŐNEK (NC) kell tekinteni, és újabb vizsgálatmenetekben meg kell vizsgálni további, a legmagasabb nem citotoxikus koncentráció és a legalacsonyabb citotoxikus koncentráció közé eső koncentrációértékeket (lásd a 20. pontot). Amennyiben valamely vizsgálatmenetet nem meggyőzőnek értékelnek, legalább két további vizsgálatmenetet kell lefolytatni, illetve egy negyediket is, ha a 2. és a 3. vizsgálatmenet eredményei nem egyeznek (független vizsgálatban N és/vagy P) (1. ábra). A további vizsgálatmenetek abban az esetben is pozitívnak minősülnek, ha a CD86 expressziója csak egyetlen nem citotoxikus koncentrációban éri el vagy haladja meg a 150 %-ot, mivel a koncentrációértékeket az adott vizsgálati vegyi anyagra igazították. A végső előrejelzés a három vagy négy független vizsgálatmenet többségi eredményén alapul (vagyis 3-ból 2 vagy négyből 2 eredményén) (1. ábra).



1. ábra: Az U-SENS™ vizsgálatban alkalmazott előrejelzési modell. Az U-SENS™ vizsgálat előrejelzését integrált értékelési és vizsgálati megközelítés keretében, valamint a 4. pont és az Általános bevezetés 7., 8. és 9. pontjának rendelkezéseivel összhangban kell figyelembe venni.

N: olyan vizsgálatmenet, amelyben nem figyeltek meg sem pozitív CD86 expressziót, sem interferenciát;

P: olyan vizsgálatmenet, amelyben pozitív CD86 expressziót és/vagy interferenciá(ka)t figyeltek meg;

NC: nem meggyőző. Az első vizsgálatmenet akkor minősül nem meggyőzőnek, ha a CD86 csak a legmagasabb nem citotoxikus koncentrációban pozitív.

#: amennyiben csak az első vizsgálatmenetet nem meggyőzőnek (NC) nyilvánítják, automatikusan szükség van egy harmadik vizsgálatmenetre is, hogy 3 független vizsgálatmenetből legalább 2-ben pozitív (P) vagy negatív (N) többséget lehessen elérni.

$: a keretek a három vizsgálatmenetből származó eredmények releváns kombinációit jelenítik meg az első két vizsgálatmenet fenti keretben látható eredményei alapján.

°: a keretek a négy vizsgálatmenetből származó eredmények releváns kombinációit jelenítik meg az első három vizsgálatmenet fenti keretben látható eredményei alapján.

Elfogadhatósági kritériumok

22. Az U-SENS™ vizsgálat alkalmazásakor az alábbi elfogadhatósági kritériumoknak kell teljesülniük (12).

— A 45 ±3 órás expozíciós időtartam végére a triplikátumban vizsgált kezeletlen U937 sejtek átlagos életképességének meg kell haladnia a 90 %-ot, és a CD86 expressziója nem tolódhat el. A kezeletlen U937 sejtek CD86 bazális expressziójának a legalább 2 % és legfeljebb 25 % közötti tartományban kell lennie.

— Ha DMSO-t használnak oldószerként, a DMSO vivőanyagos kontroll érvényességét úgy mérik fel, hogy meghatározzák a DMSO kezeletlen sejtekhez viszonyított stimulációs indexét, ugyanakkor a triplikátumban vizsgált sejtek átlagos életképességének meg kell haladnia a 90 %-ot. A DMSO vivőanyagos kontroll akkor tekinthető érvényesnek, ha a triplikátumban vizsgált CD86 stimulációs indexének átlaga nem éri el a kezeletlen U937 sejtek triplikátumban vizsgált CD86 S.I. átlagának 250 %-át.

— A vizsgálatmenetek akkor minősülnek érvényesnek, ha a kezeletlen U937 sejtek három IgG1 értéke közül minimum kettő legalább 0,6 % és kisebb mint 1,5 %.

— A párhuzamosan vizsgált negatív kontroll (tejsav) akkor tekinthető érvényesnek, ha a három replikátumból legalább kettő negatív (CD86 S.I. < 150 %) és nem citotoxikus (sejtéletképesség ≥ 70 %).

— A pozitív kontroll (TNBS) akkor érvényes, ha a három replikátumból legalább kettő pozitív (CD86 S.I. ≥ 150 %) és nem citotoxikus (sejtéletképesség ≥ 70 %).

Vizsgálati jegyzőkönyv

23. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag

Egy összetevőből álló anyag

— kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;

— fizikai megjelenés, teljes tápoldatban való oldhatóság, DMSO-ban való oldhatóság, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;

— tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;

— vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— vizsgált koncentráció(k);

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;

— az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében.

Több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítójával (lásd fent), tisztaságával, mennyiségi előfordulásával és releváns fizikai-kémiai tulajdonságaival (lásd fent) jellemezve; amennyiben rendelkezésre állnak;

— fizikai megjelenés, teljes tápoldatban való oldhatóság, DMSO-ban való oldhatóság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;

— molekulatömeg vagy látszólagos molekulatömeg ismert összetételű keverékek/polimerek esetén, vagy a vizsgálat lebonyolítása szempontjából releváns egyéb információ;

— vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— vizsgált koncentráció(k);

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;

— az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében.

Kontrollok

Pozitív kontroll

— kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;

— fizikai megjelenés, DSMO-ban való oldhatóság, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak és szükség szerint;

— tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;

— vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— vizsgált koncentráció(k);

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;

— adott esetben hivatkozás a pozitív történeti kontrollok eredményeire, amelyek a vizsgálatmenet elfogadhatósági kritériumainak való megfelelőséget bizonyítják.

Negatív és oldószeres/vivőanyagos kontroll

— kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;

— tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;

— fizikai megjelenés, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben a vizsgálati iránymutatásban említett kontroll oldószerektől/vivőanyagoktól eltérő oldószerek/vivőanyagok használatosak, és amennyiben rendelkezésre állnak;

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;

— az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében.

Vizsgálati körülmények

— a megbízó, a vizsgálatot végző laboratórium és a vizsgálatvezető neve és címe;

— az alkalmazott vizsgálat leírása;

— használt sejtvonal, annak tárolási feltételei és eredete (például az a létesítmény, ahonnan beszerezték);

— az alkalmazott áramlási citometria rendszer (pl. modell) és annak műszerbeállításai, valamint az alkalmazott ellenanyagok és citotoxicitási markerek;

— a vizsgálat végrehajtásában való, a jártassági tesztanyagok vizsgálatával megszerzett laboratóriumi jártasság bizonyítására alkalmazott eljárás és a vizsgálat idővel reprodukálható teljesítményének bizonyítására alkalmazott eljárás, pl. a dokumentált kontrolladatok és/vagy a dokumentált reaktivitási vizsgálatok adatai.

A vizsgálat elfogadhatósági kritériumai

— az oldószeres/vivőanyagos kontroll során kapott sejtéletképesség és CD86 stimulációs index az elfogadhatósági tartományokkal való összevetésben;

— a pozitív kontroll során kapott sejtéletképesség és stimulációs index az elfogadható tartományokkal való összevetésben;

— a vizsgálati vegyi anyag minden vizsgált koncentrációjában mért sejtéletképesség.

A vizsgálat menete

— az alkalmazott vizsgálatmenetek száma;

— a vizsgálati vegyi anyag koncentrációi, alkalmazása és a használt expozíciós idő (ha eltér az ajánlottól);

— az expozíció időtartama;

— az alkalmazott értékelési és döntési kritériumok leírása;

— a vizsgálati eljárás bármilyen változtatásának leírása.

Eredmények

— az egyes vizsgálatmenetekben a vizsgálati vegyi anyaggal és a pozitív kontrollal kapott eredmények táblázatba foglalása, feltüntetve a CV70 értéket (ha alkalmazandó), a stimulációs indexet, a sejtéletképességi értékeket, az EC_{150} értéket (ha alkalmazandó), valamint a vizsgálati vegyi anyag előrejelzési modell szerinti besorolását;

— adott esetben bármely más releváns észrevétel leírása.

Az eredmények tárgyalása

— az U-SENS™ vizsgálattal kapott eredmények tárgyalása;

— a vizsgálat eredményeinek integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében történő tárgyalása, amennyiben rendelkezésre állnak más releváns információk.

Következtetések

SZAKIRODALOM

(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. A dokumentum az alábbi helyről elérhető: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 28 178 EN; doi 10.2 787/8157 37. Elérhető a következő címen: [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 28 553 EN; doi 10.2 760/5889 55. Elérhető a következő címen:https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing.

(5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014.*Cosmetics* 3, 14.

(6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.

(8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.

(9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.

(10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1 683-1 696.

(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. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen:http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33pp. A dokumentum az alábbi helyről elérhető: [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. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen:http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(15) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: United Nations Publications. Elérhető a következő címen:http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(16) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen:http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. Elérhető a következő címen:https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

2.1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: a vizsgálattal kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálat megfelelőségének mutatója, és relevanciájának egyik szempontja. A kifejezés gyakran használatos az „egyezés" szó megfelelőjeként, amely arra utal, hogy egy adott vizsgálat milyen arányban szolgáltat helyes eredményeket (14).

Káros kimeneti út (Adverse Outcome Pathway, AOP): valamely megcélzott vegyi anyag vagy hasonló vegyi anyagok csoportjának kémiai szerkezetéből kiinduló, a molekuláris kiváltó eseményen keresztül az érintett in vivo eredményig végbemenő eseménysorozat (15).

CD86 koncentrációfüggő válasz: koncentrációfüggésről (vagy koncentráció válaszról) akkor lehet szó, amikor egy pozitív választ (CD86 S.I. ≥ 150) kiváltó koncentrációt követő koncentráció növeli a CD86 stimulációs indexét.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

CV70: 70 %-os sejtéletképességet eredményező becsült koncentráció.

Eltolódás: eltolódásnak nevezik azt, ha i) a kezeletlen kontroll 3. replikátumának kiigazított $CD86^+$ értéke nem éri el a kezeletlen kontroll 1. és 2. replikátumánál mért kiigazított $CD86^+$ értékek átlagának 50 %-át; és ha ii) a negatív kontroll 3. replikátumának kiigazított $CD86^+$ értéke nem éri el a negatív kontroll 1. és 2. replikátumánál mért kiigazított $CD86^+$ értékek átlagának
50 %-át.

EC150: a CD86 expressziója során 150 %-os stimulációs indexet eredményező becsült koncentrációk.

Áramlási citometria: citometrikus technika, amelyben a folyadékáramban szuszpendált sejtek egyenként áthaladnak egy fókuszált gerjesztő fénynyalábon, amely a sejtekre és összetevőire jellemző minták szerint szóródik szét; a sejteket gyakran fluoreszcens markerekkel jelölik meg, amelyek az abszorbeált fényt eltérő frekvenciákon bocsátják ki.

Veszély: valamely anyag vagy helyzet azon sajátossága, hogy káros hatásokat képes előidézni az élő szervezet, rendszer vagy (al)populáció anyagnak való expozíciójakor.

Integrált vizsgálati és értékelési megközelítés: valamely vegyi anyag vagy vegyianyag-csoport veszélyeinek azonosításához (potenciál), jellemzéséhez (hatáserősség) és/vagy biztonsági értékeléséhez (potenciál, hatáserősség és expozíció) alkalmazott strukturált megközelítés, amely stratégiai szempontból beépít és mérlegel minden olyan releváns adatot, amely hozzájárul a lehetséges veszélyre és/vagy kockázatra és/vagy a további célirányos és ezért minimális vizsgálat szükségességére vonatkozó szabályozói döntéshozatalhoz.

Keverék: két vagy több anyagot tartalmazó elegy vagy oldat.

Egy összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben az egyik fő összetevő legalább 80 tömegszázalékban van jelen.

Több összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben egynél több fő összetevő legalább 10 tömegszázalékban, de 80 tömegszázalékot nem meghaladó koncentrációban van jelen. A több összetevőből álló anyag gyártási folyamat eredménye. A keverék és a több összetevőből álló anyag között az a különbség, hogy a keverék két vagy több anyag összekeverésével, kémiai reakció nélkül jön létre. A több összetevőből álló anyag kémiai reakció eredménye.

Pozitív kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó anyaggal kezelt replikátum. Annak biztosítása érdekében, hogy a pozitív kontrollban jelentkező hatás időbeli változását fel lehessen mérni, a pozitív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Pre-haptének: abiotikus átalakulás, például oxidáció révén szenzibilizálóvá váló vegyi anyagok.

Pro-haptének: olyan vegyi anyagok, amelyek enzimatikus aktivációt igényelnek bőrszenzibilizáló hatásuk kifejtéséhez.

Relevancia: a vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálat pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (14).

Megbízhatóság: a vizsgálat laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. Megállapítása a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság, valamint a laboratóriumon belüli megismételhetőség kiszámításával történik (14).

Vizsgálatmenet: egy vizsgálatmenet során egy vagy több vizsgálati vegyi anyagot vizsgálnak egy párhuzamos oldószeres/vivőanyagos kontrollal és egy pozitív kontrollal.

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálat helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (14).

S.I.: stimulációs index. A vegyi anyaggal kezelt sejteknél mért fluoreszcencia-intenzitás mértani középértékének az oldószerrel kezelt sejtekéhez viszonyított relatív értéke.

Oldószeres/vivőanyagos kontroll: valamely vizsgálati rendszernek a vizsgálati vegyi anyagon kívüli összes összetevőjét tartalmazó kezeletlen minta, amely azonban magában foglalja az alkalmazott oldószert/vivőanyagot. Az ugyanabban az oldószerben/vivőanyagban feloldott vagy stabilan diszpergált vizsgálati vegyi anyaggal kezelt minták esetében a kiindulási érték létrehozásához használatos. Párhuzamos tápoldatos kontrollal elvégzett vizsgálata esetén ez a minta azt is bizonyítja, hogy az oldószer/vivőanyag kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati rendszerrel.

Specificitás: a vizsgálat elvégzésével helyesen besorolt összes negatív/inaktív vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (14).

Festő puffer: 5 % magzati borjú szérummal kiegészített foszfátpuffert tartalmazó sóoldat.

Anyag: olyan természetes állapotban előforduló vagy gyártási eljárásból származó kémiai elem és vegyületei, amely a stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagot és az alkalmazott eljárásból származó szennyező anyagokat is tartalmazhat, de nem tartalmaz olyan oldószert, amely az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltoztatása nélkül elkülöníthető.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálat alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

A vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete által globálisan harmonizált rendszere (ENSZ-GHS): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (16).

UVCB: ismeretlen szerkezetű vagy változó összetételű, összetett reakcióban keletkezett vagy biológiai eredetű anyagok.

Érvényes vizsgálat: olyan vizsgálat, amely kellően relevánsnak és megbízhatónak minősül egy adott célra, és amely tudományosan megalapozott elveken alapul. Egy-egy vizsgálat abszolút értelemben soha nem érvényes, kizárólag meghatározott céllal összefüggésben (14).

2.2. függelék

JÁRTASSÁGI TESZTANYAGOK

A B.71. vizsgálati módszer e függelékben ismertetett vizsgálatának rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak igazolniuk kell szakmai jártasságukat oly módon, hogy az 1. táblázatban javasolt 10 anyagra vonatkozóan az U-SENS™ vizsgálattal várható előrejelzést helyesen kapják meg, továbbá a 10 jártassági tesztanyag közül legalább 8 esetében referenciatartományba eső CV70 és EC150 értékeket kapnak. A jártassági tesztanyagok kiválasztása oly módon történt, hogy az a bőrszenzibilizáció veszélye esetén bekövetkező különféle válaszreakciók tartományát illetően reprezentatív legyen. A kiválasztás többi kritériuma az volt, hogy a vegyi anyagok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők legyenek, azokra vonatkozóan kiváló minőségű in vivo referenciaadatok álljanak rendelkezésre, és az U-SENS™ vizsgálat alapján kiváló minőségű in vitro adatok álljanak rendelkezésre. Az U-SENS™ vizsgálathoz rendelkezésre állnak publikált referenciaadatok is (1) (8).

1. táblázat

Az U-SENS™ vizsgálatban való szakmai jártasság bizonyításához ajánlott anyagok

Jártassági tesztanyagok	CAS-szám	Halmazállapot	In vivo előrejelzés [1]	U-SENS Oldószer/vivőanyag	U-SENS CV70 referencia-tartomány µg/ml-ben [2]	U-SENS EC150 referencia-tartomány µg/ml-ben [2]
4-Fenilén-diamin	106-50-3	Szilárd	Szenzibilizáló (erősen)	Teljes tápoldat [3]	< 30	Pozitív (≤ 10)
Pikril-szulfonsav	2508-19-2	Folyadék	Szenzibilizáló (erősen)	Teljes tápoldat	> 50	Pozitív (≤ 50)
Dietil-maleát	141-05-9	Folyadék	Szenzibilizáló (mérsékelten)	DMSO	10–100	Pozitív (≤ 20)
Rezorcin	108-46-3	Szilárd	Szenzibilizáló (mérsékelten)	Teljes tápoldat	> 100	Pozitív (≤ 50)
Cinnamil-alkohol	104-54-1	Szilárd	Szenzibilizáló (enyhén)	DMSO	> 100	Pozitív (10–100)
4-Allil-anisol	140-67-0	Folyadék	Szenzibilizáló (enyhén)	DMSO	> 100	Pozitív (< 200)
Szaharin	81-07-2	Szilárd	Nem szenzibilizáló	DMSO	> 200	Negatív (> 200)
Glicerin	56-81-5	Folyadék	Nem szenzibilizáló	Teljes tápoldat	> 200	Negatív (> 200)
Tejsav	50-21-5	Folyadék	Nem szenzibilizáló	Teljes tápoldat	> 200	Negatív (> 200)
Szalicilsav	69-72-7	Szilárd	Nem szenzibilizáló	DMSO	> 200	Negatív (> 200)

Rövidítések: CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám.

(1) Az in vivo veszélyekre (és a hatáserősségre) vonatkozó előrejelzés LLNA-adatokon alapul (1) (8). Az in vivo hatáserősség levezetése az ECETOC által javasolt kritériumok segítségével történik (17).

(2) A megfigyelt dokumentált értékek alapján (1) (8).

(3) Teljes tápoldat: 10 % magzati borjú szérummal, 2 mM L-glutaminnal, 100 egység/ml penicillinnel és 100 µg/ml sztreptomicinnel kiegészített RPMI-1640 tápoldat (8).

3. függelék

IN VITRO BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ: IL-8 LUC VIZSGÁLAT

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

1. A sejtfelületi markerek kifejeződését elemző vizsgálatokkal ellentétben az IL-8 Luc vizsgálat egy citokin, az IL-8 dendritikus sejtek aktivációja általi expressziójában előidézett változásokat számszerűsíti. A THP-1 sejtekből származó IL-8 riporter sejtvonalat (THP-G8, amelyet a THP-1 humán monocita akut leukémia sejtvonalból hoztak létre) szenzibilizáló anyagokkal kezelik, majd megmérik az IL-8 kifejeződését (1). Ezt követően a luciferáz kifejeződését felhasználják a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetésének alátámasztására.

2. Az IL-8 Luc vizsgálatot értékelték egy, az Alternatív Módszerek Validálásával Foglalkozó Japán Központ (JaCVAM), a **Gazdasági, Kereskedelmi és Ipari Minisztérium** (METI) és a japán **állatkísérletek alternatív módszereivel foglalkozó társaság (JSAAE)** irányításával végzett validálási tanulmányban (2), amelyet később a JaCVAM és az Egészségügyi, Munkaügyi és Népjóléti Minisztérium (MHLW) égisze alatt, valamint az **alternatív vizsgálati módszerekre vonatkozó nemzetközi együttműködési keret** (ICATM) támogatásával független szakértői értékelésnek vetettek alá (3). A rendelkezésre álló bizonyítékok, valamint a szabályozó hatóságok és az érdekeltek álláspontja alapján az IL-8 Luc vizsgálat egy integrált vizsgálati és értékelési megközelítés részeként hasznosan alkalmazható a bőrszenzibilizáló és nem szenzibilizáló anyagok veszélyességi osztályozás és címkézés céljából történő megkülönböztetésére. Az IL-8 Luc vizsgálatból származó adatok és más információk együttes használatára fellelhetők példák a szakirodalomban (4) (5) (6).

3. Az IL-8 Luc vizsgálatról bebizonyosodott, hogy áthelyezhető a sejttenyésztés és a luciferáz mérése területén tapasztalattal rendelkező laboratóriumokba. A laboratóriumon belüli reprodukálhatóság 87,7 %, a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság pedig 87,5 % (2). A validálási tanulmányból (2) és más közzétett munkákból (1) (6) származó adatok azt jelzik, hogy az LLNA vizsgálati módszerhez képest az IL-8 Luc vizsgálat 143 vegyi anyagból 118-at minősített pozitívnak vagy negatívnak, és 25-öt nem meggyőzőnek, valamint hogy az IL-8 Luc vizsgálat a bőrszenzibilizáló (azaz az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozó) anyagokat 86 %-os (101/118) pontossággal különbözteti meg a nem szenzibilizáló (vagyis az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerint nem besorolt) anyagoktól, 96 % az érzékenysége (92/96), a specifikussága pedig 41 % (9/22). A vizsgálat alábbiakban (az 5. pontban) ismertetett alkalmazási körén kívül eső anyagok kizárása esetén az IL-8 Luc vizsgálat 136 vegyi anyagból 113-at minősített pozitívnak vagy negatívnak, és 23 vegyi anyagot nem meggyőzőnek, így az IL-8 Luc vizsgálat pontossága 89 % (101/113), 96 % az érzékenysége (92/96), míg a specifikussága 53 % (9/17). Az Urbisch és munkatársai (7) által idézett humán adatok felhasználása alapján az IL-8 Luc vizsgálat 90 vegyi anyagból 76-ot minősített pozitívnak vagy negatívnak, és 14 vegyi anyagot nem meggyőzőnek, így pontossága 80 % (61/76), érzékenysége 93 % (54/58), míg a specifikussága 39 % (7/18). A vizsgálat alkalmazási körén kívül eső anyagok kizárása esetén az IL-8 Luc vizsgálat 84 vegyi anyagból 71-et minősített pozitívnak vagy negatívnak, és 13-at nem meggyőzőnek, így pontossága 86 % (61/71), érzékenysége 93 % (54/58), specifikussága pedig 54 % (7/13). Az IL-8 Luc vizsgálat nagyobb valószínűséggel vezet hamis negatív előrejelzésekhez olyan vegyi anyagoknál, amelyeknek alacsony/mérsékelt a bőrszenzibilizáló hatása (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1B. alkategóriába tartozó anyagoknál), mint a rendkívül bőrszenzibilizáló hatást mutató (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1A. alkategóriába tartozó) anyagoknál (6). Ezek az információk összességében azt jelzik, hogy az IL-8 Luc vizsgálat érdemben hozzájárul a bőrszenzibilizáció veszélyének azonosításához. Az IL-8 Luc vizsgálat mint önálló vizsgálat esetében megadott pontossági értékek csak irányadóak, ugyanis a vizsgálatot az integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében más információforrásokkal együtt és az Általános bevezetés 7. és 8. pontjának rendelkezéseivel összhangban kell figyelembe venni. Ezen túlmenően a bőrszenzibilizáció nem állatokon alkalmazott vizsgálatainak értékelésekor nem szabad megfeledkezni arról, hogy az LLNA vizsgálat és más állatkísérletek nem feltétlenül tükrözik teljes egészében az embernél fennálló helyzetet.

4. Az aktuálisan rendelkezésre álló adatok alapján az IL-8 Luc vizsgálatról bebizonyosodott, hogy különféle szerves funkciós csoportokat, reakciómechanizmusokat, (in vivo vizsgálatok során meghatározott) bőrszenzibilizáló hatásokat és fizikai-kémiai tulajdonságokat képviselő vizsgálati vegyi anyagokra alkalmazható (2) (6).

5. Bár az IL-8 Luc vizsgálat során használt oldószer az X-VIVO™ 15, a vizsgálat megfelelően értékelte a 3,5-nél magasabb Log K_{ow} értékkel és 100 μg/ml körüli vízoldékonysággal rendelkező vegyi anyagokat (az EPI Suite™ számításai szerint), és a vízben nehezen oldódó szenzibilizáló anyagokat jobb hatékonysággal detektálja, mint az oldószerként dimetil-szulfoxidot (DMSO) alkalmazó IL-8 Luc vizsgálat (2). Azonban az oldószer 20 mg/ml koncentrációjában nem oldódó vizsgálati vegyi anyagok hamis negatív eredményhez vezethetnek, mivel nem oldhatók X-VIVO™ 15-ben. Ezért az ilyen vegyi anyagok negatív eredményeit figyelmen kívül kell hagyni. Az anhidridek esetében a validációs tanulmány magas hamisnegatív-arányt mutatott ki. Ezen túlmenően a sejtvonal korlátozott metabolikus képessége (8) és a kísérleti körülmények miatt a pro-haptének (metabolikus aktiválást igénylő vegyi anyagok) és a pre-haptének (a levegő oxidáló hatására aktiválódó anyagok) is negatív eredményre vezethetnek a vizsgálat során. Bár a feltételezhető pre-/pro-haptének negatív eredményét elővigyázatosan kell kezelni, az IL-8 Luc vizsgálat az adatbázisában szereplő 11 pre-hapténből 11-et, a 6 pro-hapténből 6-ot és a 8 pre-/pro-hapténből 6-ot helyesen sorolt be (2). A három nem állatokon alkalmazott, pre- és pro-hapténokat észlelni képes vizsgálat (a DPRA, a KeratinoSens™ és a h-CLAT) közelmúltbeli átfogó felülvizsgálata alapján (9), és figyelembe véve, hogy az IL-8 Luc vizsgálatban használt THP-G8 sejtek a h-CLAT vizsgálatban alkalmazott THP-1 sejtekből származnak, az IL-8 Luc vizsgálat más vizsgálatokkal való együttes alkalmazása esetén hozzájárulhat ahhoz, hogy növekedjen a nem állatokon alkalmazott vizsgálatok érzékenysége a pre- és pro-haptének detektálása terén. Az ez idáig vizsgált felületaktív anyagok típusuktól (pl. kationos, anionos vagy nem ionos) függetlenül (hamis) pozitív eredményekhez vezetnek. Végezetül a luciferázzal kölcsönhatásba lépő vegyi anyagok megzavarhatják a luciferáz aktivitását/mérését, látszólagos gátlást vagy megnövekedett lumineszcenciát okozva (10). Beszámoltak például arról, hogy az 1 μM-nél magasabb fitoösztrogén-koncentráció a luciferáz riportergén túlzott aktiválása miatt zavarja a lumineszcencia jeleit más, luciferáz alapú riportergén-vizsgálatokban. Következésképp a magas fitoösztrogén-koncentráció mellett vagy feltehetőleg a luciferáz riportergént a fitoösztrogénhez hasonló mértékben aktiváló vegyületek magas koncentrációja mellett kapott luciferáz-expressziót körültekintően meg kell vizsgálni (11). A fentiek fényében a felületaktív anyagok, az anhidridek és a luciferáz aktivitását zavaró vegyi anyagok kívül esnek a vizsgálat alkalmazási körén. Olyan esetekben, amikor bizonyítékkal igazolható, hogy az IL-8 Luc vizsgálat nem alkalmazható más, konkrét vegyianyag-kategóriákra, a vizsgálatot nem szabad e vegyianyag-kategóriákra alkalmazni.

6. A fentieknek megfelelően az IL-8 Luc vizsgálat elősegíti a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetését. Szükség van további, lehetőleg humán adatokon alapuló kutatásra annak meghatározása érdekében, hogy az IL-8 Luc vizsgálat eredményei – más információforrásokkal együtt mérlegelve – hozzájárulhatnak-e a hatáserősség értékeléséhez.

7. A fogalommeghatározások a 3.1. függelékben találhatók.

A VIZSGÁLAT ELVE

8. Az IL-8 Luc vizsgálat THP-1 humán monocita leukémia sejtvonalat alkalmaz, amely az amerikai típustörzsanyaggyűjteményből szerezhető be (Manassas, VA, USA). Ezt a sejtvonalat felhasználva a Tohokui Egyetem Orvostudományi Karának Bőrgyógyászati Tanszéke létrehozott egy THP-1 származék IL-8 riporter sejtvonalat, a THP-G8-at, amely IL-8 promóterrel szabályozott stabil narancssárga luciferáz (SLO) luciferáz gént és gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) promóterrel szabályozott stabil vörös luciferáz (SLR) luciferáz gént hordoz (1). Ez lehetővé teszi a luciferázgén-indukció kvantitatív mérését, mégpedig az IL-8 és a GAPDH szenzibilizáló vegyi anyagokkal való kezelést követő, sejteken belüli aktivitásának mutatójaként szolgáló – jól bevált fénytermelő luciferáz szubsztrátok által kibocsátott – lumineszcencia észlelése révén.

9. A két színt detektáló vizsgálati rendszer magában foglal egy narancssárga fényt kibocsátó luciferázt (SLO; λmax = 580 nm) (12), amely az IL-8 promóterrel szabályozott génkifejeződést jelzi, és egy vörös fényt kibocsátó luciferázt (SLR; λmax = 630 nm) (13), amely a belső szabályozó promóterrel, a GAPDH-val szabályozott génkifejeződést jelzi. A két luciferáz a d-luciferinnel reakcióba lépve eltérő színt bocsát ki; lumineszcenciájukat egyidejűleg, egylépéses reakció keretében mérik úgy, hogy optikai szűrő használatával elkülönítik a kibocsátást a vizsgálati keveréktől (14) (3.2. függelék).

10. A THP-G8 sejteket 16 órán át kezelik a vizsgálati vegyi anyaggal, majd megmérik az IL-8 promóter aktivitását tükröző SLO luciferázaktivitást (SLO-LA) és a GAPDH promóter aktivitását tükröző SLR luciferázaktivitást (SLR-LA). A rövidítések értelmezésének megkönnyítése érdekében az SLO-LA a továbbiakban IL8LA, az SLR-LA pedig GAPLA néven szerepel. Az 1. táblázat ismerteti az IL-8 Luc vizsgálatban mért luciferázaktivitással kapcsolatos kifejezések leírását. A mért értékek alapján meghatározzák az IL8LA normalizált értékét (nIL8LA), amely az IL8LA és a GAPLA hányadosa; az nIL8LA indukcióját (Ind-IL8LA), amely a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt THP-G8 sejtek négyszeresen mért nIL8LA értéke számtani átlagának a kezeletlen THP-G8 sejtek nIL8LA értékeinek számtani átlagához viszonyított aránya; és a GAPLA gátlását (Inh-GAPLA), amely a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt THP-G8 sejtek négyszeresen mért GAPLA értéke számtani átlagának a kezeletlen THP-G8 sejtek GAPLA értékeinek számtani átlagához viszonyított aránya, és amely a citotoxicitás mutatója.

1. táblázat

Az IL-8 Luc vizsgálatban mért luciferázaktivitással kapcsolatos kifejezések leírása

Rövidítések	Fogalommeghatározás
GAPLA	A GAPDH promóter aktivitását tükröző SLR luciferázaktivitás
IL8LA	Az IL-8 promóter aktivitását tükröző SLO luciferázaktivitás
nIL8LA	IL8LA/GAPLA
Ind-IL8LA	A vegyi anyagokkal kezelt THP-G8 sejtek nIL8LA értéke/kezeletlen sejtek nIL8LA értéke
Inh-GAPLA	A vegyi anyagokkal kezelt THP-G8 sejtek GAPLA értéke/kezeletlen sejtek GAPLA értéke
CV05	A vegyi anyag azon legalacsonyabb koncentrációja, amely 0,05 alatti Inh-GAPLA értéket idéz elő.

11. Az IL-8 Luc vizsgálathoz hasonló in vitro IL-8 luciferáz vizsgálatok validálásának megkönnyítéséhez rendelkezésre állnak teljesítményszabványok (15), amelyek lehetővé teszik az OECD 442E vizsgálati iránymutatásának időben történő módosítását az IL-8 luciferáz vizsgálatok e vizsgálati iránymutatásba való beépítéséhez. Az adatok OECD-megállapodás szerinti kölcsönös elfogadása csak a teljesítményszabványoknak megfelelően validált vizsgálatok esetében lesz garantált, ha e vizsgálatokat az OECD felülvizsgálta és belefoglalta 442E vizsgálati iránymutatásába (16).

A JÁRTASSÁG BIZONYÍTÁSA

12. A B.71. vizsgálati módszer e függelékben ismertetett vizsgálatának rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak a 3.3. függelékben felsorolt tíz jártassági tesztanyag in vitro módszerekre vonatkozó bevált gyakorlatokkal összhangban történő vizsgálatával igazolniuk kell szakmai jártasságukat (17). Ezenfelül a vizsgálat felhasználóinak történeti adatbázist kell fenntartaniuk, amely tartalmazza a reaktivitási tesztekből (lásd a 15. pontot), valamint a pozitív és az oldószeres/vivőanyagos kontrollokból (lásd a 21–24. pontot) származó adatokat, ezekkel az adatokkal igazolva a vizsgálat laboratóriumon belüli hosszú távú reprodukálhatóságát.

ELJÁRÁS

13. Az IL-8 Luc vizsgálathoz rendelkezésre állnak szabványműveleti eljárások, amelyeket alkalmazni kell e vizsgálat végrehajtása során (18). A vizsgálat elvégzésére vállalkozó laboratóriumok a rekombináns THP-G8 sejtvonalat az OECD sablonban szereplő feltételeknek megfelelően egy anyagátadási megállapodás aláírását követően a GPC

Lab. Co. Ltd. vállalattól (Tottori, Japán) szerezhetik be. A következő pontok ismertetik a vizsgálat főbb összetevőit és eljárásait.

Sejtek előkészítése

14. Az IL-8 Luc vizsgálathoz THP-G8 sejtvonalat kell használni, amely a GPC Lab. Co. Ltd. vállalattól (Tottori, Japán) szerezhető be (lásd a 8. és a 13. pontot). A sejteket a beérkezésüket követően (2–4 passzálással) fel kell szaporítani, és homogén állományként fagyasztva kell tárolni. Az ebből az állományból származó sejteket legfeljebb 12 passzálás erejéig vagy legfeljebb 6 héten át lehet szaporítani. A szaporításhoz használt közeg az RPMI-1640 tápfolyadék, kiegészítve 10 % magzati borjú szérummal (FBS), antibiotikumos/antimikotikus oldattal (100 egység/ml penicillin g, 100 μg/ml sztreptomicin és 0,25 μg/ml amfotericin B 0,85 %-os sóoldatban) (pl. GIBCO, kat.száma: 15240-062), 0,15 μg/ml puromicinnel (CAS-száma: 58-58-2) és 300 μg/ml G418-cal (CAS-száma: 108321-42-2).

15. A vizsgálatban való felhasználásuk előtt a sejteket egy reaktivitási teszt során minősíteni kell. A reaktivitási tesztet a felolvasztás után 1–2 héttel vagy 2–4 passzálást követően kell elvégezni, a pozitív kontrollanyaggal, vagyis a 4-nitrobenzil-bromiddal (4-NBB) (CAS-száma: 100-11-8, legalább 99 %-os tisztaságban) és a negatív kontrollanyaggal, a tejsavval (LA) (CAS-száma: 50-21-5, legalább 85 % tisztaságban). A 4-NBB-nak pozitív választ (legalább 1,4-es Ind-IL8LA), a tejsavnak pedig negatív választ (1,4-nél kisebb Ind-IL8LA) kell kiváltania. A vizsgálathoz kizárólag a reaktivitási tesztben megfelelt sejtek használhatók. A tesztet a 22–24. pontban leírt eljárások szerint kell végrehajtani.

16. A vizsgálathoz a THP-G8 sejteket 2–5 × 10^5 sejt/ml sűrűségben átoltják, majd sejttenyésztő lombikban 48–96 órán keresztül előtenyésztik. A vizsgálat napján a sejttenyésztő lombikból begyűjtött sejteket 10 % FBS-t tartalmazó, antibiotikum-mentes RPMI-1640 tápoldatban átmossák, majd 10 % FBS-t tartalmazó, antibiotikum-mentes RPMI-1640 tápoldatban 1 × 10^6 sejt/ml sűrűségben újraszuszpendálják. Ezt követően a sejteket 50 μl mennyiségben (lyukanként 5 × 10^4 sejt sűrűségben) elhelyezik egy 96 lyukú, lapos fenekű fekete lemezben (pl. Costar, kat.száma: 3603).

A vizsgálati vegyi anyag és a kontrollanyagok előkészítése

17. A vizsgálati vegyi anyagot és a kontrollanyagokat a vizsgálat napján kell előkészíteni. Az IL-8 Luc vizsgálatban a vizsgálati vegyi anyagokat X-VIVO™ 15-ben, egy kereskedelmi forgalomban kapható, szérummentes tápoldatban (Lonza, 04-418Q) oldják fel, 20 mg/ml végső koncentrációban. Egy mikrocentrifuga csőbe töltött 20 mg vizsgálati vegyi anyaghoz (a vegyi anyag oldhatóságától függetlenül) hozzáadnak annyi X-VIVO™ 15 tápoldatot, hogy a keverék térfogata 1 ml legyen, majd a keveréket 30 percig, körülbelül 20 °C-os környezeti hőmérsékleten intenzív örvénykeverésnek vetik alá és rotorral legfeljebb 8 rpm sebességen rázatják. Amennyiben a szilárd vegyi anyagok ilyen módon nem oldódnak fel, a csövet ultrahanggal kezelik mindaddig, amíg a vegyi anyag teljesen feloldódik vagy stabilan diszpergálódik. Az X-VIVO™ 15 tápoldatban oldható vizsgálati vegyi anyagok esetében az oldatot X-VIVO™ 15-ben 5-szörös tényezővel hígítják, és a kapott keveréket a vizsgálati vegyi anyag X-VIVO™ 15 (4 mg/ml-os) törzsoldataként hasznosítják. Az X-VIVO™ 15 tápoldatban nem oldható vizsgálati vegyi anyagok esetében a keveréket ismét legalább 30 percig rázatják, majd 5 percen keresztül 15000 rpm (≈20000 *g*) sebességen centrifugálják; a létrejött felülúszót a vizsgálati vegyi anyag X-VIVO™ 15 törzsoldataként hasznosítják. Más oldószerek, például DMSO, víz vagy a tápfolyadék használatát tudományosan meg kell indokolni. A vegyi anyagok feloldásának részletes eljárását a 3.5. függelék ismerteti. A 18–23. pontban leírtak szerint elkészített X-VIVO™ 15 oldatokat 1: 1 térfogatszázalék arányban össze kell keverni a 96 lyukú, lapos fenekű fekete lemezen elkészített sejtszuszpenziókkal (lásd a 16. pontot).

18. Az első vizsgálatmenet célja a citotoxikus koncentráció meghatározása és a vegyi anyagok bőrszenzibilizáló potenciáljának felmérése. A vizsgálati vegyi anyagok X-VIVO™ 15 törzsoldataiból X-VIVO™ 15 tápoldattal, kétszeres hígítási tényezővel oldatsorozatot készítenek (lásd a 3.5. függeléket) egy 96 lyukú vizsgálati lemezen (pl. Costar, kat.száma: EW-01729-03). Ezután lyukanként 50 μl mennyiségű hígított oldatot adagolnak a 96 lyukú, lapos fenekű fekete lemezen elkészített 50 μl mennyiségű sejtszuszpenziókhoz. Tehát az X-VIVO ™ 15-ben oldható vizsgálati vegyi anyagok esetében a vizsgálati vegyi anyagok végső koncentrációértékei a 0,002–2 mg/ml-es tartományban helyezkednek el (3.5. függelék). A 20 mg/ml koncentrációjú X-VIVO ™ 15-ben nem oldható vizsgálati vegyi anyagoknál csak a 2 és 2^{10} közötti hígítási tényező határozható meg, a vizsgálati vegyi anyagok tényleges végső koncentrációértékei bizonytalanok, mivel attól függnek, hogy a vizsgálati vegyi anyagoknak mekkora a telítési koncentrációja az X-VIVO ™ 15 törzsoldatban.

19. A további vizsgálatmenetekben (vagyis a második, harmadik és negyedik ismétlésben) az X-VIVO™ 15 törzsoldat koncentrációja négyszerese annak a koncentrációértéknek, amely az első kísérlet során 05-ös sejtéletképességet eredményezett (CV05; az a legalacsonyabb koncentráció, amely 0,05 alatti Inh-GAPLA értéket idéz elő). Amennyiben az első vizsgálatmenetben alkalmazott legmagasabb koncentrációnál az Inh-GAPLA nem süllyed 0,05 alá, az X-VIVO™ 15 törzsoldatát az első vizsgálatmenet legmagasabb koncentrációjában készítik el. A CV05 értéket eredményező koncentráció kiszámításához elosztják az első vizsgálatmenet törzsoldatának koncentrációját a CV05 hígítási tényezővel (X) (CV05 hígítási tényező (X); az a hígítási tényező, amellyel a törzsoldat CV05 értéket eredményező koncentrációra hígítható) (lásd a 3.5. függeléket). A 20 mg/ml koncentrációjú X-VIVO-ban nem oldható vizsgálati anyagoknál a CV05 meghatározásához a törzsoldat koncentrációját megszorozzák 1/X-szel. A 2–4. vizsgálatmenethez egy második törzsoldatot készítenek, 4 × CV05 koncentrációban (3.5. függelék).

20. Az X-VIVO™ 15 második törzsoldatából 1,5-szörös hígítási tényezővel készítenek oldatsorozatot, egy 96 lyukú vizsgálati lemezen. Ezután lyukanként 50 µl mennyiségű hígított oldatot adagolnak a 96 lyukú, lapos fenekű fekete lemez lyukaiba helyezett 50 µl mennyiségű sejtszuszpenziókhoz. Minden vizsgálati vegyi anyag valamennyi koncentrációját 4 lyukban vizsgálják. Ezt követően a mintákat lemezrázón összekeverik, és 16 órán át inkubálják 37 °C-on, 5 % CO_2 mellett, majd az alább leírt módon megmérik a luciferázaktivitást.

21. Az oldószeres kontroll a lyukanként 50 µl X-VIVO™ 15 és a lyukanként 50 µl, 10 % FBS-t tartalmazó RPMI-1640 tápoldatban lévő sejtszuszpenzió keveréke.

22. Az ajánlott pozitív kontroll a 4-NBB. Egy 1,5 ml-es mikrocentrifuga csőben elhelyeznek 20 mg 4-NBB-t, majd hozzáadnak annyi X-VIVO™ 15-öt, hogy a keverék térfogata 1 ml legyen. A csövet legalább 30 percig intenzív örvénykeverésnek vetik alá és rotorral legfeljebb 8 rpm sebességen rázatják. Ezt követően a keveréket 5 percig 20000 g-n centrifugálják, majd a felülúszót 4-szeres tényezővel X-VIVO™ 15-tel hígítják, és 500 µl hígított felülúszót áthelyeznek a 96 lyukú vizsgálati lemez egyik lyukába. A hígított felülúszót 2-szeres és 4-szeres tényezővel tovább hígítják X-VIVO™ 15-tel, majd 50 µl mennyiségű oldatot adagolnak a 96 lyukú, lapos fenekű fekete lemez lyukaiba helyezett 50 µl mennyiségű THP-G8 sejtszuszpenziókhoz (3.6. függelék). A pozitív kontroll valamennyi koncentrációját 4 lyukban vizsgálják. A lemez tartalmát lemezrázón összekeverik, és CO_2 inkubátorban 16 órán át inkubálják (37 °C-on, 5 % CO_2 mellett), majd a 29. pontban leírt módon megmérik a luciferázaktivitást.

23. Az ajánlott negatív kontrollanyag a tejsav. Egy 1,5 ml-es mikrocentrifuga csőben elhelyeznek 20 mg tejsavat, majd hozzáadnak annyi X-VIVO™ 15-öt, hogy a keverék térfogata 1 ml legyen (20 mg/ml). A 20 mg/ml koncentrációjú tejsavoldatot 5-szörös tényezővel X-VIVO™ 15-tel hígítják (4 mg/ml); majd a 4 mg/ml koncentrációjú tejsavoldatból 500 µl mennyiséget áthelyeznek a 96 lyukú vizsgálati lemez egyik lyukába. Ezt az oldatot 2-szeres tényezővel X-VIVO™ 15-tel hígítják, majd ismét 2-szeres tényezővel tovább hígítják, 2 mg/ml-es és 1 mg/ml-es oldatokat hozva létre. E 3 oldatból és a vivőanyagos kontrollból (X-VIVO™ 15) 50 µl mennyiséget adagolnak a 96 lyukú, lapos fenekű fekete lemez lyukaiba helyezett 50 µl mennyiségű THP-G8 sejtszuszpenziókhoz. A negatív kontroll valamennyi koncentrációját 4 lyukban vizsgálják. A lemez tartalmát lemezrázón összekeverik, és CO_2 inkubátorban 16 órán át inkubálják (37 °C-on, 5 % CO_2 mellett), majd a 29. pontban leírt módon megmérik a luciferázaktivitást.

24. Alkalmazhatók más, megfelelő pozitív vagy negatív kontrollok is, ha rendelkezésre állnak dokumentált adatok hasonló vizsgálatmenet-elfogadhatósági kritériumok származtatásához.

25. Ügyelni kell az illékony vizsgálati vegyi anyagok elpárolgásának elkerülésére, valamint a lyukak vizsgálati vegyi anyagokkal való keresztszennyeződésének elkerülésére, például a lemezek befedhetők fóliával a vizsgálati vegyi anyagokkal való inkubálás előtt.

26. A vizsgálati vegyi anyagokat és az oldószeres kontrollt 2–4 vizsgálatmenetben kell vizsgálni ahhoz, hogy meg lehessen állapítani a besorolás pozitív vagy negatív előrejelzését (lásd a 2. táblázatot). Mindegyik vizsgálatmenetet más-más napon, a vizsgálati vegyi anyaggal frissen készített X-VIVO™ 15 törzsoldattal és egymástól függetlenül begyűjtött sejtekkel kell elvégezni. A sejtek származhatnak ugyanabból a passzálásból.

A luciferáz-aktivitás mérése

27. A lumineszcenciát 96 lyukú mikrolemezhez való luminométerrel mérik, amelyet optikai szűrőkkel szerelnek fel, pl. Phelios (ATTO, Tokió, Japán), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Németország) és az ARVO sorozat (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). A reprodukálhatóság biztosítása érdekében a luminométert minden vizsgálat előtt kalibrálni kell (19). A kalibráláshoz rendelkezésre állnak rekombináns, narancssárga és vörös fényt kibocsátó luciferázok.

28. A lemez valamennyi vegyi anyaggal kezelt vagy kezeletlen sejtszuszpenziót tartalmazó lyukába helyeznek 100 µl felmelegített Tripluc® luciferáz vizsgálati reagenst (Tripluc). A lemezt körülbelül 20 °C-os környezeti hőmérsékleten 10 percig rázatják. Ezután a lemezt a luciferáz-aktivitás méréséhez a luminométerbe helyezik. A biolumineszcenciát 3 másodpercig mérik optikai szűrő nélkül (F0) és optikai szűrővel (F1). Ha például a használt luminométer típusa miatt ettől eltérő beállításokat alkalmaznak, azt tudományosan indokolni kell.

29. A mért értékek alapján meghatározzák az egyes koncentrációk paramétereit, például az IL8LA, a GAPLA, az nIL8LA, az Ind-IL8LA, az Inh-GAPLA értékét, az IL8LA átlagát ±SD, a GAPLA átlagát ±SD, az nIL8LA átlagát ±SD, az Ind-IL8LA átlagát ±SD, az Inh-GAPLA átlagát ±SD és az Ind-IL8LA 95 %-os konfidenciaintervallumát. Az ebben a pontban említett paraméterek meghatározását a 3.1. és a 3.4. függelék tartalmazza.

30. A mérés előtt a több színt észlelő riporter vizsgálatokban a színek elkülönítését általában optikai szűrővel – például sharp-cut (long-pass vagy short-pass) szűrővel vagy sávszűrővel – felszerelt detektorokkal (luminométerrel és lemezolvasóval) végzik. Az egyes biolumineszcens jelzőszínek kiszűréséhez használt szűrők transzmissziós koefficiensét a vizsgálatot megelőzően a 3.2. függelékben foglaltak szerint kalibrálni kell.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Az adatok kiértékelése

31. A pozitív/negatív döntés kritériumai alapján minden vizsgálatmenetre érvényesek az alábbiak:

— az IL-8 Luc vizsgálat előrejelzése akkor pozitív, ha az Ind-IL8LA legalább 1,4 és az Ind-IL8LA 95 %-os konfidenciaintervallumának alsó határértéke legalább 1,0;

— az IL-8 Luc vizsgálat előrejelzése akkor negatív, ha az Ind-IL8LA kisebb mint 1,4 és/vagy az Ind-IL8LA 95 %-os konfidenciaintervallumának alsó határértéke kisebb mint 1,0.

Előrejelzési modell

32. Azok a vizsgálati vegyi anyagok, amelyek az 1., 2., 3. és 4. vizsgálatmenetben két pozitív eredményre vezettek, pozitívnak minősülnek, míg azok, amelyek az 1., 2., 3. és 4. vizsgálatmenetben három negatív eredményre vezettek, feltételezett negatívnak tekintendők (2. táblázat). A feltételezett negatív vegyi anyagok közöl azok, amelyek oldódnak 20 mg/ml koncentrációjú X-VIVO™ 15-ben, negatívnak tekintendők, azok a vegyi anyagok pedig, amelyek nem oldódnak 20 mg/ml koncentrációjú X-VIVO™ 15-ben, nem minősíthetők (1. ábra).

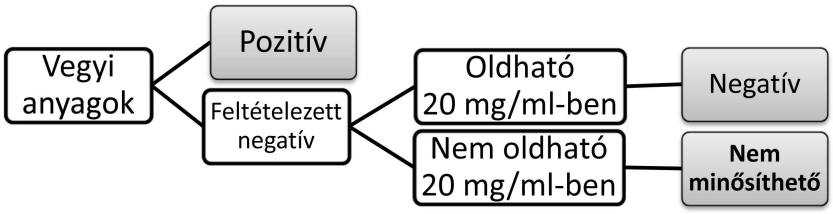
2. táblázat

A pozitív és a feltételezett negatív anyagok azonosításának kritériumai

1. vizsgálatmenet	2. vizsgálatmenet	3. vizsgálatmenet	4. vizsgálatmenet	Végső előrejelzés
Pozitív	Pozitív	—	—	Pozitív
	Negatív	Pozitív	—	Pozitív
		Negatív	Pozitív	Pozitív
			Negatív	Feltételezett negatív
Negatív	Pozitív	Pozitív	—	Pozitív
		Negatív	Pozitív	Pozitív
			Negatív	Feltételezett negatív
	Negatív	Pozitív	Pozitív	Pozitív
			Negatív	Feltételezett negatív
		Negatív	—	Feltételezett negatív

1. ábra

A végső döntés előrejelzési modellje



Elfogadhatósági kritériumok

33. Az IL-8 Luc vizsgálat alkalmazásakor az alábbi elfogadhatósági kritériumoknak kell teljesülniük.

— Az Ind-IL8LA értékének minden vizsgálatmenetben a pozitív kontrollanyag, a 4-NBB legalább egyik koncentrációjában nagyobbnak kell lennie mint 5,0.

— Az Ind-IL8LA értékének minden vizsgálatmenetben a negatív kontrollanyag, a tejsav minden koncentrációjában kisebbnek kell lennie mint 1,4.

— Azon lemezek adatait, amelyeknél a sejteket és Tripluc reagenst tartalmazó, de vegyi anyag nélküli, kontrollként szolgáló lyukak GAPLA értéke nem éri el a csak a vizsgálati tápoldatot (vagyis lyukanként 50 µl, 10 % FBS-sel kiegészített RPMI-1640 és lyukanként 50 µl X-VIVO™ 15 keverékét) tartalmazó lyuk GAPLA értékének 5-szörösét, nem szabad figyelembe venni.

— Szintén nem vehetők figyelembe azon lemezek adatai, amelyeknél a vizsgálati vagy kontrollként szolgáló vegyi anyagok összes koncentrációjánál az Inh-GAPLA kevesebb mint 0,05. Ez utóbbi esetben az első vizsgálatot meg kell ismételni, méghozzá úgy, hogy az ismétlésben alkalmazott legmagasabb végső koncentráció az előző vizsgálat legalacsonyabb végső koncentrációja legyen.

Vizsgálati jegyzőkönyv

34. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyagok

Egy összetevőből álló anyag:

— kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;

— tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;

— vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— oldhatóság X-VIVO™ 15-ben. Az X-VIVO™ 15-ben oldhatatlan vegyi anyagok esetében: a centrifugálást követően megfigyeltek-e kicsapódást vagy flotációt;

— vizsgált koncentráció(k);

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;

— nem X-VIVO™ 15 használata esetén az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében.

Több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítójával (lásd fent), tisztaságával, mennyiségi előfordulásával és releváns fizikai-kémiai tulajdonságaival (lásd fent) jellemezve; amennyiben rendelkezésre állnak;

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;

— molekulatömeg vagy látszólagos molekulatömeg ismert összetételű keverékek/polimerek esetén, vagy a vizsgálat lebonyolítása szempontjából releváns egyéb információ;

— vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— oldhatóság X-VIVO™ 15-ben. Az X-VIVOTM 15-ben oldhatatlan vegyi anyagok esetében: a centrifugálást követően megfigyeltek-e kicsapódást vagy flotációt;

— vizsgált koncentráció(k);

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak.

— nem X-VIVO™ 15 használata esetén az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében.

Kontrollok

Pozitív kontroll

— kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;

— fizikai megjelenés, vízben való oldhatóság, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak és szükség szerint;

— tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;

— vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— vizsgált koncentráció(k);

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;

— adott esetben hivatkozás a pozitív történeti kontrollok eredményeire, amelyek a vizsgálatmenet elfogadhatósági kritériumainak való megfelelőséget bizonyítják.

Negatív kontroll:

— kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok) és/vagy más azonosítók alapján;

— tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;

— fizikai megjelenés, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben a vizsgálati iránymutatásban említett negatív kontrollanyagoktól eltérő negatív kontrollanyagok használatosak, és amennyiben rendelkezésre állnak;

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;

— az oldószer kiválasztásának indoklása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében.

Vizsgálati körülmények

— a megbízó, a vizsgálatot végző laboratórium és a vizsgálatvezető neve és címe;

— az alkalmazott vizsgálat leírása;

— használt sejtvonal, tárolási feltételei és eredete (például az a létesítmény, ahonnan azt beszerezték);

— a magzati borjú szérum gyártási száma és eredete, a forgalmazó neve, a 96 lyukú, lapos fenekű fekete lemez gyártási száma, valamint a Tripluc reagens gyártási száma;

— a vizsgálathoz használt sejtek passzálásának száma és sűrűsége;

— a vizsgálat előtt a leoltáshoz alkalmazott sejtszámlálási módszer és a homogén sejtszám-eloszlás biztosítása érdekében hozott intézkedések;

— az alkalmazott luminométer (például modell), beleértve a műszer beállításait, a használt luciferáz szubsztrátot, valamint a megfelelő lumineszcencia-mérések szemléltetése a 3.2. függelékben ismertetett kontrollvizsgálat alapján;

— a vizsgálat végrehajtásában való laboratóriumi jártasság bizonyítására alkalmazott eljárás (például jártassági tesztanyagok vizsgálatával) vagy a vizsgálat idővel reprodukálható végrehajtásának bizonyítására alkalmazott eljárás.

A vizsgálat menete

— az alkalmazott replikátumok és vizsgálatmenetek száma;

— a vizsgálati vegyi anyag koncentrációi, alkalmazási eljárása és az expozíciós idő (ha eltér az ajánlottól);

— az alkalmazott értékelési és döntési kritériumok leírása;

— az alkalmazott vizsgálat-elfogadhatósági kritériumok leírása;

— a vizsgálati eljárás bármilyen változtatásának leírása.

Eredmények

— az IL8LA és a GAPLA mért értékei;

— az nIL8LA, az Ind-IL8LA és az Inh-GAPLA kiszámolt értékei;

— az Ind-IL8LA 95 %-os konfidenciaintervalluma;

— a luciferáz-aktivitás indukciójára és az életképességre vonatkozó dózis-válasz görbéket ábrázoló grafikon;

— adott esetben bármely más releváns észrevétel leírása.

Az eredmények tárgyalása

— az IL-8 Luc vizsgálattal kapott eredmények tárgyalása;

— a vizsgálat eredményeinek integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében történő tárgyalása, amennyiben rendelkezésre állnak más releváns információk.

Következtetés

SZAKIRODALOM

(1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. Toxicol Sci 124:359-69.

(2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(3) OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(4) OECD (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol 69:371-9.

(6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. Toxicol *In Vitro* 29:1816-30.

(7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Pharmacol 71:337-51.

(8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275-84.

(9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147-155.

(10) Thorne N, Inglese J, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.

(11) OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en.

(12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286-91.

(13) Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271-9.

(14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891-4.

(15) OECD (2017). To be published - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Paris, France

(16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OECD, Párizs, Franciaország.

(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. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, elérhető a következő címen: http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.

(19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. Photochem Photobiol 86:1046-9.

(20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OECD, Párizs, Franciaország.

(21) United Nations (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Elérhető a következő címen: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

3.1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: a vizsgálattal kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálat megfelelőségének mutatója, és relevanciájának egyik szempontja. A kifejezés gyakran használatos az „egyezés” szó megfelelőjeként, amely arra utal, hogy egy adott vizsgálat milyen arányban szolgáltat helyes eredményeket (16).

Káros kimeneti út (Adverse Outcome Pathway, AOP): valamely megcélzott vegyi anyag vagy hasonló vegyi anyagok csoportjának kémiai szerkezetéből kiinduló, a molekuláris kiváltó eseményen keresztül az érintett in vivo eredményig végbemenő eseménysorozat (20).

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

CV05: 05-ös életképesség, vagyis az a legalacsonyabb koncentráció, amelynél a vegyi anyag az Inh-GAPLA 0,05 alatti szintjét idézi elő.

FInSLO-LA: az Ind-IL8LA értékre utaló rövidítés, amelyet az IL-8 Luc vizsgálatra vonatkozó validálási jelentésben és korábbi publikációkban használtak. Meghatározását lásd az Ind-IL8LA címszó alatt.

GAPLA: a stabil vörös luciferáz (SLR) luciferáz-aktivitása (λmax = 630 nm), amelyet a GAPDH promóter szabályoz, és amely a sejtéletképességről és az élő sejtek számáról nyújt felvilágosítást.

Veszély: valamely anyag vagy helyzet azon sajátossága, hogy káros hatásokat képes előidézni az élő szervezet, rendszer vagy (al)populáció anyagnak való expozíciójakor.

Integrált vizsgálati és értékelési megközelítés: valamely vegyi anyag vagy vegyianyag-csoport veszélyeinek azonosításához (potenciál), jellemzéséhez (hatáserősség) és/vagy biztonsági értékeléséhez (potenciál, hatáserősség és expozíció) alkalmazott strukturált megközelítés, amely stratégiai szempontból beépít és mérlegel minden olyan releváns adatot, amely hozzájárul a lehetséges veszélyre és/vagy kockázatra és/vagy a további célirányos és ezért minimális vizsgálat szükségességére vonatkozó szabályozói döntéshozatalhoz.

II-SLR-LA: az Inh-GAPLA értékre utaló rövidítés, amelyet az IL-8 Luc vizsgálatra vonatkozó validálási jelentésben és korábbi publikációkban használtak. Meghatározását lásd az Inh-GAPLA címszó alatt.

IL-8 (Interleukin-8): endoteliális sejtekből, fibroblasztokból, keratinsejtekből, makrofágokból és monocitákból származó citokin, amely a neutrofilek és a T-sejt limfociták kemotaxisát idézi elő.

IL8LA: a stabil narancssárga luciferáz (SLO) luciferáz-aktivitása (λmax = 580 nm), amelyet az IL-8 promóter szabályoz.

Ind-IL8LA: az nIL8LA indukciós faktora. Meghatározásához elosztják a vegyi anyaggal kezelt THP-G8 sejtek nIL8LA értékét a nem stimulált THP-G8 sejtek nIL8LA értékével, az Ind-IL8LA a vegyi anyagok által előidézett IL-8 promóter aktivitás mutatója.

Inh-GAPLA: A GAPLA gátlása. Meghatározásához elosztják a vegyi anyaggal kezelt THP-G8 sejtek GAPLA értékét a nem kezelt THP-G8 sejtek GAPLA értékével, az Inh-GAPLA a vegyi anyagok által előidézett citotoxicitás mutatója.

Minimális indukciós küszöbérték (MIT): az a legalacsonyabb koncentráció, amelynél a vegyi anyag eleget tesz a pozitív besorolás kritériumainak.

Keverék: két vagy több anyagot tartalmazó elegy vagy oldat.

Egy összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben az egyik fő összetevő legalább 80 tömegszázalékban van jelen.

Több összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben egynél több fő összetevő több mint 10 tömegszázalékban, de 80 tömegszázalékot nem meghaladó koncentrációban van jelen. A több összetevőből álló anyag gyártási folyamat eredménye. A keverék és a több összetevőből álló anyag között az a különbség, hogy a keverék két vagy több anyag összekeverésével, kémiai reakció nélkül jön létre. A több összetevőből álló anyag kémiai reakció eredménye.

nIL8LA: az IL-8 promóter aktivitását tükröző SLO luciferáz-aktivitás (IL8LA) a GAPDH promóter aktivitását tükröző SLR luciferáz-aktivitással (GAPLA) normalizálva. A sejtéletképesség és a sejtszám figyelembevételét követő IL-8 luciferáz-aktivitás mutatója.

nSLO-LA: az nIL8LA értékre utaló rövidítés, amelyet az IL-8 Luc vizsgálatra vonatkozó validálási jelentésben és korábbi publikációkban használtak. Meghatározását lásd az nIL8LA címszó alatt.

Pozitív kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó anyaggal kezelt replikátum. Annak biztosítása érdekében, hogy a pozitív kontrollban jelentkező hatás időbeli változását fel lehessen mérni, a pozitív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Pre-haptének: abiotikus átalakulás révén szenzibilizálóvá váló vegyi anyagok.

Pro-haptének: olyan vegyi anyagok, amelyek enzimatikus aktivációt igényelnek bőrszenzibilizáló hatásuk kifejtéséhez.

Relevancia: a vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálat pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (16).

Megbízhatóság: a vizsgálat laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. Megállapítása a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság, valamint a laboratóriumon belüli megismételhetőség kiszámításával történik (16).

Vizsgálatmenet: egy vizsgálatmenet során egy vagy több vizsgálati vegyi anyagot vizsgálnak egy párhuzamos oldószeres/vivőanyagos kontrollal és egy pozitív kontrollal.

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálat helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (16).

SLO-LA: az IL8LA értékre utaló rövidítés, amelyet az IL-8 Luc vizsgálatra vonatkozó validálási jelentésben és korábbi publikációkban használtak. Meghatározását lásd az IL8LA címszó alatt.

SLR-LA: a GALPA értékre utaló rövidítés, amelyet az IL-8 Luc vizsgálatra vonatkozó validálási jelentésben és korábbi publikációkban használtak. Meghatározását lásd a GAPLA címszó alatt.

Oldószeres/vivőanyagos kontroll: valamely vizsgálati rendszernek a vizsgálati vegyi anyagon kívüli összes összetevőjét tartalmazó kezeletlen minta, amely azonban magában foglalja az alkalmazott oldószert/vivőanyagot. Az ugyanabban az oldószerben/vivőanyagban feloldott vagy stabilan diszpergált vizsgálati vegyi anyaggal kezelt minták esetében a kiindulási érték létrehozásához használatos. Párhuzamos tápoldatos kontrollal elvégzett vizsgálata esetén ez a minta azt is bizonyítja, hogy az oldószer/vivőanyag kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati rendszerrel.

Specificitás: a vizsgálat elvégzésével helyesen besorolt összes negatív/inaktív vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (16).

Anyag: természetes állapotban előforduló vagy termelőfolyamatból származó kémiai elemek és azok vegyületei, amelyek a termék stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagokat és az alkalmazott folyamatból származó szennyeződéseket is tartalmazhatnak, de nem tartalmaznak olyan oldószereket, amelyek az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltozása nélkül elkülöníthetők.

Felületaktív anyag: olyan anyag (például mosószer), amely csökkentheti a folyadékok felületi feszültségét, és így lehetővé teszi, hogy habozzanak vagy áthatoljanak szilárd anyagokon; nedvesítőszerként is ismert. (TG437)

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

THP-G8: az IL-8 Luc vizsgálatban használt IL-8 riporter sejtvonal. A humán makrofágszerű THP-1 sejtvonalat transzfektálták az IL-8 promóterrel szabályozott stabil narancssárga luciferáz (SLO) luciferáz génnel és a GAPDH promóterrel szabályozott stabil vörös luciferáz (SLR) luciferáz génnel.

A vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete által globálisan harmonizált rendszere (ENSZ-GHS): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (21).

UVCB: ismeretlen szerkezetű vagy változó összetételű, összetett reakcióban keletkezett vagy biológiai eredetű anyagok.

Érvényes vizsgálati módszer: olyan vizsgálat, amely kellően relevánsnak és megbízhatónak minősül egy adott célra, és amely tudományosan megalapozott elveken alapul. Egy-egy vizsgálat abszolút értelemben soha nem érvényes, kizárólag meghatározott céllal összefüggésben.

3.2. függelék

A LUCIFERÁZ-AKTIVITÁS MÉRÉSÉNEK ÉS AZ SLO/SLR MÉRÉSÉHEZ HASZNÁLT OPTIKAI SZŰRŐ TRANSZMISSZIÓS KOEFFICIENSE MEGHATÁROZÁSÁNAK ELVE

Több riportert alkalmazó vizsgálati rendszer – Tripluc – használható, több színt detektálására képes rendszerrel működő mikrolemez típusú luminométerrel, amely felszerelhető optikai szűrővel (pl. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). A mérések során használt optikai szűrő 600–620 nm-es long vagy short pass szűrő, illetve 600–700 nm-es sávszűrő.

Két különböző színű luciferáz mérése egy optikai szűrővel

Az alábbi példában Phelios AB-2350 (ATTO) típusú szűrőt használtak. Ez a luminométer az SLO (λmax = 580 nm) és az SLR (λmax = 630 nm) lumineszcens jeleinek megkülönböztetésére egy 600 nm-es long pass szűrőt alkalmaz (R60 HOYA Co., 600 nm-es LP, 1. szűrő).

A 600 nm-es LP-szűrő transzmissziós koefficiensének meghatározásához tisztított SLO és SLR luciferáz enzim használatával megmérik i. az SLO és az SLR biolumineszcenciájának intenzitását szűrő nélkül (F0), ii. az SLO és az SLR biolumineszcenciájának intenzitását 600 nm-es LP-szűrőn (1. szűrőn) keresztül, valamint iii. kiszámolják a 600 nm-es LP-szűrő alábbi transzmissziós koefficienseit az SLO és az SLR méréséhez.

Transmission coefficients		Abbreviation	Definition
SLO	Filter 1 Transmission coefficients	$=\kappa O_{R60}$	The filter's transmission coefficient for the SLO
SLR	Filter 1 Transmission coefficients	κR_{R60}	The filter's transmission coefficient for the SLR

Ha a vizsgálati minta SLO intenzitását O-val, SLR intenzitását R-rel jelöljük, akkor i) a fény (optikai) szűrő nélküli intenzitása (F0) és ii) a 600 nm-es LP-szűrőn (1. szűrőn) keresztül haladó fény intenzitása (F1) az alábbiak szerint határozható meg.

$F0=O+R$

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

Ezeket a képleteket az alábbi módon is fel lehet állítani:

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

Ezt követően a kiszámított transzmissziós tényezők (κO_{R60} és κR_{R60}), valamint a mért F0 és F1 alapján kiszámolható az O és az R értéke:

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

A transzmissziós tényező meghatározásához használat eszközök és módszerek

1. Reagensek

Az egyes tisztított luciferáz enzimek:

Liofilizált tisztított SLO enzim

Liofilizált tisztított SLR enzim

(amelyeket a validálási tevékenységek céljára a GPC Lab. Co. Ltd. vállalattól (Tottori, Japán) szereztek be, a THP-G8 sejtvonallal együtt)

Vizsgálati reagens:

Tripluc® luciferáz vizsgálati reagens (beszerezhető például: TOYOBO, kat.száma: MRA-301)

Tápoldat: a luciferáz vizsgálathoz (30 ml, 2–8 °C-on tárolva)

Reagens	Konc.	Végső konc. tápoldatban	Szükséges mennyiség
RPMI-1640	—	—	27 ml
FBS	—	10 %	3 ml

2. Az enzimoldat elkészítése

Csőbe helyezett liofilizált tisztított luciferáz enzimet oldjunk fel 10 tömegszázalékos glicerinnel kiegészített, 200 µl mennyiségű 10 ~ 100 mM Tris/HCl-dal vagy Hepes/HCl-dal (pH-értéke: 7,5 ~ 8,0), majd az enzimoldatot 10 µl mennyiségben adagoljuk ki 1,5 ml-es eldobható csövekbe, és tároljuk fagyasztóban, −80 °C-on. A fagyasztott enzimoldat akár 6 hónapig is felhasználható. Felhasználásukkor az enzimoldatot tartalmazó csövekhez adjunk hozzá 1 ml-t a luciferáz vizsgálat tápoldatából (10 % FBS-sel kiegészített RPMI-1640), így egy hígított enzimoldatot kapunk, amelyet az enzim deaktivációjának megelőzése érdekében jégen kell tartani.

3. A biolumineszcencia mérése

Olvasszuk fel a Tripluc® luciferáz vizsgálati reagenst (Tripluc), és tartsuk szobahőmérsékletű vízfürdőben vagy szobahőmérsékletű levegőn. A fotomultiplikátor stabilizálódása érdekében a mérés előtt 30 perccel kapcsoljuk be a luminométert. Helyezzünk át 100 µl feloldott enzimoldatot egy fekete 96 lyukú (lapos fenekű) lemezre (az SLO referenciamintáját a B1, B2 és B3 lyukakba, az SLR referenciamintáját pedig a D1, D2 és D3 lyukakba). Ezt követően pipettával adagoljunk 100 µl felmelegített Tripluc reagenst a lemez feloldott enzimoldatot tartalmazó valamennyi lyukába. Lemezrázón rázassuk a lemezt szobahőmérsékleten (kb. 25 °C-on) 10 percig. Ha a lyukakban lévő oldatokban buborékok keletkeznének, távolítsuk el azokat. Helyezzük a lemezt a luciferáz-aktivitás méréséhez a luminométerbe. A biolumineszcenciát 3 másodpercig mérik optikai szűrő nélkül (F0) és optikai szűrővel (F1).

Az optikai szűrő transzmissziós koefficiensét az alábbi módon határozhatjuk meg:

Transzmissziós koefficiens (SLO (κO_{R60})) = (B1-nél mért F1+ B2-nél mért F1+ B3-nál mért F1) / (B1-nél mért F0 + B2-nél mért F0 + B3-nál mért F0)

Transzmissziós koefficiens (SLR (κO_{R60})) = (D1-nél mért F1+ D2-nél mért F1+ D3-nál mért F1) / (D1-nél mért F0 + D2-nél mért F0 + D3-nál mért F0)

Az ily módon meghatározott transzmissziós tényezők az adott luminométerrel végzett valamennyi méréshez felhasználhatók.

A berendezések minőség-ellenőrzése

Az IL-8 Luc vizsgálati protokollban leírt eljárásokat kell használni (18).

3.3. függelék

JÁRTASSÁGI TESZTANYAGOK

A B.71. vizsgálati módszer e függelékben ismertetett vizsgálatának rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak igazolniuk kell szakmai jártasságukat oly módon, hogy az 1. táblázatban javasolt 9 anyagra vonatkozóan az IL-8 Luc vizsgálattal várható előrejelzést kapják meg, továbbá a 9 jártassági tesztanyag közül legalább 8 esetében referenciatartományba eső értékeket kapnak (e jártassági tesztanyagokat úgy választották ki, hogy a bőrszenzibilizáció veszélye esetén bekövetkező válaszreakciók teljes tartományát képviseljék). A kiválasztás többi kritériuma az volt, hogy a vegyi anyagok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők legyenek, azokra vonatkozóan kiváló minőségű in vivo referenciaadatok álljanak rendelkezésre, és az IL-8 Luc vizsgálat alapján kiváló minőségű in vitro adatok álljanak rendelkezésre. Az IL-8 Luc vizsgálathoz rendelkezésre állnak publikált referenciaadatok is (6) (1).

1. táblázat

Az IL-8 Luc vizsgálatban való szakmai jártasság bizonyításához ajánlott anyagok

Jártassági tesztanyagok	CAS-szám	Oldhatósági állapot 20 mg/ml X-VIVO15-ben	In vivo előrejelzés [1]	IL-8 Luc előrejelzés [2]	Referenciatartomány µg/ml) [3]	
					CV_{05} [4]	IL-8 Luc MIT [5]
2,4-Dinitro-klór-benzol	97-00-7	Szilárd	Oldhatatlan	Szenzibilizáló (szélsőségesen)	Pozitív	2,3–3,9	0,5–2,3
Formaldehid	50-00-0	Folyadék	Oldható	Szenzibilizáló (erősen)	Pozitív	9–30	4–9
2-Merkaptobenzotiazol	149-30-4	Szilárd	Oldhatatlan	Szenzibilizáló (mérsékelten)	Pozitív	250–290	60–250
Etilén-diamin	107-15-3	Folyadék	Oldható	Szenzibilizáló (mérsékelten)	Pozitív	500–700	0,1–0,4
Etilén-glikol-dimetakrilát	97-90-5	Folyadék	Oldhatatlan	Szenzibilizáló (enyhén)	Pozitív	> 2000	0,04–0,1
4-Allil-anisol (esztragol)	140-67-0	Folyadék	Oldhatatlan	Szenzibilizáló (enyhén)	Pozitív	> 2000	0,01–0,07
Sztreptomicin-szulfát	3810-74-0	Szilárd	Oldható	Nem szenzibilizáló	Negatív	> 2000	> 2000
Glicerin	56-81-5	Folyadék	Oldható	Nem szenzibilizáló	Negatív	> 2000	> 2000
Izopropanol	67-63-0	Folyadék	Oldható	Nem szenzibilizáló	Negatív	> 2000	> 2000

Rövidítések: CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám.
[1] Az in vivo hatáserősség levezetése az ECETOC által javasolt kritériumok segítségével történik (19).
[2] A megfigyelt dokumentált értékek alapján (1) (6).
[3] A CV_{05} és az IL-8 Luc MIT értékét az EPI Suite™ által megadott vízoldékonyság alapján számították ki.
[4] CV_{05}: az a legalacsonyabb koncentráció, amelynél a vegyi anyag az Inh-GAPLA 0,05 alatti szintjét idézi elő.
[5] MIT: az a legalacsonyabb koncentráció, amelynél a vegyi anyag eleget tesz a pozitív besorolás kritériumainak.

3.4. függelék

INDEXEK ÉS DÖNTÉSI KRITÉRIUMOK

nIL8LA (nSLO-LA)

Az IL8LA (SLO-LA) és a GAPLA (SLR-LA) tekintetében megmérik az i. koncentráció (i = 0–11) j. ismétlését (j = 1–4). A normalizált IL8LA, vagyis az nIL8LA (nSLO-LA), az alábbiak szerint határozható meg:

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

Ez a vizsgálat alapvető mutatója.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Az ismétlés átlagos nIL8LA (nSLO-LA) értékének az i. koncentrációban tapasztalt növekedési faktora összevetve a 0. koncentráció növekedési faktorával, ez a vizsgálat elsődleges mutatója. A két növekedési faktor aránya az alábbi egyenlettel írható le:

$$\text{Ind} - \text{IL8LA}_i = \left\{(1/4) \times \sum_j \text{nIL8LA}_{ij}\right\} / \left\{(1/4) \times \sum_j \text{nIL8LA}_{0j}\right\}$$

A vezető laboratórium javaslata szerint az 1,4-es érték a vizsgálati vegyi anyag pozitív besorolását eredményezi. Ez az érték a vezető laboratórium dokumentált adatainak vizsgálatán alapul. Az adatkezelő csoport ezt az értéket használta a validálási tanulmány valamennyi szakaszában. Az elsődleges eredmény, az Ind-IL8LA a két számtani átlag aránya, ahogyan az az egyenletből is látszik.

95 %-os konfidenciaintervallum (95 % CI)

Az Ind-IL8LA arányon alapuló 95 %-os konfidenciaintervallum (95 % CI) megbecsülésével kimutatható az elsődleges eredmény mérésének pontossága. Amennyiben a 95 %-os konfidenciaintervallum alsó határértéke legalább 1, az arra utal, hogy az i. koncentrációnál elért nIL8LA érték jelentősen nagyobb az oldószeres kontroll nIL8LA értékénél. A 95 %-os konfidenciaintervallum meghatározásának több módja is létezik. Ebben a vizsgálatban az úgynevezett Fieller-tételt alkalmaztuk. E tétel alapján a 95 %-os konfidenciaintervallumot az alábbi egyenlet segítségével határozhatjuk meg:

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

ahol: . a

$$A = \overline{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \overline{x} \times \overline{y}$$

$C = \overline{y}_i^2 - t^2_{0.975(\nu)} \times \frac{sd^2_{yi}}{n_{yi}}$, and $n_0 = 4$

$\overline{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}$

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

$n_{yi} = 4$

$\overline{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$

$sd^2_{yi} = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \overline{y}_i)^2$

a centrális t eloszlás 97,5. percentilise ν szabadságfokkal, ahol

$$\nu = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd^2_{yi}}{n_{yi}}\right) \Big/ \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0}\right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd^2_{yi}}{n_{yi}}\right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Az Inh-GAPLA az ismétlés i. koncentrációjában mért átlagos GAPLA (SLR-LA) érték és az oldószeres kontroll átlagos GAPLA (SLR-LA) értékének aránya, amely az alábbi egyenlettel írható le:

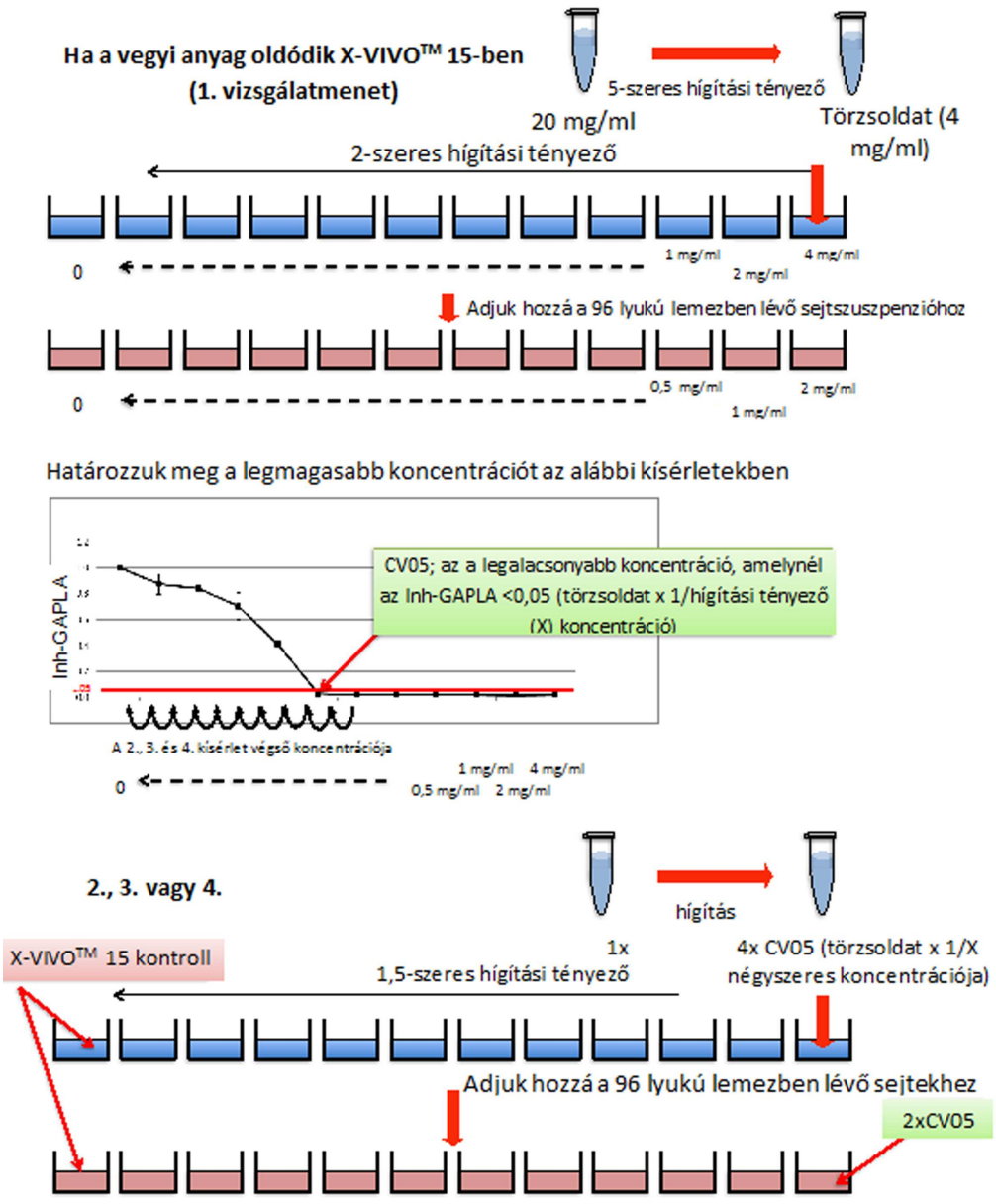
$$Inh - GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} \Big/ \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}.$$

Mivel a GAPLA az nIL8LA nevezője, a szélsőségesen alacsony értékek az nIL8LA nagy variabilitását jelzik. Ezért előfordulhat, hogy a szélsőségesen alacsony (0,05-nál kisebb) Inh-GAPLA értékkel rendelkező Ind-IL8LA értékek csekély pontosságúak.

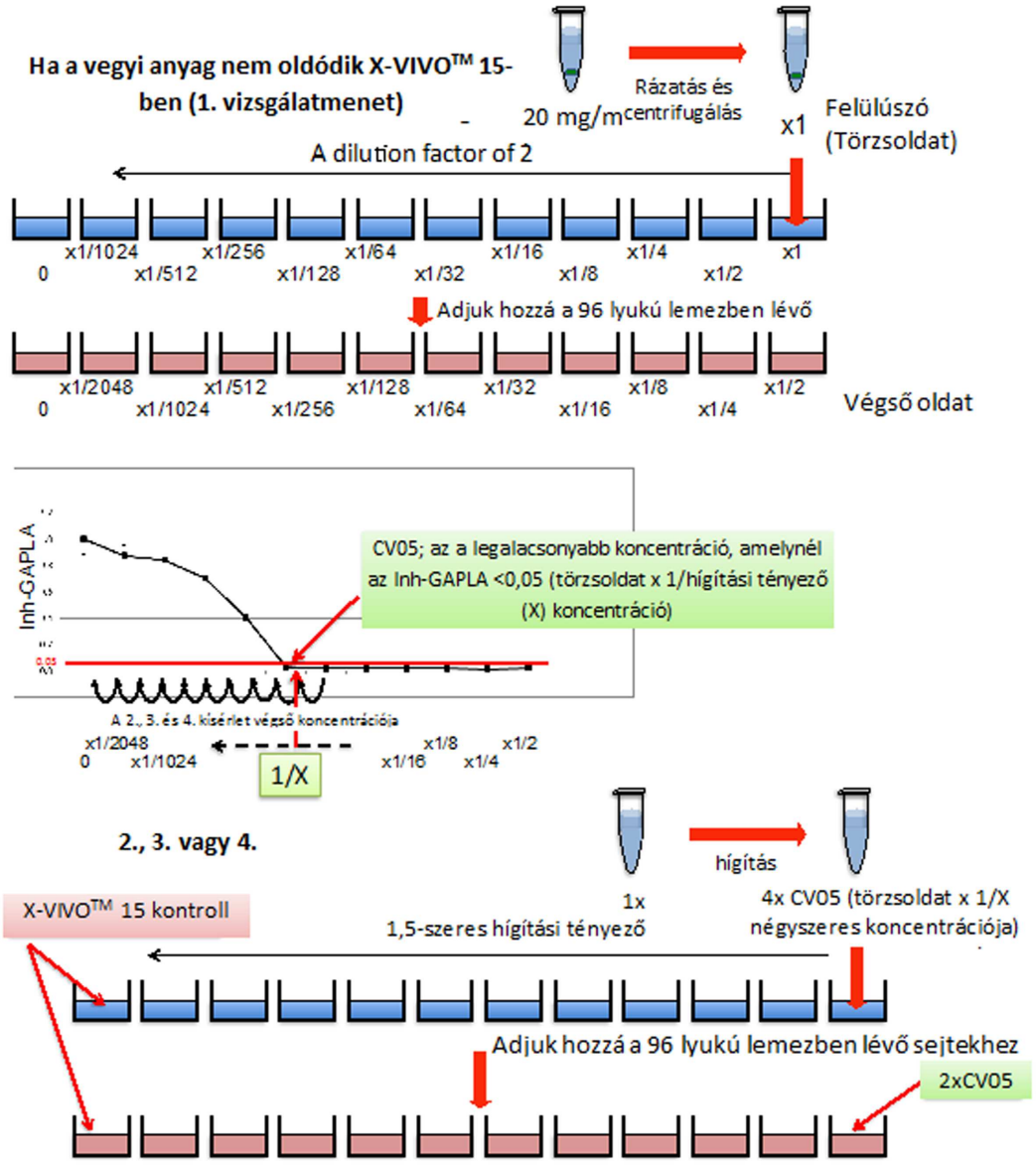
3.5. függelék

AZ IL-8 LUC VIZSGÁLATBAN A VEGYI ANYAGOK FELOLDÁSÁRA ALKALMAZOTT MÓDSZEREK SEMATIKUS ÁBRÁJA

a) A 20 mg/ml koncentrációjú X-VIVO™ 15-ben oldódó vegyi anyagok esetében

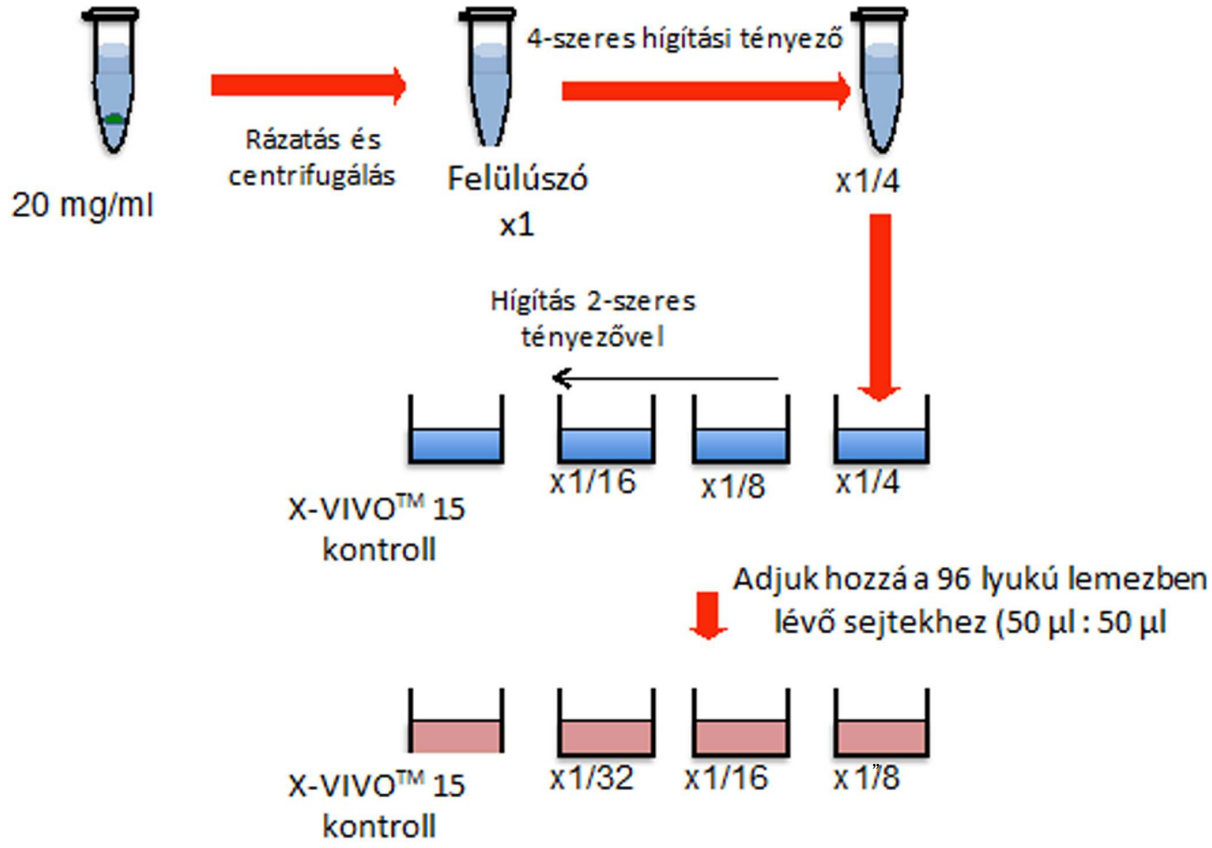


b) A 20 mg/ml koncentrációjú X-VIVO™ 15-ben nem oldódó vegyi anyagok esetében



3.6. függelék

AZ IL-8 LUC VIZSGÁLATBAN A POZITÍV KONTROLLANYAGKÉNT SZOLGÁLÓ 4-NBB FELOLDÁSÁRA ALKALMAZOTT MÓDSZER SEMATIKUS ÁBRÁJA



9. A C. rész a következő fejezetekkel egészül ki:

„C.52. **FOGASPONTYON VÉGZETT KIBŐVÍTETT EGYGENERÁCIÓS REPRODUKCIÓS VIZSGÁLAT (MEOGRT)**

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 240. vizsgálati iránymutatásában (2015) leírt módszerrel. A fogaspontyon végzett kibővített egygenerációs vizsgálat (MEOGRT) egy átfogó, halak több generációjának kezelésén alapuló vizsgálati módszert ír le, amelynek során adatokat gyűjtenek vegyi anyagok, köztük az endokrin rendszert feltételezhetően károsító vegyi anyagok ökológiai veszélyeinek és kockázatainak értékeléséhez. A fogaspontyon végzett kibővített egygenerációs vizsgálatban a halakat a második (F2) generáció kikeléséig (a megtermékenyítés után két hétig) folyamatosan kezelik. Az F2 generáció kikelés utáni fenntartásának hasznosságát további vizsgálatokkal kellene alátámasztani; jelenleg nem áll rendelkezésre elegendő információ olyan körülmények vagy feltételek meghatározásához, amelyek indokolttá tennék az F2 generáció fennmaradásának meghosszabbítását. A vizsgálati módszert azonban új információk és adatok fényében aktualizálhatják. Bizonyos körülmények között például hasznosnak bizonyulhat egy iránymutatás az F2 generáció fenntartásának a szaporodási fázist is magában foglaló meghosszabbításáról (pl. olyan vegyi anyagok esetében, amelyek jelentős mértékű bioakkumulációt idéznek elő, illetve ha más taxonokat érintő transzgenerációs hatás figyelhető meg). Ezzel a vizsgálati módszerrel a vegyi anyagok, köztük az endokrin rendszert potenciálisan zavaró vegyi anyagok halakra gyakorolt potenciális krónikus hatásai értékelhetők. A módszer elsődleges célja a halpopulációnál esetlegesen fellépő releváns hatások (vagyis a túlélésre, a fejlődésre, a növekedésre és a szaporodásra gyakorolt káros hatások) meghatározása, amelyek alapján kiszámítható a megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC) vagy a hatásos koncentráció (ECx), ugyanakkor megjegyzendő, hogy az ECx megállapításán alapuló megközelítések ritkán alkalmazhatók az ilyen nagy léptékű vizsgálatokra, ahol a vizsgált koncentrációk számának a kívánt ECx meghatározásához szükséges növelése kivitelezhetetlen lehet, ráadásul a vizsgált állatok nagy száma miatt állatjóléti szempontból jelentős aggályokat vethet fel. Azok a vegyi anyagok, amelyek értékeléséhez nincs szükség több generáció bevonására, illetve amelyek feltételezhetően nem zavarják az endokrin rendszer működését, más vizsgálati módszerekkel esetleg hatékonyabban vizsgálhatók (1). E vizsgálati módszer alkalmazására a japán fogasponty a megfelelő faj, mivel életciklusa rövid és genetikai ivara meghatározható (2), ez utóbbi a vizsgálati módszer egyik alapvető fontosságú eleme. A módszer által leírt egyedi eljárások és megfigyelt végpontok kizárólag a japán fogaspontyra alkalmazhatók. Esetlegesen más kistestű halfajokra (pl. a zabradánióra) is kidolgozhatók hasonló vizsgálati protokollok.

2. Ezzel a vizsgálati módszerrel több biológiai végpont mérhető. A módszer elsősorban a populáció szempontjából releváns paraméterekre – többek között a túlélésre, az általános fejlődésre, a növekedésre és a szaporodásra – gyakorolt esetleges káros hatásokra helyezi a hangsúlyt. Másodsorban, annak érdekében, hogy adatokat szolgáltasson a mechanizmusra vonatkozólag és összekapcsolja más típusú terepvizsgálatok és laboratóriumi vizsgálatok azon eredményeit, amelyek utólagosan bizonyítják egy adott (pl. más tesztekben és vizsgálatokban androgén- vagy ösztrogénhatásúnak bizonyult) vegyi anyag potenciális hormonháztartást zavaró hatását, egyéb hasznos adatokat is biztosít a *vitellogenin* (*vtg*) mRNS (vagy vitellogenin fehérje, VTG) mérése, a fenotípusos másodlagos ivari jellegek (SCC) genetikus ivarhoz kapcsolódásának meghatározása és kórszövettani értékelések révén. Amennyiben azonban egy adott vizsgálati vegyi anyag vagy metabolitjai feltételezhetően nem fejtenek ki hormonháztartást zavaró hatást, szükségtelen lehet e másodlagos végpontok mérése, így megfelelőbbek lehetnek kevésbé erőforrásigényes, kevesebb vizsgált állatot alkalmazó vizsgálatok (1). Az e vizsgálati módszerben használt fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatók.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

3. Miután e meglehetősen összetett vizsgálat validálását korlátozott számú vegyi anyagon és korlátozott számú laboratórium bevonásával végezték el, várható, hogy amikor elegendő számú vizsgálat áll rendelkezésre ezen új vizsgálati terv hatásának megállapítására, a vizsgálati módszert a szerzett tapasztalatok fényében felülvizsgálják, és szükség szerint átdolgozzák. Az adatok az OECD endokrin rendszert károsító anyagok vizsgálatára és értékelésére vonatkozó fogalmi keretének 5. szintjén alkalmazhatók (3). A vizsgálati módszer első lépéseként szaporodási fázisban lévő felnőtt halakat (az F0 generációt) kezelnek a vizsgálati vegyi anyaggal. A kezelés folytatódik az F1 generáció kifejlődése és szaporodása alatt, egészen az F2 generáció kikeléséig; a vizsgálat ebből kifolyólag lehetővé teszi mind a strukturális, mind az aktivációs endokrin útvonalak értékelését. Az endokrin rendszerrel összefüggő végpontok értelmezhetők bizonyíték súlyán (WoE) alapuló megközelítés keretében.

4. A vizsgálatban megfelelő számú egyedet kell alkalmazni ahhoz, hogy kellő statisztikai erőt képviseljenek a szaporodáshoz kapcsolódó végpontok értékeléséhez (lásd a 3. függeléket), állatjóléti okok miatt ugyanakkor a vizsgált állatok számát a szükséges minimumra kell korlátozni. Tekintettel a vizsgált állatok nagy számára, alaposan mérlegelni kell a vizsgálat szükségességét a már rendelkezésre álló adatok fényében, amelyek a fogaspontyon végzett kibővített egygenerációs vizsgálat számos végpontját illetően tartalmazhatnak releváns információkat. Ezzel kapcsolatban az OECD halakon végzett toxicitásvizsgálatokra vonatkozó keretrendszere nyújthat támpontokat (1).

5. A vizsgálati módszert elsősorban az egyetlen anyag által előidézett hatások azonosítására dolgozták ki. Amennyiben a vizsgálatot keverékeken szükséges alkalmazni, akkor meg kell vizsgálni, hogy az elfogadható eredményeket biztosít-e a szándékolt szabályozási célra.

6. A vizsgálat megkezdése előtt információkat kell szerezni a vizsgálati vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságairól, különösen azért, hogy stabil oldatokat lehessen készíteni a vegyi anyagból. Emellett szükség van egy, a vizsgálati vegyi anyag koncentrációinak ellenőrzésére alkalmas, megfelelő érzékenységű elemzési módszerre.

A VIZSGÁLAT ELVE

7. A vizsgálat első lépéseként tenyészpárokba rendezett, ivarérett (a megtermékenyítéstől számítva legalább 12 hetes) hím és nőstény halakat kezelnek 3 héten keresztül, amelynek során a vizsgálati vegyi anyagot toxikokinetikai tulajdonságainak megfelelően adagolják a szülői generáció (F0) egyedei számára. A negyedik hét első napjához lehető legközelebbi időpontban begyűjtik az ikrákat, amelyekből létrehozzák az F1 generációt. Az F1 generáció felnevelése során (ami összesen 15 hetet vesz igénybe) felmérik a kikelési és a túlélési arányt. Emellett a megtermékenyítés utáni 9–10. héten mintákat vesznek a halaktól a fejlődési végpontok méréséhez, valamint értékelik az ívást a megtermékenyítés utáni 12. héttől a 14. hétig tartó háromhetes időszakon keresztül. Az F2 generáció a szaporodás értékelésének 3. hetét követően indul, nevelésük a kikelés lezárultáig tart.

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGI KRITÉRIUMAI

8. A vizsgálat érvényességéhez az alábbi kritériumoknak kell teljesülniük:

— a vizsgálat során az oldott oxigén koncentrációjának mindvégig el kell érnie a levegőtelítettségi érték 60 %-át;

— a vizsgálat teljes időtartama alatt a víz átlaghőmérsékletének 24 és 26 °C között kell lennie. Az egyes akváriumok csak rövid ideig és legfeljebb 2 °C-kal térhetnek el ettől az átlagértéktől;

— a kontrollok átlagos fekunditásának az egyes generációk (F0 és F1) tekintetében tenyészpáronként és naponként meg kell haladnia a 20 ikrát. Az értékelési időszak során lerakott ikrák termékenységének meg kell haladnia a 80 %-ot. Ezenfelül az ajánlott 24 kontrollként szolgáló tenyészpárból 16-nak (> 65 %) naponta és tenyészpáronként több mint 20 ikrát kell leraknia;

— a kontrollvizsgálatokban az ikrák kikelési arányának (átlagosan) el kell érnie a 80 %-ot (mind az F1, mind az F2 generációban);

— az F1 kontrollvizsgálatokban az F1 generáció kikeléstől a megtermékenyítés utáni 3. hétig mért túlélési arányának el kell érnie az átlag 80 %-ot, a megtermékenyítés utáni 3. héttől a elpusztításig (vagyis a megtermékenyítés utáni 15. hétig) pedig az átlag 90 %-ot;

— bizonyítékkal kell alátámasztani, hogy a vizsgálati vegyi anyag oldatban lévő koncentrációit az átlagos mért értékek ±20 %-os tartományán belül sikerült tartani.

Bár ez nem érvényességi kritérium, a vízhőmérséklet tekintetében az egy kezeléshez tartozó ismétlések statisztikailag nem különbözhetnek egymástól, csakúgy mint az egy vizsgálaton belüli kezelési csoportok sem különbözhetnek statisztikailag egymástól (a napi hőmérsékletmérések alapján, a rövid idejű ingadozásokat leszámítva).

9. Bár a magasabb koncentrációknak kitett csoportokban csökkenhet a reprodukciós arány, az F0 generáció harmadik legmagasabb koncentrációnak kitett csoportjában és az összes alacsonyabb koncentrációval kezelt csoportjában elegendő szaporulatnak kell lennie ahhoz, hogy megteljenek a keltető inkubátorok. Ezen túlmenően az F1 generáció harmadik legmagasabb koncentrációval és az alacsonyabb koncentrációkkal kezelt csoportjaiban az embriók túlélési arányának lehetővé kell tennie az ivarérés előtti egyedektől vett mintákon végzett végpontértékelést (lásd a 36. és a 38. pontot, valamint a 9. függeléket). Emellett az F1 generáció második legmagasabb koncentrációval kezelt csoportjában a kikelés utáni túlélési aránynak el kell érnie egy minimális szintet (~20 %). Ezek nem kifejezett érvényességi kritériumok, hanem ajánlások, amelyek megbízható NOEC-értékek meghatározását teszik lehetővé.

10. Az érvényességi kritériumoktól való eltérés esetén mérlegelni kell a vizsgálat eredményeinek megbízhatóságára gyakorolt következményeket, az eltéréseket és a mérlegelt következményeket pedig bele kell foglalni a vizsgálati jegyzőkönyvbe.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Berendezés

11. Normál laboratóriumi felszerelés és különösen az alábbiak:

a) oxigéntartalom- és pH-mérők;

b) a víz keménységi fokának és lúgosságának mérésére szolgáló berendezések;

c) a hőmérséklet szabályozására és lehetőleg folyamatos figyelemmel kísérésére is alkalmas készülékek;

d) kémiailag semleges anyagból készült és az ajánlott betelepítési aránynak és állománysűrűségnek megfelelő kapacitású tartályok (lásd a 3. függeléket);

e) megfelelő pontosságú mérleg (azaz ±0,5 mg pontosságú).

Víz

12. A vizsgálat céljára bármilyen víz felhasználható, amelyben a vizsgálati fajok kellően hosszú ideig megélnek a vizsgálati körülmények mellett, és növekednek. A víz minőségét a vizsgálat során mindvégig azonos szinten kell tartani. Annak biztosítására, hogy a hígítóvíz ne gyakoroljon nem kívánt hatást a vizsgálat eredményeire (pl. mert komplexet képez a vizsgálati vegyi anyaggal), illetve ne gyakoroljon kedvezőtlen hatásokat a tenyészállomány teljesítményére, időnként mintákat kell venni elemzésre. Nehézfémek (pl. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), főbb anionok és kationok (pl. Ca^{2+}, mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), növényvédő szerek, összes szerves szén és szuszpendált szilárd anyag mérését el kell végezni, például félévente, amennyiben a hígítóvíz ismerten viszonylag állandó minőségű. Az elfogadható minőségű hígítóvíz néhány kémiai tulajdonságának felsorolása a 2. függelékben található. A víz pH-értékének a 6,5–8,5 tartományon belül kell lennie, azonban egy adott vizsgálat során a pH-érték csak ± 0,5 egységgel térhet el a kiindulási értéktől.

Expozíciós rendszer

13. Az expozíciós rendszer kialakítása és az alkalmazott eszközök nem kerültek meghatározásra. A vizsgálati rendszer felépítéséhez üveg, rozsdamentes acél és kémiailag semleges anyagok használhatók, amelyek nem szennyeződtek be korábbi vizsgálatok során. Ebben a vizsgálatban megfelelő expozíciós rendszer lehet a folyamatos vízcserét biztosító átfolyásos rendszer (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13).

Vizsgálati oldatok

14. A vizsgálati vegyi anyag törzsoldatát megfelelő szivattyúval adagolják az expozíciós rendszerbe. Az expozíciót megelőzően a törzsoldat áramlási sebességét a vizsgálati oldatok analitikus módszerrel való megerősítésével összhangban kalibrálják, az áramlási mennyiséget pedig a vizsgálat során rendszeresen ellenőrzik. A vizsgálati oldatot minden kamrában megfelelő módon, a vizsgálati vegyi anyag stabilitásától és a vízminőségtől függően megújítják (pl. legalább napi 5 térfogatcsere és legfeljebb napi 16 térfogatcsere vagy legfeljebb 20 ml/perc áramlás).

15. A kiválasztott koncentrációjú vizsgálati oldatok a törzsoldat hígításával készíthetők el. A törzsoldatot lehetőleg a vizsgálati vegyi anyagnak a hígítóvízbe mechanikai eszközök (pl. keverő és/vagy ultrahang) segítségével történő bekeverésével vagy hozzákeverésével kell elkészíteni. Telítési oszlopok/rendszerek vagy passzív adagolási módszerek (14) is alkalmazhatók a megfelelő koncentrációjú törzsoldat elkészítéséhez. Minden erőfeszítést meg kell tenni az oldószerek vagy hordozók elkerülése érdekében, mivel: (1) bizonyos oldószerek maguk is toxicitást és/vagy nem kívánatos vagy nem várt válaszokat idézhetnek elő, (2) a vegyi anyagoknak a vízoldhatóságuk határán túli vizsgálata (ami gyakran előfordul oldószerek használata esetén) a hatásos koncentráció pontatlan meghatározását eredményezheti, (3) hosszabb távú vizsgálatok során az oldószerek használata jelentős mértékű „biofilmképződést" eredményezhet, ami mikrobiális tevékenységgel jár együtt, amely befolyásolhatja a környezeti feltételeket és a vizsgált koncentrációk fenntartásának képességét, valamint (4) olyan dokumentált adatok hiányában, amelyek igazolják, hogy az oldószer nem befolyásolja a vizsgálat kimenetelét, oldószer használata esetén oldószeres kontrollként szolgáló kezelést kell végezni, aminek állatjóléti következményei vannak, mivel a vizsgálat lefolytatása további állatok bevonását igényli. A nehezen vizsgálható vegyi anyagoknál legvégső esetben lehet oldószert alkalmazni, és a legjobb módszer meghatározása érdekében tanulmányozni kell „A nehezen vizsgálható anyagok és keverékek vízi toxikológiai vizsgálata" című 23. OECD-iránymutatást (15). A megfelelő oldószert a vizsgálati vegyi anyag kémiai tulajdonságai és az oldószer használatára vonatkozó dokumentált adatok rendelkezésre állása alapján választják ki. Oldószerhordozó használata esetén a nem oldószeres (negatív) kontrollok (csak hígítóvíz) mellett értékelni kell megfelelő oldószeres kontrollokat is. Amennyiben elkerülhetetlen az oldószer használata, és mikrobiális tevékenység (biofilmképződés) figyelhető meg, ajánlatos a vizsgálat során (legalább hetente) feljegyezni/jelentésbe foglalni a tartályonkénti biofilmképződést. Ideális esetben az oldószer koncentrációját állandó értéken tartják az oldószeres kontroll és a vizsgálati vegyi anyaggal történő minden kezelés során. Amennyiben az oldószer koncentrációját nem tartják állandó értéken, az oldószeres kontrollban a vizsgálati kezelés során alkalmazott legmagasabb oldószer-koncentrációt kell vizsgálni. Oldószerhordozó használata esetén az oldószer legmagasabb koncentrációja nem haladhatja meg a 100 µl/l vagy 100 mg/l értéket (15), és az oldószer koncentrációját a lehető legalacsonyabb szinten (pl. 20 µl/l alatt) javasolt tartani annak érdekében, hogy az oldószer ne gyakoroljon hatást a mért végpontokra (16).

Kísérlethez felhasznált állatok

A halak kiválasztása és tartása

16. A vizsgálatban alkalmazott halfaj rövid életciklusa és genetikai ivarának meghatározhatósága miatt a japán fogasponty (*Oryzias latipes*). Habár más kistestű halfajokra is kidolgozható hasonló vizsgálati protokoll, a vizsgálati módszerben leírt egyedi eljárások és megfigyelt végpontok kizárólag a japán fogaspontyra alkalmazhatók (lásd az 1. pontot). A fogasponty könnyen szaporítható fogságban; tenyésztésére vonatkozóan léteznek közzétett módszerek (17) (18) (19), továbbá rendelkezésre állnak adatok a rövid időn belüli elhullásával, korai életszakaszával és teljes életciklusával kapcsolatban végzett vizsgálatokból (5) (6) (8) (9) (20). A halakat 16 órás világos és 8 órás sötét időszakot tartalmazó megvilágítás mellett tartják. A halakat élő *Artemia* nauplius sórákkal etetik, szükség esetén kereskedelmi forgalomban kapható pelyhesített haleledellel kiegészítve. Rendszeresen ellenőrizni kell, hogy a kereskedelmi forgalomban beszerezhető haleledel nem tartalmaz-e szennyező anyagokat.

17. A megfelelő haltenyésztési gyakorlatok betartása esetén nem szükséges egyedi tenyésztési protokollt alkalmazni. A fogasponty nevelhető például úgy, hogy 2 literes tartályokba tartályonként 240 lárvát helyeznek a megtermékenyítéstől számított 4. hétig, majd 2 literes tartályokban tartályonként 10 halat tenyésztenek a megtermékenyítéstől számított 8. hétig, amikor tenyészpáronként 2 literes tartályba helyezik át őket.

Akklimatizáció és a halak kiválasztása

18. A kísérleti halakat egyetlen laboratóriumi tenyészetből választják ki, és a vizsgálat megkezdése előtt legalább két hétig a vizsgálat során alkalmazandó vízminőség és megvilágítás mellett akklimatizálják (megjegyzés: az akklimatizációs időszak nem in situ expozíciót előkészítő időszak). Ajánlatos a kísérleti halakat saját tenyészetből beszerezni, mivel a felnőtt halaknál a szállítás stresszhatást vált ki, ami befolyásolhatja az ívás megbízhatóságát. A halakat a tartási időszak és az expozíciós fázis alatt naponta kétszer nauplius sórákkal etetik, szükség esetén kereskedelmi forgalomban kapható pelyhesített haleledellel kiegészítve. A megfelelő szaporulat biztosítása érdekében a vizsgálat megkezdéséhez legalább 42 tenyészpár szükséges (illetve 54 tenyészpár, ha az oldószer használatát alátámasztó dokumentált adatok hiánya miatt oldószeres kontrollt kell végezni). Emellett az F0 generáció minden tenyészpárjánál ellenőrizni kell, hogy XX-XY kromoszómával rendelkeznek-e (ami az egyes ivarok esetében a nemi kromoszómák normál eloszlása), hogy elkerülhető legyen a spontán változás következtében XX kromoszómával rendelkező hímek esetleges belefoglalása a vizsgálatba (lásd a 39. pontot).

19. Az akklimatizációs fázis során fel kell jegyezni a haltenyészetben tapasztalt mortalitási arányt, majd egy 48 órás szoktatási időszakot követően az alábbi követelményeket kell alkalmazni:

— amennyiben a vizsgálati rendszerbe történő áthelyezést megelőző hét napban a mortalitás a halpopuláció 10 %-ánál nagyobb: az egész halállományt ki kell cserélni;

— amennyiben a vizsgálati rendszerbe történő áthelyezést megelőző hét napban a mortalitás a halpopuláció 5–10 %-át érinti: a kéthetes akklimatizációs időszakot további hét nappal meg kell hosszabbítani; amennyiben a mortalitási arány a második hétnapos időszakban meghaladja az 5 %-ot, az egész állományt ki kell cserélni;

— amennyiben a vizsgálati rendszerbe történő áthelyezést megelőző hét napban a mortalitás a halpopuláció kevesebb mint 5 %-át érinti: az állomány alkalmazható a vizsgálathoz.

20. A vizsgálatot megelőző kéthetes akklimatizációs időszak és az expozíciós időszak alatt a halak nem kaphatnak betegség elleni kezelést, lehetőség szerint a betegségeket egyáltalán ne kezeljék. Betegség klinikai tüneteket mutató halak nem használhatók a vizsgálatban. A vizsgálatot megelőző tenyésztési időszakban tett megfigyeléseket, valamint a megelőző és terápiás kezeléseket fel kell jegyezni.

21. Az expozíciós fázist ivari kétalakúságot mutató, ivarérett kifejlett állatok laboratóriumi készletéből származó, genetikai ivaruk szerint azonosított, 25 ±2 °C-on tenyésztett halakkal kell megkezdeni. Olyan halakat kell használni, amelyek a kezelést megelőző hét során bizonyították nemzőképességüket (vagyis élő utódokat nemzettek). A vizsgálatban alkalmazott egész halállomány tekintetében a halak vizsgálat elején mért ivaronkénti egyéni testtömegének az azonos ivarú halak testtömege számtani átlagának ± 20 %-os tartományában kell lennie. Az átlagos testtömeg becsült értékének meghatározása érdekében a vizsgálat előtt le kell mérni a halak egy részmintájának tömegét. Olyan halakat kell kiválasztani, amelyek a megtermékenyítéstől számítva legalább 12 hetesek, a nőstények testtömege minimum 300 mg, a hímeké pedig minimum 250 mg.

VIZSGÁLATI TERV

Vizsgálati koncentrációk

22. A vizsgálati vegyi anyagot öt koncentrációban ajánlatos vizsgálni, plusz a kontroll(ok). A vizsgálati koncentrációtartomány meghatározásánál minden információforrást figyelembe kell venni, ideértve a mennyiségi szerkezetaktivitási összefüggéseket (QSAR-okat), az analógokból kereszthivatkozással kapott adatokat, a halakon végzett vizsgálatok, például az akut toxicitási vizsgálatok (e melléklet C.1. fejezete), a halakon végzett rövid távú reprodukciós vizsgálat (e melléklet C.48. fejezete) és más vizsgálati módszerek, pl. e melléklet C.15., C.37., C.41., C.47. vagy C.49. fejezetében szereplő vizsgálatok (21) (22) (23) (24) (25) (26) rendelkezésre álló eredményeit, illetve ha szükséges, egy, lehetőleg reprodukciós fázist is magában foglaló dóziskereső vizsgálat eredményeit. Amennyiben dóziskereső vizsgálatra van szükség, azt a végleges vizsgálat során alkalmazott körülményekhez hasonló feltételek (vízminőség, vizsgálati rendszer, állatok betelepítése) mellett lehet elvégezni. Amennyiben oldószer használata szükséges, és nem állnak rendelkezésre dokumentált adatok, a dóziskereső vizsgálat használható az oldószer megfelelőségének megállapítására. A legmagasabb vizsgált koncentráció nem haladhatja meg a 10 mg/l vagy 1/10 koncentrációjú 96h-LC50 vízoldhatóságát (27). A legalacsonyabb koncentrációnak 10-szer–100-szor alacsonyabbnak kell lennie a legmagasabb koncentrációnál. Öt vizsgálati koncentráció alkalmazása nem csupán a dózis-válasz összefüggés mérését teszi lehetővé, hanem a megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció (LOEC) és a megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC) meghatározását is, amelyek bizonyos szabályozói programokban vagy jogrendszerben szükségesek a kockázatértékeléshez. Általában a vizsgálati vegyi anyag nominális koncentrációi közötti osztásköz az egymás melletti kezelési szintek tekintetében legfeljebb 3,2.

Vizsgálati csoportok és kontrollok ismétlései

23. Vizsgálati koncentrációnként a vizsgálati kamrákból legalább hat ismétlést kell készíteni (lásd a 7. függeléket). A reprodukciós fázis során (az F0 generáció kivételével) az ismétlések számát meg kell duplázni a fekunditás méréséhez, ebben a fázisban minden ismétlés csak egyetlen tenyészpárt tartalmaz (lásd a 42. pontot).

24. A vizsgálati koncentrációk mellett hígítóvizes kontrollt és ha szükséges, oldószeres kontrollt is kell futtatni. A megfelelő statisztikai erő biztosítása érdekében a kontrollvizsgálatokban a kamrákat dupla mennyiségű ismétlésben kell vizsgálni (vagyis a kontrollokhoz legalább tizenkét ismétlést kell alkalmazni). A reprodukciós fázis során a kontrollokban alkalmazott ismétlések számát meg kell kétszerezni (vagyis legalább 24 ismétlést kell alkalmazni, és mindegyik ismétlés csak egy tenyészpárt tartalmaz). A reprodukciós fázist követően a kontrollként szolgáló ismétlések legfeljebb 20 embriót (halat) tartalmazhatnak.

ELJÁRÁS

A vizsgálat elindítása

25. A vizsgálat F0 generációjának elindításához használt, szaporodásbiológiailag aktív felnőtt halak kiválasztása két követelmény alapján történik: életkor (jellemzően a megtermékenyítéstől számítva legalább 12, legfeljebb 16 hetes egyedek) és a testtömeg (nőstényeknél minimum 300 mg, hímeknél minimum 250 mg).

26. A fenti követelményeknek megfelelő nőstény-hím párokat páronként áthelyezik egy-egy tartályba, vagyis a vizsgálat kezdetén a tartályokból tizenkét ismétlést készítenek a kontrollokhoz és hat ismétlést a vegyi anyaggal való kezelésekhez. A tartályokat véletlenszerűen kezelési (pl. T1–T5 és kontroll) és ismétlési (pl. A–L kontroll és A–F kezelési) csoportba sorolják, majd kialakítják az expozíciós rendszert, az egyes tartályokban biztosítva a megfelelő anyag áramlását.

Az expozíció körülményei

27. A vizsgálati paraméterek és körülmények teljes összefoglalása a 3. függelékben található. A vizsgálati paraméterek és körülmények megvalósítása esetén a kontrollként szolgáló halak végpontértékei hasonlóak a 4. függelékben feltüntetett értékekhez.

28. A vizsgálat során minden kezelt és kontrollcsoport legalább egy kísérleti edényében mérni kell az oldott oxigén koncentrációját, a pH-értéket és a hőmérsékletet. A hőmérséklet kivételével ezeket a méréseket a teljes expozíciós időszak során legalább heti egy alkalommal el kell végezni. Az átlagos vízhőmérsékletnek az egész vizsgálat során 24 és 26 °C között kell lennie. Az expozíciós időszak alatt mindvégig naponta mérni kell a hőmérsékletet. A víz pH-értékének a 6,5–8,5 tartományon belül kell lennie, azonban egy adott vizsgálat során a pH-érték csak ± 0,5 egységgel térhet el a kiindulási értéktől. Az egy kezeléshez tartozó ismétlések statisztikailag nem különbözhetnek egymástól, csakúgy mint az egy vizsgálaton belüli kezelési csoportok sem különbözhetnek statisztikailag egymástól (a napi hőmérsékletmérések alapján, a rövid idejű ingadozásokat leszámítva).

Az expozíció időtartama

29. A vizsgálatban az F0 generáció szaporodóképes halait három héten át kezelik. A 4. héten, körülbelül a 24. vizsgálati napon létrehozzák az F1 generációt, az F0 generáció tenyészpárjait pedig kíméletesen leölik, az egyedek testtömegét és hosszát feljegyzik (lásd a 34. pontot). Ezt követően az F1 generációt további 14 hétig (összesen 15 hétig) kezelik, majd az F2 generációt kezelik a kikelésig tartó két héten keresztül. A vizsgálat teljes időtartama alapvetően 19 hét (vagyis az F2 generáció kikeléséig tart). A vizsgálat ütemezését a 2. táblázat, további részletes magyarázatát pedig a 9. függelék tartalmazza.

Etetési rend

30. A halak *ad libitum* etethetők *Artemia* sórákkal (24 órás naupliusszal), szükség esetén kereskedelmi forgalomban kapható pelyhesített haleledellel kiegészítve. A kereskedelmi forgalomban beszerezhető pelyhesített haleledelben rendszeresen vizsgálni kell a szennyező anyagok – szerves klórt tartalmazó növényvédő szerek, policiklikus aromás szénhidrogének (PAH) és poliklórozott bifenilek (PCB-k) – jelenlétét. Kerülni kell az olyan táplálékokat, amelyek nagy arányban tartalmaznak a vizsgálatban kapott választ esetlegesen befolyásoló, endokrin rendszerre ható anyagokat (pl. fitoösztrogéneket). Az el nem fogyasztott táplálékot és az ürüléket szükség szerint el kell távolítani a kísérleti edényekből, pl. a tartályok alját szifonnal megtisztítva. A tartályok oldalát és alját hetente egy vagy két alkalommal szintén meg kell tisztítani (pl. spatulával le kell kaparni). Az etetési ütemtervre vonatkozó példa az 5. függelékben található. A haleledel mennyisége az egyes tartályokban tartott halak számán alapul. Ezért a haltáp mennyiségét a tartályban bekövetkezett elhalálozásokkal párhuzamosan csökkenteni kell.

Analitikai meghatározások és mérések

31. Az expozíciós időszak megkezdése előtt gondoskodni kell a vegyi anyagot adagoló rendszer megfelelő működéséről. Az összes szükséges analitikai módszernek megalapozottnak kell lennie, ideértve a vegyi anyag tesztrendszerben való stabilitásával kapcsolatos ismereteket. A vizsgálat során a vizsgálati vegyi anyag koncentrációit megfelelő időközönként – lehetőleg legalább hetente egyszer – meghatározzák az egyes kezelési csoportok egyik ismétlésében, az adott kezelési csoporton belül forgórendszerben minden héten másik ismétlést vizsgálva.

32. A vizsgálat során a hígítóvíz és a törzsoldat áramlási sebességét időszakosan (legalább hetente három alkalommal) ellenőrizni kell. Az eredményeket célszerű a ténylegesen mért koncentrációértékekre alapozni. Amennyiben azonban az oldatban lévő vizsgálati vegyi anyag koncentrációját sikerült a vizsgálat során mindvégig a mért átlagértékek ±20 %-os tartományán belül tartani, akkor az eredményeket a névleges vagy a mért értékekre is lehet alapozni. A halakban jelentős mennyiségben felhalmozódó vegyi anyagok esetében a vizsgálati koncentrációk a halak növekedésével párhuzamosan csökkenthetők. Ilyenkor érdemes a kísérleti oldat megújítási arányát minden kamrában úgy meghatározni, hogy a vizsgálati koncentrációk a lehető legállandóbbak legyenek.

Megfigyelések és mért végpontok

33. A mért végpontok közé tartozik a fekunditás, a termékenység, a kikelés, a növekedés és a túlélés, ezek alapján értékelik az esetleges populációszintű hatásokat. Naponta meg kell figyelni a halak viselkedését is, és a szokatlan viselkedési formákat fel kell jegyezni. Más mechanisztikus végpontok közé tartozik a máj *vtg* mRNS vagy VTG fehérje szintjének mérése immunvizsgálattal (28), az ivari fenotípusos markerek, például a hímekre jellemző farok alatti úszó papilláris nyúlványai, az ivarmirigy szerinti nem szövettani értékelése, valamint a vese, a máj és az ivarmirigy kórszövettani értékelése (lásd az 1. táblázatban felsorolt végpontokat). Ezeket a konkrét végpontokat az egyedek genetikai ivara szerint értékelik, amelyet a fogasponty hímivart meghatározó *dmy* génjének jelenléte vagy hiánya alapján állapítanak meg (lásd a 41. pontot). Ezeken túlmenően értékelik az ívásig eltelt időt is. Emellett az egyszerű fenotípusos ivararány meghatározható a farok alatti úszó papilláris nyúlványainak megszámlálása révén, amelynek alapján az egyes fogaspontyok fenotípusos hímként vagy nőstényként azonosíthatók. Ez a vizsgálati módszer várhatóan nem észleli a várt ivaránytól való kis mértékű eltéréseket, mivel az egyes ismétlésekben vizsgált halak viszonylag csekély száma nem biztosít kellő statisztikai erőt. A kórszövettani vizsgálat során az ivarmirigyet értékelik és sokkal hatékonyabb elemzéseket végeznek az ivari fenotípus genetikus ivar tükrében való meghatározásához.

34. E vizsgálati módszer elsődleges célja egy adott vizsgálati vegyi anyag esetleges populációszintű hatásainak felmérése. A mechanisztikus végpontok (a VTG, a másodlagos ivari jellegek (SCC) és az ivarmirigyek kórszövettani elemzésével feltárható bizonyos hatások) szintén hozzájárulhatnak annak megállapításához, hogy valamely hatás visszavezethető-e endokrin aktivitásra. Ezeket a mechanisztikus végpontokat azonban befolyásolhatja szisztémás és egyéb jellegű toxicitás is. Következésképpen a máj és a vese részletes kórszövettani értékelésével elősegíthető a mechanisztikus végpontoknál jelentkező válaszok jobb megértése. Ha ilyen részletes értékelésekre nem kerül sor, a kórszövettani vizsgálat során tapasztalt súlyos rendellenességeket akkor is fel kell jegyezni és fel kell tüntetni a jegyzőkönyvben.

A halak humánus elpusztítása

35. Az F0 és F1 generáció kezelésének végeztével, valamint amikor részmintát veszek az ivarérés előtt álló halakból, a halakon a nyálkahártya-irritáció csökkentése érdekében 300 mg/l $NaHCO_3$ (nátrium-hidrogénkarbonát, CAS-száma: 144-55-8) oldattal pufferolt megfelelő mennyiségű érzéstelenítő oldattal (pl. trikain-metán-szulfonát, MS-222 (CAS-száma: 886-86-2), 100–500 mg/l) eutanáziát kell végrehajtani. Ha a halakon jelentős mértékű szenvedésre utaló jelek figyelhetők meg és elhullásközeli állapotban vannak (súlyosan szenvednek és elhullásukat megbízhatóan előre lehet jelezni), az állatokat érzéstelleníteni kell és el kell altatni, és adatelemzés szempontjából mortalitásként kell kezelni. A betegség miatt elaltatott halakról feljegyzést kell készíteni, amit fel kell tüntetni a jegyzőkönyvben. Attól függően, hogy a halakat a vizsgálat mely szakaszában altatják el, a halakon kórszövettani elemzést végezhetnek (a halat fixálhatják az esetleges kórszövettani elemzéshez).

Az ikrák és a lárvák kezelése

A tenyészpárok ikráinak begyűjtése a következő generáció szaporításához

36. Az ikrákat az F0-ból az F1 generáció létrehozásához a vizsgálat 4. hetének, az F1-ből az F2 generáció létrehozásához pedig a vizsgálat 18. hetének első napján (vagy szükség esetén első két napján) gyűjtik be. A 18. héten az F1 generáció felnőtt halai a megtermékenyítéstől számítva 15 hetesek. Az ikrák begyűjtésének kezdete előtti napon minden tartályból el kell távolítani az összes ikrát, ezáltal biztosítva, hogy a tenyészpártól begyűjtött valamennyi ikra egyetlen ívásból származzon. Az ívást követően a nőstény fogasponty néha a végbélnyílása közelében hordozza az ikrákat, amíg le nem rakja őket szubsztrátumba. Ha nincs szubsztrátum a tartályban, az ikrák vagy a nőstényen, vagy a tartály alján helyezkednek el. Elhelyezkedésüktől függően az ikrákat a nőstényről vagy a tartály aljáról kell szifonnal eltávolítani, az F0 generációnál a vizsgálat 4. hetében, az F1 generációnál pedig a vizsgálat 18. hetében. Az egy kezelésen belül begyűjtött ikrákat egybegyűjtik, majd szétosztják az inkubációs kamrák között.

37. A lerakott ikrákat együtt tartó ikrafonalakat el kell távolítani. Minden tenyészpártól (ismétlésenként 1 pártól) begyűjtik a megtermékenyített ikrákat (legfeljebb 20-at), kezelésenként egybegyűjtik őket, majd szisztematikusan szétosztják a megfelelő inkubációs kamrák között (6. és 7. függelék). Jó minőségű preparálómikroszkóppal láthatók a megtermékenyítés/fejlődés korai jelei, úgy mint a külső magzatburok (chorion), a folyamatban lévő sejtosztódás vagy a hólyagcsíra kialakulása. Az inkubátor kamrák elhelyezhetők az egyes kezelésekhez felállított külön inkubátor akváriumokban (amely esetben a vízminőség paramétereit és a vizsgálati vegyi anyag koncentrációit ezekben kell mérni), illetőleg azokban az akváriumokban, amelyek majd otthont adnak a kikelt lárváknak (pl. a szabad embriónak). Amennyiben a begyűjtés igénybe vesz egy második napot is (a vizsgálat 23. napját), a két nap alatt begyűjtött valamennyi ikrát egybegyűjtik, majd szisztematikusan szétosztják az egyes kezelt ismétlések között.

Ikrák nevelése a kikelésig

38. A megtermékenyített ikrákat folyamatosan mozgatják, például az ikrakeltető inkubátoron belül előállított légbuborékokkal, vagy az inkubátor függőleges irányú mozgatásával. A megtermékenyített ikrák (embriók) mortalitását naponta ellenőrizni és rögzíteni kell. Az elpusztult ikrákat eltávolítják az inkubátorokból (9. függelék). A megtermékenyítés utáni 7. napon leállítják az ikrák mozgatását vagy csökkentik annak intenzitását, hogy a megtermékenyített ikrák le tudjanak ülepedni az inkubátor aljára. Ez ugyanis elősegíti a többnyire a következő egy vagy két napban bekövetkező kikelésüket. Az egyes ismétlésekben kikelt ivadékokat (fiatal lárvákat; szabad embriókat) kezelésenként és kontrollonként egybegyűjtik és megszámlálják. Azokat a megtermékenyített ikrákat, amelyek nem keltek ki a kontroll átlagos kikelési napjának kétszereséig (ami általában a megtermékenyítés utáni 16. vagy 18. nap), életképtelennek tekintik és eltávolítják.

39. Minden tartályba tizenkét ivadékot helyeznek át. A inkubátor kamrákból egybegyűjtik az ivadékokat, és szisztematikusan szétosztják a tartályok között (7. függelék). Ez történhet úgy, hogy véletlenszerűen kiválasztanak egy ivadékot az egybegyűjtött kezelt állományból, majd egymás után hozzátesznek egy-egy válogatás nélkül kiválasztott ivadékot az egyik akváriumba. Mindegyik tartálynak azonos számú (n=12) kikelt lárvát kell tartalmaznia (tartályonként legfeljebb 20-at). Amennyiben nincs elég ivadék az összes kezelni szándékozott ismétlés feltöltéséhez, akkor arra kell törekedni, hogy a lehető legtöbb ismétlés tartalmazzon 12 ivadékot. Az ivadékok biztonságos kezelését vastag üveg pipettával lehet biztosítani. A létszám feletti ivadékokat érzéstelenítővel humánus módon elaltatják. A tenyészpárok kialakítását megelőző néhány hétben fel kell jegyezni az egyes ismétléseknél megfigyelt első ívási esemény napját.

Tenyészpárok kialakítása

Úszók bevágása és a genotípusos ivar megállapítása

40. Az úszók genotípusos ivar meghatározására szolgáló bevágására a megtermékenyítés utáni 9–10. héten (pl. az F1 generáció esetében a vizsgálat 12–13. hetében) kerül sor. A tartályban lévő valamennyi halat – jóváhagyott módszerek, pl. IACUC használatával – elaltatják, majd az egyedek genotípusos ivarának meghatározásához kis méretű szövetmintát vesznek minden hal farokúszójának háti vagy hasi csúcsából (29). Az egy ismétlésből származó halak tárolhatók a tartályban elhelyezett kis ketrecekben, lehetőleg egyenként. Egy ketrecben tárolható két hal is, amennyiben megkülönböztethetők egymástól. Megkülönböztethetőségük biztosítható például úgy, hogy a szövetmintavétel során más-más részét vágják le a farokúszónak (pl. az egyiknél a háti csúcsát, a másiknál a hasi csúcsát).

41. A fogasponty genotípusos ivarát az Y-kromoszómán található azonosított gén (*dmy*) alapján határozzák meg. A *dmy* jelenléte a fenotípustól függetlenül XY egyedet jelez, míg a *dmy* hiánya a fenotípustól függetlenül XX egyedet jelez (30); (31). Minden levágott úszóból kivonják a dezoxiribonukleinsavat (DNS-t), majd polimeráz láncreakciót (PCR) alkalmazó módszerekkel megállapítják a *dmy* jelenlétét vagy hiányát (lásd e melléklet C.41. fejezetének 9. függelékét, vagy a (29) 3. és a 4. függelékét).

Tenyészpárok létrehozása

42. A genotípusos ivarról kapott információk alapján kialakítják az XX-XY tenyészpárokat, a fenotípus külső jeleitől függetlenül, amelyeket módosíthatott a vizsgálati vegyi anyaggal való kezelés. Az egyedek genotípusos ivarának megállapítását követő napon minden replikátumtartályból véletlenszerűen kiválasztanak két XX és két XY halat, és létrehoznak két XX-XY tenyészpárt. Amennyiben valamely ismétlés nem tartalmaz két XX vagy két XY halat, a kezeléshez tartozó többi ismétlésből kell kiválasztani a megfelelő ivarú halakat. Arra kell törekedni, hogy a tenyészpárok ajánlott száma (12) minden kezelt és kontrollként szolgáló tartályban biztosítva legyen (24). A nyilvánvaló rendellenességeket (pl. úszóhólyag problémákat, gerinc deformitást, szélsőséges méretbeli eltérést stb.) mutató halakból nem alakítanak ki tenyészpárokat. Az F1 generáció reprodukciós fázisában minden tartályban csak egyetlen tenyészpárt szabad elhelyezni.

Mintavétel ivarérés előtt álló halakból és a végpontok értékelése

Mintavétel nem tenyészpár halakból

43. A tenyészpárok kialakítását követően a további tenyésztés célja ki nem választott halakat a vizsgálat 12–13. hetében (F1) kíméletesen leölik, hogy megmérik az ivarérés előtt álló halak végpontjait. Rendkívül fontos, hogy a halakat olyan módon kezeljék, hogy a tenyészpárok kiválasztásához meghatározott genotípusos ivart vissza lehessen vezetni az egyedekre. Az összegyűjtött adatokat ugyanis az adott egyed genotípusos ivarának fényében elemzik. Az egyes

halakon számos végpont mérését végzik el, azon belül: meghatározzák a növendék/ivarérés előtt álló halak túlélési arányát (a vizsgálat 7–12./13. hetében, F1), a hossznövekedést (standard hossz mérhető, ha a genetikai ivar elemzéséhez történő mintavétel során lerövidítették a farokúszót. Teljes hossz mérhető, ha a *dmy* meghatározásához a farokúszónak csak a háti vagy hasi részéből vettek mintát), a testtömeget (nedves tömeg, szárazra itatva), a máj *vtg* mRNS (vagy VTG) szintjét és a farok alatti úszó papilláris nyúlványainak számát (lásd az 1. és a 2. táblázatot). A kezelt csoportok átlagos növekedésének kiszámításához szükség van a tenyészpárok testtömegére és testhosszára is.

Szövetmintavétel és a vitellogenin mérése

44. A májat preparálják, majd a *vtg* mRNS (vagy VTG) méréséig −70 °C-on vagy alacsonyabb hőmérsékleten tárolják. A halak farkát a farok alatti úszóval együtt megfelelő (például Davidson-féle) fixálószerben tartósítják, illetve lefényképezik, hogy később megszámlálhatók legyenek a farok alatti úszó papilláris nyúlványai. Ekkor szükség szerint más szövetmintákat is levehetnek és tartósíthatnak (pl. az ivarmirigyből). A máj VTG-koncentrációját homológ ELISA eljárással kell mérni (a fogasponty esetében ajánlott eljárásokat lásd a jelen melléklet C.48. fejezetének 6. függelékében). A vtg mRNS szintjének mérésére szolgáló módszereket – amelyek során a *vtg I* gén mRNS-ét kivonják a májmintából és kvantitatív polimeráz láncreakcióval meghatározzák a (teljes mRNS 1 ng-jában lévő) *vtg I* génkópiák számát – az U.S. EPA dolgozta ki (29). A kezelt és a kontrollcsoportok *vtg* génkópiáinak számszerű meghatározása helyett egy kevesebb erőforrást igénylő és technikailag egyszerűbben kivitelezhető módszer a kezelt és kontrollcsoportokban létrejövő *vtg I* expresszió relatív (valahányszoros) változásának meghatározása.

Másodlagos ivari jellegek

45. Rendes körülmények között csak ivarérett felnőtt hím fogaspontyok rendelkeznek papilláris nyúlványokkal, amelyek bizonyos farok alatti úszósugarak összekapcsolódott lemezein fejlődnek ki másodlagos ivari jellegként, potenciális biomarkert szolgáltatva az endokrin rendszert zavaró hatások felméréséhez. A farok alatti úszó papilláris nyúlványainak (papilláris nyúlványokkal rendelkező összekapcsolódott lemezek számának) meghatározási módszerét a 8. függelék tartalmazza. Emellett a farok alatti úszó papilláris nyúlványainak számát használják fel az adott egyed külsőleg fenotípusos hímként vagy nőstényként való besorolására, amelynek alapján meghatározzák az egyes ismétlések egyszerű ivararányát. A nullánál több papilláris nyúlvánnyal rendelkező fogaspontyok hímnek minősülnek; a papilláris nyúlvány nélküli fogaspontyok nősténynek minősülnek.

A fekunditás és a termékenység értékelése

46. A fekunditást és a termékenységet az F0 generáció tekintetében a vizsgálat 1–3. hetében, az F1 generáció tekintetében pedig a vizsgálat 15–17. hetében értékelik. Minden tenyészpár ikráit 21 egymást követő napon keresztül naponta begyűjtik. Az ikrákat reggelente óvatosan eltávolítják a hálóba fogott nőstényekről és/vagy szifonnal az akvárium aljáról. Az egyes ismétlésekben vizsgált tenyészpárokat illetően naponta feljegyzik a fekunditást és a termékenységet. A fekunditást a lerakott ikrák száma alapján, a termékenységet pedig a számlálás idején megtermékenyítettnek és életképesnek minősített ikrák száma alapján határozzák meg. A számlálást az ikrák begyűjtése után a lehető leghamarabb el kell végezni.

47. Az ismétléseknél mért fekunditást, vagyis a tenyészpáronkénti ikrák számát naponta feljegyzik, és az ismétlések átlaga alapján az ajánlott statisztikai eljárások szerint elemzik. Egy adott ismétlés termékenységét úgy határozzák meg, hogy a tenyészpár által termelt megtermékenyített ikrák összesített számát elosztják a tenyészpár által termelt ikrák összesített számával. Statisztikailag a termékenységet ismétlésenkénti arányszámként elemzik. Egy adott ismétlés kikelési arányának meghatározásához elosztják az ivadékok számát a betelepített embriók számával (ami általában 20). Statisztikailag a kikelési arányt ismétlésenkénti arányszámként elemzik.

Mintavétel felnőtt halakból és a végpontok értékelése

Mintavétel tenyészpár halakból

48. A vizsgálat 17. hetét követően (vagyis miután az F2 generációt sikerrel elindították), az F1 generáció felnőtt halait kíméletesen leölik, és értékelik a különböző végpontokat (lásd az 1. és a 2. táblázatot). A farok alatti úszóról felvételt készítenek a farok alatti úszó papilláris nyúlványainak értékeléséhez (lásd a 8. függeléket) és/vagy a farkat a végbélnyílás poszterior végétől eltávolítják és fixálják a papilláris nyúlványok későbbi megszámlálásához. Ekkor igény szerint a farokúszó egy részéből mintát vehetnek és eltárolhatják a genetikai ivar (*dmy)* ellenőrzéséhez. Szükség szerint szövetmintát lehet venni a *dmy* elemzésnek megismétléséhez, amelynek révén ellenőrizhető egy adott hal genetikus ivara. A testüreget felnyitják, hogy lehetővé tegyék a megfelelő (pl. Davidson-féle) fixálószer átáramlását, mielőtt az egész testet belemerítenék a fixálószerbe. Ha azonban a fixálás előtt gondoskodnak a megfelelő permeabilitásról, a testüreget nem szükséges felnyitni.

Kórszövettan

49. Minden halon szövettani vizsgálatot végeznek az ivarmirigyszövet kóros elváltozásainak megállapításához (30); (29). A 33. pontban említettek szerint a vizsgálat során értékelt más mechanisztikai végpontokat (pl. a VTG, a másodlagos ivari jellegek (SCC) és az ivarmirigyek kórszövettani elemzésével feltárható bizonyos hatások) befolyásolhatja szisztémás vagy más jellegű toxicitás. Következésképpen a máj és a vese részletes kórszövettani értékelésével elősegíthető a mechanisztikus végpontoknál jelentkező válaszok jobb megértése. Ha ilyen részletes értékelésekre nem kerül sor, a kórszövettani vizsgálat során tapasztalt súlyos rendellenességeket akkor is fel kell jegyezni és fel kell tüntetni a jegyzőkönyvben. Fontolóra vehető a (kontrollhoz képest) legmagasabb koncentrációval kezelt csoporttól a hatás nélküli koncentrációval kezelt csoportig lefelé lépegető vizsgálat, bár ajánlatos tanulmányozni a kórszövettani iránymutatást (29). Általában feldolgoznak minden mintát, illetve metszetet készítenek belőlük, amelyeket a kórboncnok elemez. Megjegyzendő, hogy lefelé haladó megközelítés alkalmazásánál a Rao–Scott Cochrane–Armitage by Slices (RSCABS) eljárás azon a feltevésen alapul, hogy a dózisszintek növelésével párhuzamosan növekszik a biológiai (patológiai) hatás. Ezért a statisztikai erő csökkenésével kell számolni, ha egyetlen magas dózist vizsgálnak közbeeső dózisok nélkül. Amennyiben nincs szükség statisztikai elemzéshez annak megállapítására, hogy a magas dózis nem fejt ki hatást, akkor ez a megközelítés elfogadható lehet. Az értékelés során megállapítják az ivari fenotípust.

Egyéb észrevételek

50. A fogaspontyon végzett kibővített egygenerációs vizsgálatból származó adatok felhasználhatók (pl. bizonyíték súlyán alapuló megközelítés keretében) arra, hogy egyidejűleg értékeljenek legalább két, reprodukciós károsodást okozó általános káros kimeneti út típust: a) a hipotalamusz-hipofízis-gonád (HPG) endokrin tengely károsodását előidéző, endokrin rendszer által közvetített utakat; és b) nem az endokrin rendszer által közvetített toxicitás révén a túlélés, a növekedés (testhossz és testtömeg), valamint a szaporodás visszaesését okozó utakat. Ez a vizsgálat magában foglalja a jellemzően a krónikus toxicitási vizsgálatokban, például a teljes életciklussal és a korai életszakasszal kapcsolatos vizsgálatokban mért végpontokat, amelyek felhasználhatók mind a nem endokrin rendszer által közvetített toxikus hatásmechanizmusok, mind az endokrin rendszer által közvetített toxicitási utak jelentette veszélyek értékelésére. A vizsgálat során naponta meg kell figyelni a halak viselkedését, és a szokatlan viselkedési formákat fel kell jegyezni. Emellett fel kell jegyezni az elhalálozásokat, valamint ki kell számolni a halaknak a vizsgálat 6./7. hetében bekövetkező selejtezéséig megfigyelt túlélési arányát, a selejtezéstől az ivarérés előtt álló halakból történő mintavételig (a megtermékenyítés utáni 9–10. hét) megfigyelt túlélési arányát és a párok kialakításától a felnőtt halakból történő mintavételig megfigyelt túlélési arányát.

1. táblázat

A MEOGRT végpontjainak áttekintése (*)

Életszakasz	Végpont	Generáció
Embrió (megtermékenyítés utáni 2. hét)	Kikelés (% és a kikelésig eltelt idő)	F1, F2
Növendék (megtermékenyítés utáni 4. hét)	Túlélés	F1
Ivarérés előtt álló (megtermékenyítés utáni 9–10. hét)	Túlélés	F1
	Növekedés (testhossz és testtömeg)	
	Vitellogenin (mRNS vagy fehérje)	
	Másodlagos ivari jellegek (farok alatti úszó papilláris nyúlványai)	
	Külsőleg látható ivar aránya	
	1. ívásig eltelt idő	
Felnőtt (megtermékenyítés utáni 12–14. hét)	Szaporodás (fekunditás és termékenység)	F0, F1
Felnőtt (megtermékenyítés utáni 15. hét)	Túlélés	F1
	Növekedés (testhossz és testtömeg)	
	Másodlagos ivari jellegek (farok alatti úszó papilláris nyúlványai)	
	Kórszövettan (ivarmirigy, máj, vese)	

(*) Ezeket a végpontokat statisztikailag elemezni kell.

ÜTEMEZÉS

51. A fogaspontyon végzett kibővített egygenerációs vizsgálat (MEOGRT) 2. táblázatban illusztrált ütemterve bemutatja a vizsgálatot. A MEOGRT magában foglalja az F0 generáció felnőtt halainak 4 hetes kezelését, az F1 generáció 15 hetes kezelését és a második (F2) generáció expozíciós időszakát a kikelésig (megtermékenyítés utáni 2. hét). A MEOGRT során végzett tevékenységeket a 9. függelék foglalja össze.

2. táblázat

A MEOGRT során alkalmazott expozíció és végpontmérések ütemezése

MEOGRT expozíciójának és végpontméréseinek ütemezése

F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																		1	2
Vizsgálati hét	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Életszakasz					**Embrió**					**Lárva**					**Növendék**			**Ivarérés előtt álló**	**Felnőtt**
Végpontok																			
Fekunditás	F_0														F_1				
Termékenység	F_0														F_1				
Kikelés					F_1														F_2
Túlélés						F_1						F_1						F_1	
Növekedés				F_0								F_1						F_1	
Vitellogenin												F_1							
Másodlagos ivar												F_1						F_1	
Kórszövettan																		F_1	
Vizsgálati hét	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

- A kísérleti terv 7, ismétlésekből álló csoportot tartalmaz
  - 5 a vizsgálati vegyi anyaggal való kezelésekhez
  - 2 a kontroll kezelésekhez (oldószer alkalmazása esetén 4)
- Csoporton belüli kialakítás
  - 12 ismétlés a szaporodás, a felnőtt patológia és az SCC méréséhez (10–18. h)
  - 6 ismétlés a kikelés, a túlélés, a Vtg, az ivarérés előtt álló egyedek SCC-jének és a növekedés méréséhez (1–9. h)

SSC: másodlagos ivari jellegek; H: hét; Vtg: vitellogenin

ADATOK ÉS JELENTÉS

Statisztikai elemzés

52. Mivel minden kísérleti hal esetében meghatározzák a genotípusos ivart, az adatokat a genotípusos ivar (vagyis XY hímek és XX nőstények) szerint külön kell elemezni. Ellenkező esetben az elemzések statisztikai ereje jelentősen csökken. Az adatok statisztikai elemzéséhez lehetőség szerint az „Aktuális megközelítések az ökotoxicitási adatok statisztikai elemzésében: alkalmazási útmutató” (32) című OECD-dokumentumban leírt eljárásokat kell követni. A statisztikai elemzéshez a 10. függelék nyújt további útmutatást.

53. A vizsgálati tervet úgy kell kialakítani és olyan statisztikai vizsgálatokat kell választani, hogy a biológiai szempontból fontos változásokat az olyan végpontokon, ahol megfigyelhető hatást nem okozó koncentrációt kell jelenteni, megfelelő statisztikai erővel lehessen észlelni (32). A releváns hatásos koncentrációk és paraméterek jegyzőkönyvezése a szabályozási kerettől függhet. Meg kell határozni a százalékos változást minden egyes végponton, amelyet fontos kimutatni vagy megbecsülni. A vizsgálatot úgy kell kialakítani, hogy ez megoldható legyen. Nem valószínű, hogy a százalékos változás minden végponton megegyezik, és az sem valószínű, hogy olyan megvalósítható kísérletet lehet tervezni, amely minden végpont tekintetében megfelel a fenti feltételeknek, tehát a kísérlet megfelelő kialakítása során azokra a végpontokra kell összpontosítani, amelyek az adott kísérlet szempontjából lényegesek. A 10. függelék statisztikai folyamatábrát és útmutatást tartalmaz, amelyek segítséget nyújtanak az adatok kezeléséhez, valamint a legmegfelelőbb statisztikai vizsgálat vagy modell kiválasztásához. Alkalmazhatók más statisztikai megközelítések is, amennyiben azok használata tudományos szempontból indokolt.

54. Szükséges a párhuzamos eredmények közti eltérések varianciaanalízissel vagy kontingenciatáblázatos módszerrel való elemzése, és az elemzés alapján a megfelelő statisztikai elemző módszerek alkalmazása. Az egyedi koncentrációszinteknél és a kontrollcsoport koncentrációszintjeinél kapott eredmények közötti összetett összehasonlítás érdekében folytonos válaszok esetén ajánlatos lefelé lépegető eljárást (pl. Jonckheere–Terpstra-féle próbát) alkalmazni. Amennyiben az adatok nem jellemezhetők monoton koncentráció-válasszal, Dunnett-féle vagy Dunn-féle próba alkalmazandó (szükség esetén az adatok megfelelő transzformálása után).

55. A fekunditás értékeléséhez az ikrákat naponta megszámlálják, az adatok azonban elemezhetők teljes ikraszámként vagy ismételt mérésként. A 10. függelék részletesen ismerteti e végpont elemzési módját. A súlyosság szerint pontszámozott kórszövettani adatok értékeléséhez kifejlesztettek egy új statisztikai próbát, a Rao–Scott Cochran–Armitage by Slices (RSCABS) trendpróbát (33).

56. A vegyi anyaggal történő kezelés során megfigyelt, a megfelelő kontrolloktól jelentős mértékben eltérő végpontokat bele kell foglalni a jelentésbe.

Adatelemzési szempontok

Érvénytelen kezelési szintek használata

57. Számos tényezőt kell figyelembe venni annak eldöntésekor, hogy az ismétlés vagy a teljes kezelés nyilvánvaló toxicitást mutat-e, melynek következtében ki kell zárni az elemzésből. A nyilvánvaló toxicitás meghatározása: a megtermékenyítés utáni 3. és 9. hét között bármelyik ismétlésben tapasztalt 4-nél több elhullás, amely technikai hibával nem magyarázható. A nyilvánvaló toxicitás egyéb tünetei közé tartoznak a vérzés, a rendellenes viselkedés, a rendellenes úszásminták, az anorexia és bármely egyéb betegségre utaló klinikai tünet. A toxicitás szubletális jelei tekintetében kvalitatív értékelésre lehet szükség, amelyet mindig a (csak tiszta vizet tartalmazó) hígítóvizes kontrollcsoporthoz viszonyítva kell elvégezni. Amennyiben a legmagasabb koncentrációval végzett kezelés(ek)ben nyilvánvaló toxicitás figyelhető meg, ajánlatos ezeket a kezeléseket kizárni az elemzésből.

Oldószeres kontrollok

58. Oldószer használatát csak a legvégső esetben szabad megfontolni, ha már minden egyéb kémiai bejuttatási lehetőséget számításba vettünk. Oldószer használata esetén párhuzamosan egy hígítóvizes kontrollt is kell futtatni. A vizsgálat befejezésekor értékelni kell az oldószer lehetséges hatásait. Ezt az oldószeres kontrollcsoport és a hígítóvizes kontrollcsoport statisztikai összehasonlítása útján végzik el. A legfontosabb vizsgálandó végpontok az elemzés során a növekedés meghatározói (tömeg), mivel az általános toxicitás ezeket tudja befolyásolni. Ha statisztikailag szignifikáns különbségeket mutatnak ki a hígítóvizes és az oldószeres kontrollcsoportok között e végpontok tekintetében, a legjobb szakmai megítélés alapján kell dönteni arról, hogy érvénytelennek tekinthető-e a vizsgálat. Amennyiben a két kontroll között eltérések tapasztalhatók, a vegyi anyaggal végzett kezeléseket az oldószeres kontrollal kell összevetni, kivéve ha ismert, hogy a hígítóvízzel való összehasonlítást részesítik előnyben. Amennyiben a két kontrollcsoport között nincs statisztikailag szignifikáns különbség, ajánlatos a vizsgálati vegyi anyaggal végzett kezeléseket az összevont oldószeres és hígítóvizes kontrollcsoportokkal összevetni, kivéve ha ismert, hogy csak a hígítóvizes vagy csak az oldószeres kontrollcsoporttal való összehasonlítást részesítik előnyben.

Vizsgálati jegyzőkönyv

59. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag: fizikai jelleg és adott esetben a fizikai-kémiai tulajdonságok;

— kémiai azonosító adatok.

Egy összetevőből álló anyag:

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— kémiai azonosító adatok, például IUPAC- vagy CAS-név, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet, tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. (ideértve adott esetben a szervesszén-tartalmat).

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítójával (lásd fent), mennyiségi előfordulásával és releváns fizikai-kémiai tulajdonságaival jellemezve.

Vizsgálati fajok:

— tudományos név, törzs (ha meghatározható), forrás és a megtermékenyített peték begyűjtésének módja, valamint a későbbi kezelés.

Vizsgálati körülmények:

— megvilágítási időszak(ok);

— vizsgálati terv (pl. a kamra mérete, az anyagok és a víz mennyisége, a vizsgálati kamrák és az ismétlések száma, az ivadékok létszáma az ismétlésekben);

— a törzsoldat elkészítésének módszere és a vízcsere gyakorisága (az esetleg használt diszpergálószer nevét és koncentrációját meg kell adni);

— a vizsgálati vegyi anyag adagolásának módszere (például szivattyú, hígítási rendszerek);

— a módszer visszanyerési hatékonysága és a névleges vizsgálati koncentrációk, a meghatározási határ, a mért értékek átlaga és szórása a vizsgálati edényekben, az ilyen adatok megszerzésének módszerei és bizonyítékok annak alátámasztására, hogy a mérések a valódi oldatban lévő vizsgálati vegyi anyag koncentrációszintjeire vonatkoznak;

— a hígítóvíz jellemzői: pH-érték, keménység, hőmérséklet, oldottoxigén-koncentráció, maradékklór-tartalom (amennyiben mérik), teljes szervesszén-tartalom (amennyiben mérik), szuszpendált szilárd anyagok (amennyiben mérik), a vizsgálati közeg sótartalma (amennyiben mérik) és bármely más mérési adat;

— a névleges vizsgálati koncentrációk, a mért értékek átlaga és ezek standard deviációja;

— vízminőség a tesztedényekben: pH-érték, (napi) hőmérséklet és oldottoxigén-koncentráció;

— részletes információk a táplálékról (pl. a haltápok típusa, eredete, az adagolt mennyiség és az adagolás gyakorisága).

Eredmények:

— bizonyíték arra, hogy a kontrollok teljesítették az általános érvényességi kritériumokat;

— a kontroll (és alkalmazása esetén az oldószeres kontroll) és a kezelt csoportok következő adatai: az F1 és az F2 generáció kikelése (kikelési arány és a kikelésig eltelt idő), az F1 kikelést követő túlélési aránya, az F1 növekedése (hossz és testtömeg), az F1 genotípusos ivara és ivari differenciálódása (pl. a farok alatti úszó papilláris nyúlványai és az ivarmirigy szövettana alapján meghatározott másodlagos ivari jellegek), az F1 fenotípusos ivara, az F1 másodlagos ivari jellegei (farok alatti úszó papilláris nyúlványai), az F1 *vtg* mRNS (vagy VTG fehérje) szintje, az F1 kórszövettani értékelése (ivarmirigy, máj és vese), valamint az F0 és F1 szaporodási képessége (fekunditás és termékenység); (lásd az 1. és a 2. táblázatot).

— a statisztikai elemzés során alkalmazott megközelítés (regressziós analízis vagy varianciaanalízis) és az adatok feldolgozása (az alkalmazott statisztikai vizsgálatok és modellek);

— megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC) minden egyes kiértékelt válaszreakcióra nézve;

— megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció (LOEC) minden egyes kiértékelt válaszreakcióra nézve (p=0,05 értéknél); EC_x adott esetben minden egyes kiértékelt válaszreakcióra nézve, konfidencia-intervallumok (például 90 vagy 95 %) és a számításhoz használt illesztett modell grafikonja, a koncentráció-válasz görbe meredeksége, a regressziós modell egyenlete, a modell becsült paraméterei és a becslés standard hibái;

— az e vizsgálati módszertől való eltérések, az elfogadhatósági kritériumoktól való eltérések, és a vizsgálat kimenetelére gyakorolt lehetséges hatásukkal kapcsolatos megfontolások.

60. A végpontmérések eredményeit illetően fel kell tüntetni az átlagértékeket és az azoktól való standard deviációt (lehetőség szerint az ismétlések és a koncentrációk alapján).

SZAKIRODALOM

(1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(2) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K and Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. Current Protocols in Toxicology 39: 1-36.

(3) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(4) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. Water Research 16: 457-464.

(5) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T and Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 19: 1925-1930.

(6) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T and Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 20: 2552-2560.

(7) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and Honjo T. (2002). Effects of 17β-Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Chemosphere 47: 71-80.

(8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 21: 1692-1698.

(9) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-*Tert*-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 22: 1487-1496.

(10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. Aquatic Toxicology 79: 288-295.

(11) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. Aquatic Toxicology 77: 78-86.

(12) Nakamaura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T and Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Journal of Applied Toxicology 35:11-23.

(13) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Elérhető a következő címen:http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html.

(14) Adolfsson-Erici M, Åkerman g, Jahnke A, Mayer P and McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. Chemosphere 86: 593-599.

(15) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 23.), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(16) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69-92.

(17) Denny JS, Spehar RL, Mead KE and Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.

(18) Koger CS, Teh SJ and Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). Biology of Reproduction 61: 1287-1293.

(19) Kinoshita M, Murata K, Naruse K and Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.

(20) Gormley K and Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. Ecotoxicology and Environmental Safety 54: 330-338.

(21) E melléklet C.15., Rövid távú toxicitási vizsgálat halembriókkal és hallárvákkal című fejezete.

(22) E melléklet C.37., 21 napos halvizsgálat: Az ösztrogén- és androgénhatás, valamint az aromatázgátlás rövid távú szűrővizsgálata című fejezete.

(23) E melléklet C.41., Halak ivari fejlődésének vizsgálata című fejezete.

(24) E melléklet C.48., Halak rövid távú reprodukciós vizsgálata című fejezete.

(25) E melléklet C.47., A halak korai életszakaszára vonatkozó toxicitási vizsgálat című fejezete.

(26) E melléklet C.49., Halembriók akut toxicitási vizsgálata (FET) című fejezete.

(27) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. Chemosphere 92: 1067-1076.

(28) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50: 301-308.

(29) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(30) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Schartl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. Genetics 163: 245-251.

(31) Shinomiya, A, Otake H. Togashi K. Hamaguchi S and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, Zoological Science 21: 613-619.

(32) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

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

1. Függelék

Fogalommeghatározások

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

ELISA: enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay).

Fekunditás = ikrák száma;

Termékenység = életképes ikrák száma/fekunditás;

Villás elágazású hossz: a farok tövéig mért hossz az orrcsúcs és a farokúszó középső sugarának végpontja közötti távolság, és olyan halak esetében alkalmazandó, amelyeknél nehéz meghatározni, hogy a gerincoszlop hol ér véget (www.fishbase.org)

Kikelési arány = ivadékok/az inkubátorba helyezett embriók száma

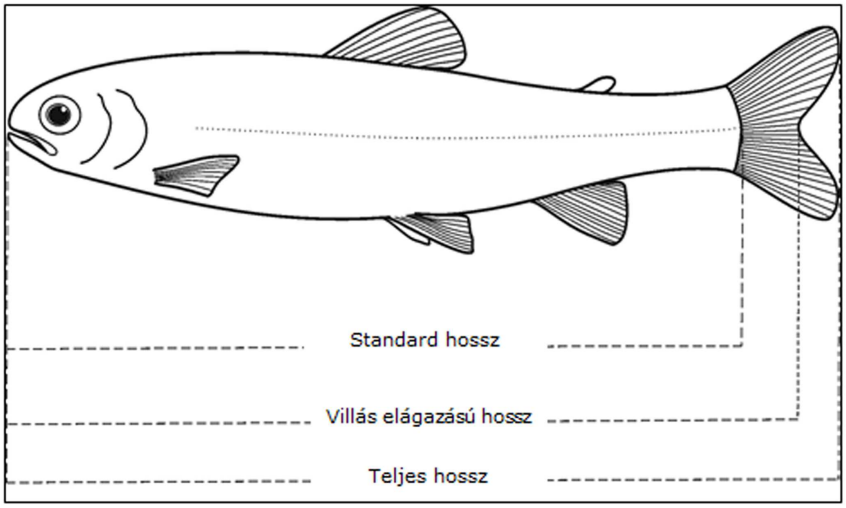
IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee (Állatgondozással és -felhasználással foglalkozó intézményi bizottság).

Standard hossz: az orrcsúcstól az utolsó csigolya poszterior végéig vagy a hipurális lemez mediolaterális részének poszterior végéig mért távolság. Leegyszerűsítve ez a mérés nem tartalmazza a farokúszó hosszát (www.fishbase.org).

Teljes hossz: az orrcsúcs és a farokúszó hosszabbik lebenyének csúcsa közötti távolság, amelyet általában a lebenyek középvonal mentén való összenyomásával mérnek. Ez egy egyenes vonalú mérés, nem követi a test görbületét (www.fishbase.org).

1. ábra

A Használt Különböző Hosszúságok Leírása



ECx: (hatásos koncentráció x % hatás eléréséhez) az a koncentráció, amely valamely hatás x %-át okozza a vizsgálati szervezetekben egy adott expozíciós időn belül, a kontrollal összehasonlítva. Például az EC50 az a becsült koncentráció, amely a vizsgálat valamilyen végpontja tekintetében a kitett populáció 50 %-ában okoz hatást a meghatározott expozíciós idő alatt.

Átfolyásos vizsgálat: az expozíció során a vizsgálati oldat vizsgálati rendszeren történő folyamatos áramlása mellett folytatott vizsgálat.

HPG-tengely: hipotalamusz-hipofízis-gonád tengely.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (Elméleti és Alkalmazott Kémia Nemzetközi Uniója).

Betelepítési arány: a halak nedvesen mért tömege egységnyi mennyiségű vízben.

Megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció (LOEC): a vizsgálati vegyi anyag azon legalacsonyabb vizsgálati koncentrációja, amelynél a kontrollal összevetve még megfigyelhető a vegyi anyag statisztikailag szignifikáns hatása ($p < 0,05$). Azonban az LOEC-szint feletti valamennyi vizsgálati koncentrációnak olyan ártalmas hatást kell kifejtenie, amely legalább egyenlő az LOEC-szinten megfigyelttel vagy súlyosabb annál. Amennyiben e két feltétel nem teljesíthető, akkor kimerítő magyarázatot kell adni arra, hogy hogyan történt az LOEC (és ennélfogva az NOEC) kiválasztása. Az 5. és 6. függelék útmutatást ad.

Medián letális koncentráció (LC50): a vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely a becslések szerint a vizsgálat időtartama alatt a vizsgálati szervezetek 50 %-ára nézve halálos.

Megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC): a közvetlenül az LOEC alatti vizsgálati koncentráció, amely – a kontrollcsoporttal való összevetésben – nem fejt ki statisztikailag szignifikáns hatást ($p < 0,05$) a meghatározott expozíciós időszak alatt.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification (molekulák egyszerűsített egy sorban történő beviteli rendszere).

Betelepítési sűrűség: a halak száma egységnyi mennyiségű vízben.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

UVCB: ismeretlen szerkezetű vagy változó összetételű, összetett reakcióban keletkezett vagy biológiai eredetű anyagok.

VTG: a vitellogenin a szikben található foszfo-, lipo- és glikoproteinek prekurzora, amely alapesetben az ikrarakó fajok szexuálisan aktív nőstényeiben fordul elő.

WPF: a megtermékenyítéstől számított hetek száma.

2. Függelék

AZ ELFOGADHATÓ MINŐSÉGŰ HÍGÍTÓVÍZ NÉHÁNY FONTOSABB KÉMIAI TULAJDONSÁGA

Anyag	Határkoncentráció
Szálló por	5 mg/l
Teljes szervesszén-tartalom	2 mg/l
Nem ionizált ammónia	1 µg/l
Maradék klór	10 µg/l
Szerves foszfort tartalmazó növényvédő szerek összesen	50 ng/l
Szerves klórtartalmú peszticidek + poliklórozott bifenilek	50 ng/l
Összes szerves klór	25 ng/l
Alumínium	1 µg/l
Arzén	1 µg/l
Króm	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Réz	1 µg/l
Vas	1 µg/l
Ólom	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Cink	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Higany	100 ng/l
Ezüst	100 ng/l

3. Függelék

A MEOGRT VIZSGÁLATI KÖRÜLMÉNYEI

1. Ajánlott fajok	Japán fogasponty (*Oryzias latipes*).
2. A vizsgálat típusa	Folyamatos vízcserét biztosító átfolyásos rendszer.
3. Vízhőmérséklet	A nominális vizsgálati hőmérséklet 25 °C. A vizsgálat teljes időtartama alatt az egyes tartályok átlaghőmérséklete 24–26 °C.
4. A megvilágítás minősége	Fluoreszcens izzók (széles spektrum és ~150 lumen/m^2) (~150 lux).
5. Megvilágítási időszak	16 óra fény, 8 óra sötét.
6. Betelepítési arány	F0: 2 felnőtt/ismétlés; F1: kezdetben legfeljebb 20 ikra (embrió)/ismétlés, a kikelésnél lecsökkentve 12 embrió/ismétlésre, majd a megtermékenyítés utáni 9–10. héten 2 felnőttre (XX-XY tenyészpárra) a szaporodási fázishoz.
7. A vizsgálati kamra minimális hasznos térfogata	1,8 l (a vizsgálati kamra mérete például: 18x9x15 cm).
8. A vizsgálati oldatok térfogatának cseréje	Legalább napi 5 térfogatcsere és legfeljebb napi 16 térfogatcsere (vagy 20 ml/perc áramlás).
9. A vizsgált élőlények kora a vizsgálat kezdetén	F0: A megtermékenyítéstől számítva legalább 12, legfeljebb 16 hét.
10. Élőlények ismétlésenkénti száma	F0: 2 hal (egy hímből és egy nőstényből álló pár); F1: ismétlésenként legfeljebb 20 (F0 és F1 tenyészpároktól származó) hal (ikra).
11. Kezelések száma	5 vizsgálati vegyi anyaggal végzett kezelés plusz a megfelelő kontroll(ok).
12. Kezelésenkénti ismétlések száma	A vizsgálati vegyi anyag esetében legalább 6 ismétlés kezelésenként, a kontroll – és ha alkalmazzák, az oldószeres kontroll – esetében legalább 12 ismétlés (az F1 generáció reprodukciós fázisában az ismétlések számát megduplázzák).
13. Élőlények száma vizsgálatonként	Az F0 generációban legalább 84 hal, az F1 generációban 504 hal. (Oldószeres kontroll végzése esetén 108 hal az F0 generációban és 648 hal az F1 generációban). A számlálás egysége a szabad embrió utáni életszakaszban lévő egyedek.
14. Etetési rend	A halak *ad libitum* etethetők *Artemia* sórákkal (24 órás naupliusszal), szükség esetén kereskedelmi forgalomban kapható pelyhesített haleledellel kiegészítve (a megbízható szaporodást lehetővé tévő, megfelelő növekedést és fejlődést biztosító etetési rend egy példáját az 5. függelék ismerteti).
15. Levegőztetés	Nincs, kivéve ha az oldott oxigén koncentrációja megközelíti a < 60 %-os levegőtelítettségi értéket.
16. Hígítóvíz	Tiszta felszíni víz, kútvíz, mesterséges víz vagy klórmentesített csapvíz.

17. Expozíciós időtartam	Alapvetően 19 hét (az F0 generációtól az F2 generáció kikeléséig).
18. Biológiai végpontok (elsődleges)	Kikelési arány (F1 és F2 generáció); túlélés (F1, kikeléstől a megtermékenyítés utáni 4. hétig (lárvakor vége/növendékkor eleje), a megtermékenyítés utáni 4. és 9. (vagy 10.) hét között (növendékkor elejétől az ivarérés előtti korig) és a megtermékenyítés utáni 9. és 15, hét között (ivarérés előtti kortól a felnőttek elpusztításáig)); növekedés (F1, hossz és tömeg a megtermékenyítés utáni 9. és 15. héten); másodlagos ivari jellegek (F1, farok alatti úszó papilláris nyúlványai a megtermékenyítés utáni 9. és 15. héten); vitellogenin (F1, *vtg* mRNS vagy VTG fehérje a megtermékenyítés utáni 15. héten); fenotípusos ivar (F1, ivarmirigy szövettani vizsgálatával a megtermékenyítés utáni 15. héten); szaporodás (F0 és F1, fekunditás és termékenység mérése 21 napig); az ívásig eltelt idő (F1); és kórszövettan (F1, ivarmirigy, máj és vese a megtermékenyítés utáni 15. héten).
19. A vizsgálat érvényességi kritériumai	Az oldott oxigén a levegőtelítettségi érték legalább 60 %-a; a vizsgálat teljes időtartama alatt az átlagos vízhőmérséklet 24–26 °C; a kontroll(ok)ban a nőstények legalább 65 %-a sikeresen szaporodik; a kontroll(ok)ban az átlagos napi fekunditás legalább 20 ikra; a kontrollokban a kikelési arány (átlagosan) eléri a 80 %-ot (mind az F1, mind az F2 generációban); a kontrollokban (F1) a kikeléstől a megtermékenyítés utáni 3. hétig a túlélés átlagosan legalább 80 % és a megtermékenyítés utáni 3. héttől a generáció egyedeinek elpusztításáig átlagosan legalább 90 %, a vizsgálati vegyi anyag oldatban lévő koncentrációit az átlagos mért értékek ±20 %-os tartományán belül sikerült tartani.

4. függelék

IRÁNYMUTATÁS A TIPIKUS KONTROLLÉRTÉKEKHEZ

Ezeket a kontrollértékeket korlátozott számú validálási tanulmány alapján határozták meg, ezért a további tapasztalatok fényében módosításra kerülhetnek.

Növekedés

A megtermékenyítés utáni 9. (vagy 10.) és 15. héten a mintavételhez használt minden halnak megmérik a testtömegét és a hosszát. E protokoll betartása esetén a megtermékenyítés utáni 9. héten a hímek várt nedves tömege 85–145 mg, míg a nőstényeké 95–150 mg. A megtermékenyítés utáni 15. héten a hímek várt tömege 250–330 mg, a nőstényeké 280–350 mg. Bár az egyes halak testtömege jelentősen eltérhet a megadott tartománytól, ha a kontrollcsoport átlagos testtömege nagy mértékben kívül esik ezeken a tartományokon, különösen ha alacsonyabb, az a táplálással, hőmérséklet-szabályozással vagy vízminőséggel kapcsolatos problémára, betegségre, vagy e tényezők bármely kombinációjára utal.

Kikelés

A kontrollcsoportokban a kikelési sikeresség általában 90 % körül alakul, ugyanakkor esetenként lecsökkenhet akár 80 %-ig is. A 75 %-nál alacsonyabb kikelési sikeresség azt jelezheti, hogy nem mozgatják megfelelő mértékben a fejlődő ikrákat, vagy nem kezelik őket kellő odafigyeléssel, például nem távolítják el időben az elpusztult ikrákat, ami gombás fertőzéshez vezet.

Túlélés

A kontrollcsoportokban a túlélési arány a kikeléstől a megtermékenyítés utáni 3. hétig és ezt követően általában 90 % vagy magasabb, de nem nyugtalanító az sem, ha a korai életszakaszokban a kontrollok túlélési aránya 80 %-ig csökken. A kontrollcsoportok 80 %-nál alacsonyabb túlélési aránya aggodalomra adna okot és arra utalhat, hogy az akváriumok elégtelen tisztítása miatt betegségből vagy az alacsony oldottoxigén-tartalom okozta fulladásból kifolyólag pusztulnak a lárvák. A halálozás további okai lehetnek a tartály tisztítása során a lárvákat ért sérülés és a tartály vízelvezető rendszerének tulajdonítható lárvapusztulás.

Vitellogenin gén

Bár a *vitellogenin* (*vtg*) gén – génkópiák/teljes mRNS ng-jában kifejezett – abszolút szintjei az alkalmazott eljárások vagy műszerek miatt jelentősen eltérhetnek az egyes laboratóriumok között, a *vtg* arányának a kontrollcsoport nőstényeiben 200-szor nagyobbnak kell lennie, mint a hímekben. Nem szokatlanok az 1 000–2 000-szeres értékek, ugyanakkor a 200-szorosnál alacsonyabb arányszámok gyanúsak és arra utalhatnak, hogy problémát okozott a minta fertőzöttsége, az alkalmazott eljárás és/vagy reagens.

Másodlagos ivari jellegek

A hímek esetében a másodlagos ivari jellegek normál tartománya, amelyet a farok alatti úszó papilláris nyúlványainak úszósugaraiban található összes szegmens száma alapján határoznak meg, a megtermékenyítés utáni 9–10. héten 40–80 szegmens. A megtermékenyítés utáni 15. héten a kontrollcsoport hímjeinél ez a tartomány 80–120 körül alakul, a nőstényeknél pedig 0. Ismeretlen okokból kifolyólag bizonyos hím egyedeknél ritkán előfordul, hogy a megtermékenyítés utáni 9. héten nincs papilláris nyúlványuk, de mivel a megtermékenyítés utáni 15. hétre minden kontroll hímen megjelennek papilláris nyúlványok, valószínűleg késleltetett fejlődésről van szó. Amennyiben a kontrollcsoport nőstényeinél megfigyelhetők papilláris nyúlványok, az arra utal, hogy a populációban vannak XX hímek.

XX hímek

Az XX hímek normál háttérbeli előfordulása a tenyészetekben 25 °C-on körülbelül 4 % vagy kevesebb, előfordulásuk a hőmérséklet emelkedésével párhuzamosan növekszik. Intézkedéseket kell tenni annak érdekében, hogy a populációban minél alacsonyabb legyen az XX hímek aránya. Miután az XX hímek előfordulása részben a genetikára vezethető vissza, ezért örökölhető, a tenyészállomány ellenőrzésével és annak biztosításával, hogy az XX hímek nem kerülnek felhasználásra a tenyészállomány szaporításához, hatékonyan csökkenthető az XX hímek populáción belüli előfordulása.

Ívási aktivitás

A fekunditás felmérését megelőzően a kontroll ismétlésekben naponta ellenőrizni kell az ívási aktivitást. Az ívási aktivitásról a kontrollcsoportban lévő tenyészpárok számának vizuális felmérésével lehet megbizonyosodni. A megtermékenyítés utáni 12–14. héten a kontrollcsoport legtöbb párjának már ívnia kell. Ha ebben az időszakban alacsony az ívó párok száma, az a halak egészségét, ivarérettségét vagy jólétét érintő potenciális problémákat jelez.

Fekunditás

Az egészséges, jól táplált, megtermékenyítés utáni 12–14. hétben járó fogaspontyok naponta ívnak, amelynek során napi 15–50 ikrát termelnek. Az ajánlott 24 kontrollként szolgáló tenyészpárból 16-nak (> 65 %) naponta és tenyészpáronként több mint 20 ikrát kell leraknia, de a napi ikramennyiség akár 40 körüli is lehet. Ennél kevesebb ikra arra utalhat, hogy a tenyészpárok nem ivarérettek, rosszul tápláltak vagy betegek.

Termékenység

A kontrollcsoport ívó párjainál a megtermékenyített ikrák aránya jellemzően körülbelül 90 %, de esetenként mérnek 95 % körüli vagy afeletti arányszámokat is. A kontrollcsoport ikráinak 80 %-nál alacsonyabb termékenységi arányai gyanúsak, és az egyedek betegségét vagy a tenyésztési körülmények ideálistól való elmaradását jelezhetik.

5. függelék

PÉLDA ETETÉSI RENDRE

A megbízható szaporodást elősegítő, megfelelő növekedést és fejlődést biztosító etetési rend egy példáját az 1. táblázat ismerteti. Az etetési rendtől való eltérések elfogadhatók, de ajánlatos teszteléssel ellenőrizni, hogy elfogadható növekedést és szaporodást eredményeznek-e. A javasolt etetési rend betartásához a vizsgálatot megelőzően meg kell határozni a sóráknak a folyékony sórák egy egységére eső száraz tömegét. Ehhez lemérnek egy meghatározott térfogatú folyékony sórákot, amelyet előzetesen lemért tálba helyeztek, és 60 °C-on 24 órán keresztül szárítottak. A folyékony sórák sótartalmának tömegét úgy lehet megállapítani, hogy a folyékony sórákhoz használt sóoldattal azonos és megegyező mennyiségű sóoldatot szintén kiszárítanak, lemérnek, majd tömegét levonják a kiszárított folyékony sórák tömegéből. Alternatív megoldásként a sórákot kiszárítás előtt leszűrhetik és desztillált vízzel átöblíthetik, így nem szükséges lemérni a „só vakoldat" tömegét. Az így kapott információval a sórák táblázatban feltüntetett száraz tömege alapján meghatározható a folyékony sórák halak etetéséhez használandó mennyisége. Ezenfelül javasolt a folyékony sórák alikvotjainak heti mérésével ellenőrizni az etetéshez használt sórák száraz tömegét.

1. táblázat

Az etetési rend példája

Időpont (kikelés utáni nap)	Sórák (mg száraz tömeg/hal/nap)
1. nap	0,5
2. nap	0,5
3. nap	0,6
4. nap	0,7
5. nap	0,8
6. nap	1,0
7. nap	1,3
8. nap	1,7
9. nap	2,2
10. nap	2,8
11. nap	3,5
12. nap	4,2
13. nap	4,5

Időpont (kikelés utáni nap)	Sórák (mg száraz tömeg/hal/nap)
14. nap	4,8
15. nap	5,2
16–21. nap	5,6
4. hét	7,7
5. hét	9,0
6. hét	11,0
7. hét	13,5
8. hét – elpusztítás	22,5

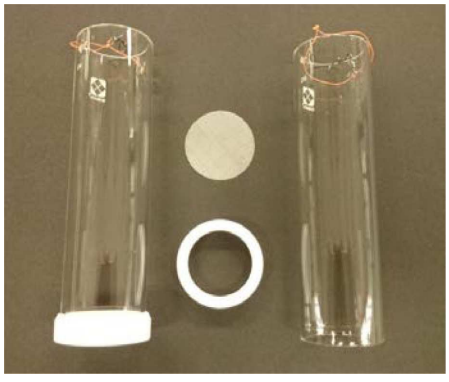
6. függelék

Ikrakeltető Inkubációs Kamra Példája

A példa

Ez az inkubátor egy bemetszett üveg centrifugacsőből áll, a csöveket egy rozsdamentes acél tartóhüvely köti össze egymással, és a centrifugacső felső csavaros kupakja tartja a helyükön. Egy, a kupakon áthaladó kis méretű üveg vagy rozsdamentes acél cső a centrifugacső kerek aljának közelében elhelyezkedve légbuborékok óvatos bejuttatásával lebegteti az ikrákat, csökkentve az ikrák közötti szaprofita gombás fertőzések terjedését, ugyanakkor megkönnyíti a vegyi anyag inkubátor és tárolótartály közötti cseréjét.

B példa



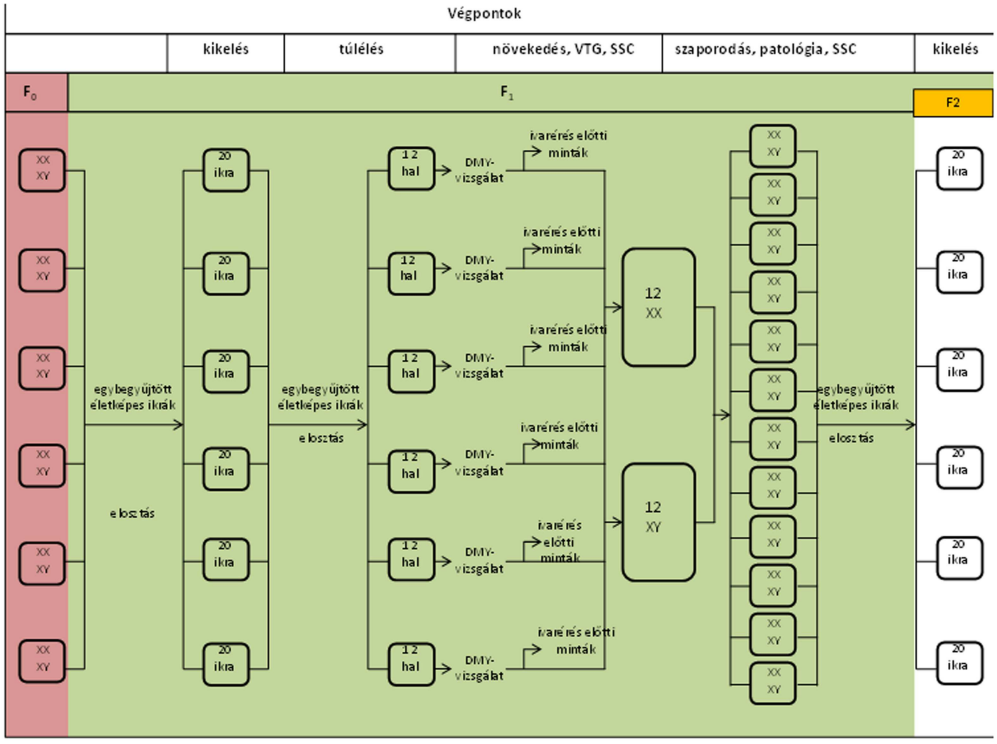
Ez az inkubátor egy (5 cm átmérőjű és 10 cm magas) üveg hengertestből és rozsdamentes dróthálóból (0,25 φ és 32 hálószem) áll, ez utóbbi egy PTFE gyűrűvel csatlakozik a hengertest aljához. Az inkubátorokat az emelőrúdnál fogva függesztik fel és rögzítik a tartályokhoz, és a fogaspontyikráknak megfelelő ciklusban (körülbelül 4 másodpercenként) függőlegesen rázatják őket (mintegy 5 cm-es kilengéssel).

7. függelék

SEMATIKUS ÁBRA A MEOGRT VIZSGÁLATI MÓDSZERBEN ALKALMAZOTT ISMÉTLÉSEK EGYEDEINEK EGYBEGYŰJTÉSÉHEZ ÉS SZÉTOSZTÁSÁHOZ

1. ábra

Az ismétlések egyedeinek egybegyűjtése és szétosztása a MEOGRT során. A számok egy kezelésre vagy egy ½ kontrollvizsgálatra vonatkoznak. A halak egybegyűjtése miatt az egyes ismétlések a vizsgálat teljes ideje alatt nem ugyanazokat az egyedeket tartalmazzák. Az ikra kifejezés az életképes, megtermékenyített ikrákra (vagyis az embriókra) utal.



Kezelések és ismétlések

A vizsgálati módszer technikai tisztaságú anyagok használatával végzett, öt vizsgálati vegyi anyaggal való kezelést és egy negatív kontrollt javasol. A MEOGRT során a kezelésenkénti ismétlések száma változó, a kontrollvizsgálatban pedig kétszer annyi ismétlést használnak, mint egy vizsgálati vegyi anyaggal történő kezelésben. Az F0 generáció esetében a vizsgálati vegyi anyaggal zajló kezelésnél hat ismétlést, a negatív kontrollvizsgálatban pedig 12 ismétlést használnak. Oldószerek használata nem ajánlott, ha mégis sor kerül használatukra, a MEOGRT jelentésébe bele kell foglalni az oldószer alkalmazásának és választásának indokolását. Oldószer használata esetén ráadásul két típusú kontrollvizsgálatra van szükség: a) oldószeres kontrollra és b) negatív kontrollra. E két kontrollcsoport mindegyikének a MEOGRT vizsgálat minden szakaszában tartalmaznia kell az ismétlések teljes számát. Az ismétlések fentiekben ismertetett száma változatlan marad a kísérleti élőlények F1 generációjának teljes fejlődése alatt (és az F2 generáció fejlődése során a kikelésig). Ugyanakkor a felnőtt stádiumban, amikor az F1 generáció tenyészpárjait kialakítják, optimális esetben kezelésenként megduplázzák a tenyészpárokkal zajló ismétlések számát; ezért a vizsgálati vegyi anyaggal történő egyes kezelések során legfeljebb 12 párt (vagyis ismétlést), míg a kontrollcsoportban 24 párt vizsgálnak (és szükség szerint további 24 párt az oldószeres kontrollban). Az F1 generáció párjaitól származó embriók kikelését ugyanannyi ismétlésben mérik, mint az F0 generáció párjaitól származó embriók esetében, vagyis vizsgálati vegyi anyaggal végzett kezelést hat ismétlésben végeznek, és 12 ismétlést vizsgálnak a kontrollcsoport(ok)ban.

8. függelék

A FAROK ALATTI ÚSZÓ PAPILLÁRIS NYÚLVÁNYAINAK MEGSZÁMLÁLÁSA

Főbb anyagok és reagensek

— Preparálómikroszkóp (opcionálisan fényképezőgéppel felszerelve)

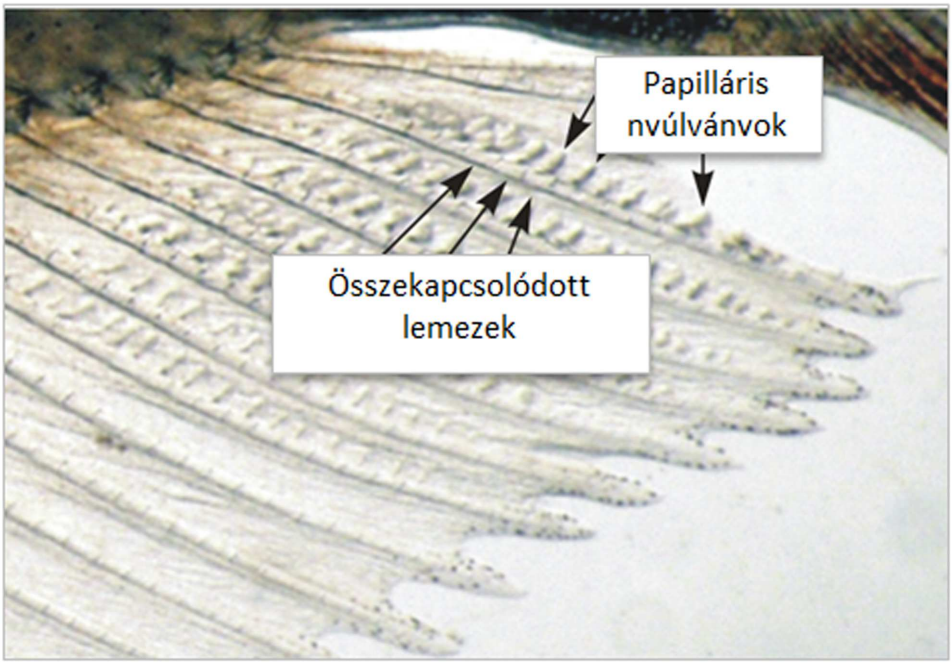
— Fixálószer (pl. Davidson-féle, a Bouin-féle használata nem ajánlott), ha nem felvétel alapján végzik a számlálást

Eljárások

A boncolást követően a farok alatti úszóról felvételt kell készíteni, ez lehetővé teszi a farok alatti úszó papilláris nyúlványainak kényelmes megszámlálását. Bár a felvételkészítés az ajánlott módszer, a farok alatti úszó körülbelül 1 percig fixálható Davidson-féle vagy más megfelelő fixálószerben. A fixálás során a farok alatti úszót síkban kell tartani, mert ez megkönnyíti a papilláris nyúlványok megszámlálását. A hal teste a farok alatti úszóval együtt vizsgálatukig tárolható Davidson-féle vagy más megfelelő fixálószerben. Ezt követőn megszámlálható az összekapcsolódott lemez hátsó szélénél kiálló papilláris nyúlványokat tartalmazó összekapcsolt lemezek száma (lásd az **1. ábrát**).

1. ábra

Farok alatti úszó papilláris nyúlványai



9. függelék

A MEOGRT RÉSZLETES ÜTEMEZÉSE

1–3. vizsgálati hét (F0)

A kiválasztási kritériumoknak (lásd a 16–20. pontot) megfelelő F0 generációs ívó halakat három hétig kezelik, amelynek során a fejlődésben lévő ivarsejteket és ivari szöveteket kiteszik a vizsgálati vegyi anyagnak. Mindegyik tartály (ismétlés) egyetlen tenyészpárt (XX nőstény-XY hím tenyészpárt) tartalmaz. A lerakott ikrákat az 1. vizsgálati naptól kezdve 21 egymást követő napon át begyűjtik, megszámlálják és meghatározzák, hogy megtermékenyültek-e.

4. vizsgálati hét (F0 és F1)

Törekedni kell arra, hogy a megtermékenyített és életképes ikrákat (embriókat) egy napon belül gyűjtsék össze; elégtelen embriószám esetén azonban két napon keresztül is gyűjthetik az embriókat. Amennyiben az embriókat két napon át gyűjtik, az egyes kezeléseken belül az első napon begyűjtött embriókat egybegyűjtik a második napon begyűjtött embriókkal. Ezt követően az egyes kezelések során egybegyűjtött összes embriót huszasával véletlenszerűen elosztják az egyes inkubátorokba (ismétlésekbe). A megtermékenyített ikrák (embriók) mortalitását naponta ellenőrizni és rögzíteni kell. Az elpusztult ikrákat eltávolítják az inkubátorokból (a megtermékenyített ikrák elpusztulását jelzi – különösen a korai szakaszokban – az áttetszőség jelentős csökkenése és színbeli elváltozás, amit a fehérjék koagulációja és/vagy kicsapódása okoz, ami fehér opálos színt eredményez; OECD 2010).

Megjegyzés: ha valamely kezelés esetében szükség van az ikrák második napon történő begyűjtésére, minden kezelés során (a kontrollvizsgálatokban is) követni kell ezt az eljárást. Amennyiben valamely kezelésben a második begyűjtési napot követően sincs elegendő számú embrió ahhoz, hogy az inkubátorokba 20 embriót lehessen telepíteni, akkor az adott kezelésen belül a betelepített embriók számát inkubátoronként 15-re kell csökkenteni. Ha nem áll rendelkezésre kellő számú embrió ahhoz, hogy az egyes inkubátorokba 15 embriót lehessen telepíteni, akkor csökkenteni kell az inkubátorok számát, amíg inkubátoronként 15 embriót el lehet helyezni. Emellett további tenyészpárok adhatók hozzá az F0 generáció kezelési és kontrollcsoportjaihoz, hogy több ikrát termeljenek az ismétlésenként javasolt 20 ikra eléréséhez.

A 24. vizsgálati napon az F0 generáció tenyészpárjait kíméletesen leölik, az egyedek tömegét és hosszát feljegyzik. Az F1 generáció újbóli létrehozása érdekében szükség esetén az F0 generáció tenyészpárjai további 1–2 napig fenntarthatók.

5-6. vizsgálati hét (F1)

A kikelés várható kezdete előtt egy-két nappal a kikelés elősegítése érdekében le kell állítani vagy csökkenteni kell az inkubált ikrák mozgatását. Ahogy az embriók kikelnek az egyes napokon, az ivadékokat kezelésenként egybegyűjtik, és szisztematikusan szétosztják az adott kezelésen belüli, lárvák elhelyezésére szolgáló tartályok (ismétlések) között, legfeljebb 12 ivadékot telepítve a tartályokba. Ehhez véletlenszerűen kiválasztják az ivadékokat, és válogatás nélkül sorban elhelyezik őket az ismétlésekben, meghatározott sorrendben haladva az adott kezelés ismétlései között, amíg a kezelés összes ismétlésébe be nem telepítettek 12 ivadékot. Amennyiben nincs elég ivadék az összes ismétlés feltöltéséhez, akkor arra kell törekedni, hogy a lehető legtöbb ismétlés tartalmazzon 12 ivadékot az F1 fázis megkezdéséhez.

Azokat az ikrákat, amelyek nem keltek ki a kontroll átlagos kikelési napjának kétszereséig, életképtelennek tekintik és eltávolítják. Az ivadékok számát feljegyzik, és minden ismétlés esetében meghatározzák a kikelés sikerességét (a kikelési arányt).

7-11. vizsgálati hét (F1)

A lárvák túlélését minden ismétlés tekintetében naponta ellenőrzik és rögzítik. A 43. vizsgálati napon feljegyzik az egyes ismétlések túlélő halainak számát, valamint a tartályba helyezett ivadékok induló létszámát (nominálisan tizenkettő). Ez teszi lehetővé a túlélési arány meghatározását a kikeléstől az ivarérés előtti állapotig.

12. vizsgálati hét (F1)

A 78–85. vizsgálati napon az egyedek genotípusos ivarának meghatározásához kis méretű mintát vesznek minden hal farokúszójából (úszók bevágása). Az így kapott információk alapján alakítják ki a tenyészpárokat.

Az egyedek genotípusos ivarának megállapítását követő három napon belül véletlenszerűen létrehoznak 12 tenyészpárt az egyes kezelésekhez és 24 tenyészpárt az egyes kontrollvizsgálatokhoz. Minden ismétlésből véletlenszerűen kiválasztanak két XX és két XY halat, ivar szerint egybegyűjtik őket, majd véletlenszerűen tenyészpárokat (XX-XY párokat) alakítanak belőlük. A vegyi anyaggal végzett kezeléshez legalább 12, a kontrollvizsgálathoz legalább 24 ismétlést hoznak létre, ismétlésenként egy-egy tenyészpárral. Amennyiben valamely ismétlésben nem áll rendelkezésre két XX vagy két XY példány a halak egybegyűjtéséhez, akkor a kezeléshez tartozó többi ismétlésből kell biztosítani a megfelelő genotípusos ivarú halakat.

A fennmaradó halakat (ismétlésenként legfeljebb 8-at) humánus módon leölik, és mintákat vesznek tőlük a különböző ivarérés előtti végpontok értékeléséhez. Az ivarérés előtti halakból származó minták *dmy* génre vonatkozó adatait (XX vagy XY) megőrzik, mert ezáltal biztosítható, hogy a végpontokra vonatkozó adatokat az egyes halak genetikus ivarával összefüggésben értelmezzék.

13-14. vizsgálati hét (F1)

A kezelés az ivarérés előtti tenyészpárok felnőtté válása alatt is folytatódik. A vizsgálati 98. napján (vagyis az ikrák begyűjtésének kezdete előtti napon) az ikrákat eltávolítják az akváriumokból és a nőstényekről.

15-17. vizsgálati hét (F1)

A lerakott ikrákat 21 egymást követő napon át naponta begyűjtik minden ismétlésből, és értékelik fekunditás és termékenység szempontjából.

18. vizsgálati hét (a 4. vizsgálati hét ismétlése) (F1 és F2)

A 120. vizsgálati nap reggelén minden tartályból (ismétlésből) begyűjtik az ikrákat. A begyűjtött ikrákat értékelik, majd az összes tenyészpár megtermékenyített ikráit kezelésenként egybegyűjtik (az ikrafonalat eltávolítják), és szisztematikusan szétosztják az ikrakeltető inkubációs kamrákba, legfeljebb 20 megtermékenyített ikrát telepítve egy inkubátorba. A inkubátorok elhelyezhetők különálló, az egyes kezelésekhez felállított inkubátor tartályokba, vagy azokba a tartályba, amely a kikelést követően otthont adnak majd a kikelt lárváknak. Törekedni kell arra, hogy az embriókat egy napon belül gyűjtsék össze; elégtelen embriószám esetén azonban két napon keresztül is gyűjthetik őket. Amennyiben az embriókat két napon keresztül gyűjtik be, az egyes kezeléseken belül az első napon begyűjtött embriókat egybegyűjtik a második napon begyűjtött embriókkal. Ezt követően az egyes kezelések során egybegyűjtött összes embriót huszasával véletlenszerűen elosztják az egyes inkubátorokba (ismétlésekbe). Megjegyzés: ha valamely kezelés esetében szükség van az ikrák második napon történő begyűjtésére, minden kezelés során (a kontrollvizsgálatokban is) követni kell ezt az eljárást. Amennyiben valamely kezelés esetén a második begyűjtési napot követően sincs elegendő számú embrió ahhoz, hogy az inkubátorokba 20 embriót lehessen telepíteni, az adott kezelésen belül a betelepített embriók számát inkubátoronként 15-re kell csökkenteni. Ha nem áll rendelkezésre kellő számú embrió ahhoz, hogy az egyes inkubátorokba 15 embriót lehessen telepíteni, akkor csökkenteni kell az inkubátorok számát, amíg inkubátoronként 15 embriót el lehet helyezni.

A 121. vizsgálati napon (vagy a 122. vizsgálati napon, ha biztosítani kívánják az F2 generáció megfelelő indulását) az F1 generáció tenyészpárjait kíméletesen leölik és a felnőtt végpontok szerint elemzik. Az F2 generáció újbóli létrehozása érdekében szükség esetén az F1 generáció tenyészpárjai további 1–2 napig fenntarthatók.

19-20. vizsgálati hét (F2)

A kikelés várható kezdete előtt egy-két nappal a kikelés elősegítése érdekében le kell állítani vagy csökkenteni kell az inkubált ikrák mozgatását. Amennyiben a vizsgálatot az F2 generáció kikelését követően lezárják, az ivadékokat minden nap megszámlálják és eltávolítják. (Azokat az embriókat, amelyek nem keltek ki a meghosszabbított inkubációs idő alatt, vagyis a kontroll átlagos kikelési napjának kétszereséig, életképtelennek tekintik).

10. függelék

STATISZTIKAI ELEMZÉS

A MEOGRT során létrehozott biológiai adatok típusai nem csak e vizsgálatra jellemzőek, és a patológiai adatok kivételével számos megfelelő statisztikai módszertant dolgoztak ki a hasonló adatok helyes elemzésére attól függően, hogy milyen jellegű adatok állnak rendelkezésre, ideértve a normál eloszlást és a szóródáshomogenitást, illetve azt, hogy a tanulmány kialakításából fakadóan hipotézisvizsgálat vagy regressziós analízis, parametrikus vagy nem paraméteres vizsgálatok alkalmazhatók. Általánosan érvényes, hogy a javasolt statisztikai elemzések az OECD ökotoxicitási adatokra vonatkozó ajánlásait követik (OECD 2006), a 2. ábra pedig bemutatja a MEOGRT adatelemzésével kapcsolatos döntési folyamatábrát.

Az adatbázis feltételezhetően többnyire monoton válaszokkal jellemezhető. Emellett mérlegelni kell, hogy egyoldalú vagy kétoldalú statisztikai vizsgálatot érdemes végezni. Amennyiben nem lehet biológiai érvekkel alátámasztani az egyoldalú vizsgálat alkalmatlanságát, akkor javasolt egyoldalú vizsgálatot végezni. Az alábbi rész ajánlást tartalmaz bizonyos statisztikai vizsgálatok használatára, ha azonban léteznek megfelelőbb és/vagy hatékonyabb statisztikai módszerek a MEOGRT során létrehozott egyedi adatok elemzésére, akkor azokat kell használni, hogy ki lehessen aknázni az általuk biztosított előnyöket.

A MEOGRT során kapott adatokat genotípusos ivaronként kell elemezni. A fordított ivarú halak (XX hímek vagy XY nőstények) adatainak elemzésére két stratégia alapján kerülhet sor: 1) a fordított ivarú halakról a vizsgálat során szerzett valamennyi adat törlése, az egyes ismétlésekben előforduló ivarváltás gyakoriságára vonatkozó adatokat kivéve; 2) a fordított ivarú halakról gyűjtött adatok megtartása és genotípus szerinti elemzése.

Kórszövettani adatok

A jelentésben súlyosság szerint pontszámozott kórszövettani adatok értékelését egy újonnan kifejlesztett statisztikai eljárás, a Rao–Scott Cochran–Armitage by Slices (RSCABS) trendpróba alapján végzik (Green és munkatársai, 2014). A *Rao-Scott*-féle módosítás megtartja a vegyi anyaggal kezelt ismétlések adatait; a *by Slices* eljárás pedig figyelembe veszi azt a biológiai elvárást, hogy a kezelés során alkalmazott koncentrációk növelése magával vonja a súlyossági pontszámok emelkedését. Az RSCABS eredménye minden diagnózis esetében meghatározza, hogy a kontrollokhoz képest melyik kezelésnél gyakoribbak a patológiás elváltozások, és azok milyen súlyossági szintet képviselnek.

Fekunditási adatok

A fekunditási adatok elemzése lefelé lépegető Jonckheere–Terpstra-féle próbával vagy Williams-féle próbával történik, amelynek során meghatározzák a kezelés által kiváltott hatásokat, ha az adatok összhangban vannak egy monoton jellegű koncentráció-válasszal. A lefelé lépegető próbák során minden összevetést a 0,05-ös szignifikanciaszinten végeznek el, és az eredményt nem igazítják ki az összevetések száma alapján. A várakozások szerint az adatok monoton koncentráció-válasszal jellemezhetők, ez ellenőrizhető az adatok szemrevételezésével, illetve úgy is, hogy az adatok rangsorba rendezését követően létrehozzák a kezelés átlagértékeinek lineáris vagy kvadratikus kontrasztjait. Ha a kvadratikus kontraszt szignifikáns, a lineáris kontraszt pedig nem az, a trendpróba lezárható. Ellenkező esetben, ha az adatok normál eloszlásúak homogén szórással, a kezelés által kiváltott hatásokat a Dunnett-féle próbával határozzák meg. Amennyiben ezek a feltételek nem teljesülnek, a Dunn-féle próba Bonferronni–Holm módosítását alkalmazzák. Az említett próbákat általános F-próbától vagy Kruskal–Wallis-féle próbától függetlenül kell elvégezni. Minderről további részletek az OECD 2006 dokumentumban találhatók.

Más módszerek is használhatók, például általánosított lineáris modellek Poisson-hibaeloszlással az ikrák számlálásához (az adatok transzformálása nélkül), ha statisztikailag indokolható (Cameron és Trividi, 2013). Alternatív megközelítés alkalmazása esetén statisztikai tanácsadás igénybevétele ajánlott.

Napi ikraszámlálás egy generáción belül

Az ANOVA modell a következő képleten alapul: Y=Idő*Idő+Kezelés + *Kezelés + Idő*Kezelés + *Idő*Kezelés, az Ismétlés(Generáció*Kezelés) és az Idő*Ismétlés(Kezelés) véletlen hatással, amely lehetővé teszi mindkét típusú egyenlőtlen varianciakomponens generációkon keresztüli elemzését. A képletben az Idő az ikraszámlálás gyakoriságára utal (pl. napi vagy heti). Ez egy ismételt méréseken alapuló elemzés, az egy adott ismétlésre vonatkozó megfigyelések között korrelációk jelentik azt, hogy az adatok ismételt mérésből származnak.

A kezelés fő hatásait a Dunnett-féle (vagy Dunnett-Hsu-féle) próbával vizsgálják, amely az összevetések száma szerint kiigazítja az eredményt. A generáció vagy az idő okozta fő hatást ki kell igazítani, mivel e két tényező esetében nem áll rendelkezésre kontrollszint, és az egyes szignifikanciaszinteken minden pár összevetése érdekes lehet. E két fő hatás tekintetében ha az F-próbával vizsgált fő hatás szignifikáns 0,05-ös szinten, akkor az adott tényező különböző szignifikanciaszinteken történő páronkénti összevetése a 0,05-ös szinten további kiigazítás nélkül vizsgálható.

Mivel a modell két és három tényező kölcsönhatását vizsgálja, előfordulhat, hogy például az idő fő hatása nem lesz szignifikáns, pedig az idő jelentősen befolyásolja az eredményeket. Ha tehát egy két vagy három tényezős kölcsönhatás, amelynek egyik tényezője az idő, 0,05-ös szinten szignifikáns, akkor elfogadható a különböző időszintek 0,05-ös szignifikanciaszinten történő korrekció nélküli összevetése.

Azután F-próbákkal mérhető a kezelés adott időn belüli szignifikanciája, ezek az úgynevezett F-próbarészek az ANOVA-táblázatban. Ha például az F1 generáció 12. idősávon belüli kezelését magában foglaló F-próbarész szignifikáns a 0,05-ös szinten, akkor az F1 generáció 12. idősávon belüli kezelésének páronkénti összevetése a 0,05-ös szinten további kiigazítás nélkül vizsgálható. Hasonló megállapítások vonatkoznak azokra a vizsgálatokra, amelyek az időt mérik az F1 generációval és a kezeléssel való összefüggésben, illetve a generációt az idővel és a kezeléssel való összefüggésben.

Végezetül pedig a fenti kategóriák egyikébe sem sorolható összehasonlítások esetén az összevetéseket a p-értékek Bonferroni–Holm-féle korrekciója szerint kell kiigazítani. Az ilyen jellegű modellek elemzéséről további részletekkel Hocking (1985), valamint Hochberg és Tamhane (1987) szolgál.

Alternatív megoldásként a nyers adatokat feljegyzik és a vizsgálati jegyzőkönyvben ismétlésenkénti napi fekunditásként (ikraszámként) tüntetik fel. Ezután kiszámítják az ismétlések nyers adatainak átlagát, majd négyzetgyök transzformációt alkalmaznak. Ezt követően az ismétlések transzformált átlagértékén egyoldali varianciaanalízist (ANOVA) végeznek, majd meghatározzák a Dunnett-féle kontrasztokat. Szintén hasznos lehet az egyes kezelések és/vagy ismétlések fekunditási adatainak vizuális ellenőrzése egy, az adatokat az idő függvényében ábrázoló szórásdiagrammal. Ez lehetővé teszi az idővel jelentkező potenciális hatások informális értékelését.

Minden egyéb biológiai adat

A statisztikai elemzések abból az alapfeltevésből indulnak ki, hogy megfelelő dózisválasztás esetén az adatok monoton jellegűek lesznek. Az adatok tehát feltételezhetően monoton jellegűek, monotonitásuk formális értékelését lineáris és kvadratikus kontrasztokkal végzik. Amennyiben az adatok valóban monoton jellegűek, (az OECD 2006 ajánlása szerint) az ismétlések mediánértékét elemző Jonckheere–Terpstra-féle trendpróba elvégzése javasolt. Ha a kvadratikus kontraszt szignifikáns, a lineáris kontraszt pedig nem az, az adatok nem monoton jellegűek.

Ha az adatok nem monoton jellegűek, különösen ha azért, mert a legnagyobb vagy második legnagyobb dózissal végzett kezelés korlátozott választ vált ki, akkor fontolóra kell venni az adatbázis csökkentését, hogy az elemzést e kezelések nélkül lehessen elvégezni. Döntést szakmai megítélésre kell alapozni, továbbá figyelembe kell venni az összes rendelkezésre álló adatot, főképp azokat az adatokat, amelyek e dózisszintek nyilvánvaló toxicitását jelzik.

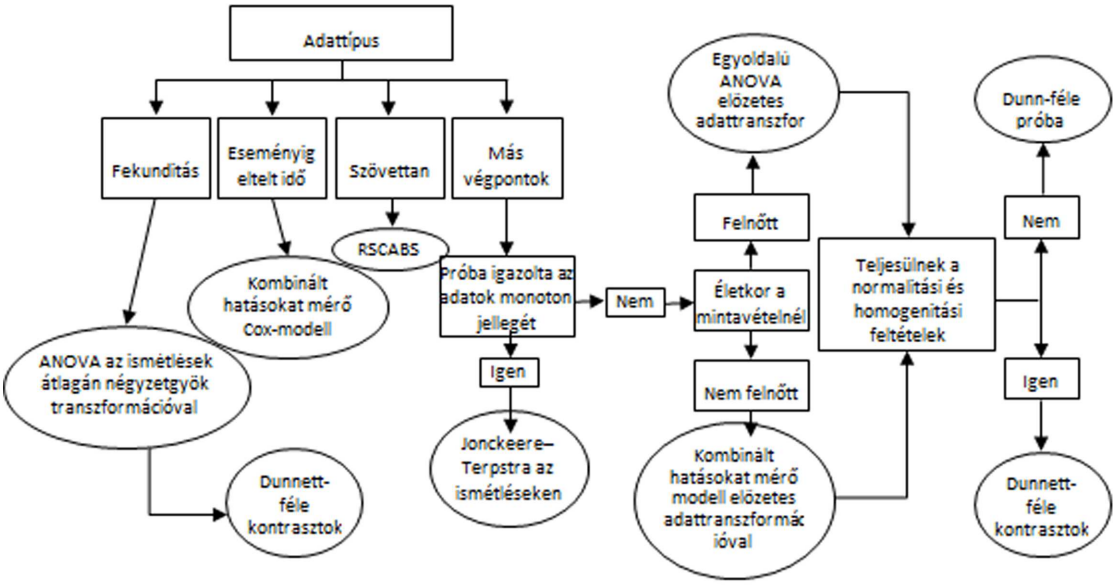
A testtömegre és a testhosszra vonatkozó adatokat nem ajánlatos transzformálni, bár esetenként szükséges lehet. A vitellogeninre vonatkozó adatokon azonban ajánlatos logaritmikus transzformációt, a másodlagos nem jellegre (farok alatti úszó papilláris nyúlványaira) vonatkozó adatokon négyzetgyök transzformációt, a kikelési arányra, a túlélési arányra, az ivararányra és a termékeny ikrák arányára vonatkozó adatokon pedig négyzetgyök arkusz-szinusz transzformációt végezni. A kikelésig eltelt időt és az első ívásig eltelt időt „eseményig eltelt időt" jelző adatként kell kezelni, és felső határt átlépő adatként ki kell zárni az azokra az embriókra vonatkozó adatokat, amelyek nem keltek ki a megadott időszak alatt és azokra az ismétlésekre vonatkozó adatokat, amelyekben nem történt ívás. A kikelésig eltelt időt az egyes ismétlések átlagos kikelési napja alapján kell meghatározni. Ezeket a végpontokat a kombinált hatásokat mérő Cox-féle arányos kockázati modellel kell elemezni.

A felnőtt mintákból származó biológiai adatokat ismétlésenként egy mérésből nyerik, amelynek során az egyes akváriumokban (ismétlésekben) egy XX hal és egy XY hal található. Ezért az ismétlések átlagát egyoldalú varianciaanalízissel (ANOVA) érdemes vizsgálni. Amennyiben az ANOVA feltételezései (az ANOVA maradékain a Shapiro–Wilk-féle próbával mért normál eloszlás és a Levene-féle próbával mért szóródáshomogenitás) beigazolódnak, a kontrollétól eltérő eredményt adó kezeléseket Dunnett-féle kontrasztokkal kell meghatározni. Ha azonban az ANOVA feltételezései nem igazolódnak be, a Dunn-féle próbával kell meghatározni, hogy mely kezelések eredményei tértek el a kontrollétól. Hasonló eljárást érdemes alkalmazni az arányszámban megadott adatoknál (termékenység, kikelés és túlélés).

Az ivarérés előtti álló halak mintáiból származó biológiai adatokat ismétlésenként 1–8 mérés során szerzik, így változó egyedszám képezheti az egyes genotípusos ivarok ismétlésenkénti átlagának alapját. Ezért érdemes kombinált hatásokat mérő ANOVA-modellt használni, majd Dunnett-féle próbával meghatározni a kontrasztokat, amennyiben beigazolódtak a (kombinált hatásokat mérő ANOVA maradékain mért) normál eloszlásra és a szóródáshomogenitásra vonatkozó feltételezések. Ha nem igazolódtak be a feltételezések, a Dunn-féle próbával kell meghatározni, hogy mely kezelések eredményei tértek el a kontrollétól.

2. ábra

A MEOGRT adatelemzéséhez ajánlott statisztikai eljárások folyamatábrája.



SZAKIRODALOM

(1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

(2) Cameron AC and Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.

(3) Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.

(4) Hochberg Y and Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

C.53 KÉTÉLTŰ LÁRVÁK NÖVEKEDÉSI ÉS FEJLŐDÉSI VIZSGÁLATA (LAGDA)

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 241. vizsgálati iránymutatásában (2015) leírt módszerrel. A kétéltű fajok toxikus vegyi anyagokkal szembeni kitettségéből fakadó káros következmények kimutatására és jellemzésére alkalmas vizsgálat kifejlesztése és validálása iránti igény azokból az aggodalmakból ered, hogy egyes vegyi anyagok a környezetben előforduló mennyiségben káros hatással lehetnek az emberekre és az élővilágra egyaránt. A Kétéltű lárvák növekedési és fejlődési vizsgálata (LAGDA) című OECD-iránymutatás által leírt, kétéltű fajokon végezhető toxicitási vizsgálat a megtermékenyítéstől a korai növedékkorig tartó időszak alatti növekedéssel és fejlődéssel foglalkozik. A jellemzően 16 héten át tartó vizsgálat a korai fejlődést, az átalakulást, a túlélést, a növekedést és részlegesen a reproduktív rendszer érését értékeli. Emellett lehetővé teszi egy sor másik végpont mérését is, amelyek segítségével elvégezhető az endokrin rendszert feltételezhetően károsító vegyi anyagok, valamint a fejlődési és reprodukciós toxicitást okozó egyéb típusú anyagok diagnosztikus értékelése. Az ebben a vizsgálati módszerben ismertetett eljárást az Egyesült Államok Környezetvédelmi Ügynöksége (U.S. EPA) által és Japán támogató közreműködésével az afrikai karmosbékán (*Xenopus laevis*) végzett validálási munka alapján dolgozták ki (1). Bár valószínűleg más kétéltű fajokra is kidolgozható olyan növekedési és fejlődési vizsgálati protokoll, amelynek egyik fontos eleme a genetikai ivar megállapításának képessége, az e vizsgálati módszerben részletezett egyedi eljárások és megfigyelt végpontok kizárólag a *Xenopus laevisre* alkalmazhatók.

2. A LAGDA egy magasabb szintű kétéltű vizsgálatként alkalmazható a káros hatásokra vonatkozó átfogóbb koncentráció-válasz adatok gyűjtésére, amelyek alkalmasak arra, hogy ökológiai kockázatfelmérés keretében azonosítsák és jellemezzék a veszélyeket. A vizsgálat az OECD endokrin rendszert károsító anyagok vizsgálatára és értékelésére vonatkozó fogalmi keretének 4. szintjén helyezkedik el, ahol az in vivo vizsgálatok az endokrin rendszer releváns végpontjaira gyakorolt káros hatásokról is szolgáltatnak adatokat (2). Az általános kísérleti terv alapján az *X. laevis* embriókat a Nieuwkoop és Faber (NF) szerinti 8–10. stádiumban (3) a vizsgálati vegyi anyag legalább négy különböző koncentrációjával kezelik (az egyes koncentrációkat általában legalább fél logaritmikus osztásköz választja el egymástól) és kontrollvizsgálat(ok)at is végeznek egészen a kontroll NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges átlagos időtartamát követő 10 hétig, egy közbenső részmintát vesznek az NF szerinti 62. stádiumban (a megtermékenyítés utáni 45. napján nem később, többnyire a megtermékenyítés után 45. nap körül). Minden egyes vizsgálati koncentráció esetében négy ismétlést javasolnak, kontrollként szolgáló nyolc ismétléssel kiegészítve. A kezelés során (a közbenső részmintavételnél és a vizsgálat lezárásakor végzett végső mintavételnél) értékelt végpontok közé tartoznak az általános toxicitást jelző végpontok: a mortalitás, a rendellenes viselkedés, a növekedést meghatározó tényezők (testhossz és testtömeg), valamint azok a végpontok, amelyek révén jellemezhetők az ösztrogén, az androgén vagy a pajzsmirigy által közvetített fiziológiai folyamatokat célzó konkrét endokrin toxicitási hatásmechanizmusok. A módszer elsődleges célja a populációnál esetlegesen fellépő releváns hatások (vagyis a túlélésre, a fejlődésre, a növekedésre és a reproduktív fejlődésre gyakorolt káros hatások) meghatározása, amelyek alapján kiszámítható a megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC) vagy egy hatásos koncentráció, amely a mért végpontban × % változást okoz (ECx). Ugyanakkor megjegyzendő, hogy az ECx megállapításán alapuló megközelítések ritkán alkalmazhatók az ilyen nagy léptékű vizsgálatokra, ahol a vizsgált koncentrációk számának a kívánt ECx meghatározásához szükséges növelése kivitelezhetetlen lehet. Az is megjegyzendő, hogy ez a módszer magával a reprodukciós fázissal nem foglalkozik. Az e vizsgálati módszerben használt fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatók.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

3. Miután e meglehetősen összetett vizsgálat validálását korlátozott számú vegyi anyagon és korlátozott számú laboratórium bevonásával végezték el, és ez idáig a laboratóriumok közötti reprodukálhatóságot sem dokumentálták kísérleti adatokkal, várható, hogy amikor elegendő számú vizsgálat áll rendelkezésre ezen új vizsgálati terv hatásának megállapítására, az OECD 241. vizsgálati iránymutatását a szerzett tapasztalatok fényében felül fogják vizsgálni, és szükség szerint átdolgozzák. A LAGDA egy fontos vizsgálat, amely a vegyi anyagok által az érzékeny lárvastádiumban kiváltott hatások értékelésével felméri a kétéltű populáció hanyatlásához potenciálisan hozzájáruló tényezőket, a lárvastádiumban ugyanis a túlélésre és a fejlődésre, azon belül a szaporítószervek rendes fejlődésére gyakorolt hatások hátrányosan érinthetik a populációkat.

4. A vizsgálat az endokrin és nem endokrin mechanizmusok által előidézett apikus hatás(ok) észlelésére szolgál, és magában foglal olyan diagnosztikus végpontokat, amelyeket részben befolyásolnak az endokrin rendszerre ható mechanizmusok. A LAGDA kidolgozása előtt nem állt rendelkezésre olyan validált vizsgálat, ami ilyen szerepet töltött volna be a kétéltűek vizsgálatában.

5. A vizsgálat megkezdése előtt információkat kell szerezni a vizsgálati vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságairól, különösen annak érdekében, hogy stabil oldatokat lehessen készíteni a vegyi anyagból. Emellett szükség van egy, a vizsgálati vegyi anyag koncentrációinak ellenőrzésére alkalmas, megfelelő érzékenységű elemzési módszerre. A mintegy 16 hétig tartó vizsgálathoz összesen 480 állatot, vagyis *X. laevis* embriót (illetve oldószeres kontroll használata esetén 640 embriót) kell alkalmazni ahhoz, hogy kellő statisztikai erőt képviseljenek a szaporodáshoz kapcsolódó végpontok, úgymint a növekedés, a fejlődés és a reproduktív érés értékeléséhez.

6. A vizsgálati módszernek adott keverék szabályozási célú vizsgálatára történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az elfogadható eredményeket biztosít-e a szándékolt szabályozási célra. Megjegyzendő továbbá, hogy ez a vizsgálat nem értékeli közvetlenül a fekunditást, ezért az OECD endokrin rendszert károsító anyagok vizsgálatára és értékelésére vonatkozó fogalmi keretének 4. szintjénél magasabb szinten történő használatra feltehetően nem alkalmas.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER TUDOMÁNYOS ALAPJA

7. A kétéltűek biológiájával kapcsolatos jelenlegi ismereteink jó része az *X. laevis* laboratóriumi modellfaj használatából származnak. Ez a faj rutinszerűen tenyészthető laboratóriumban, ovulációja kiváltható humán koriogonadotropinnal (hCG-vel), a törzstenyészet állatai pedig tenyésztőktől kereskedelmi forgalomban könnyen beszerezhetők.

8. Mint minden gerinces élőlény esetében, a kétéltűek szaporodását is a hipotalamusz-hipofízis-gonád (HPG) tengely szabályozza (4). Az ösztrogének és az androgének közvetítő szerepet töltenek be ebben az endokrin rendszerben, irányítva az ivari kétalakúságot mutató szövetek fejlődését és fiziológiáját. Ez a tengely különösen a kétéltűek életciklusának három elkülönülő fázisában aktív: (1) a lárva szakaszban az ivarmirigyek differenciálódása során, (2) a növendék szakaszban a másodlagos ivari jellegek kifejlődése és az ivarmirigyek érése során, valamint (3) a kifejlett példányok funkcionális szaporodása során. E három fejlődési szakasz mindegyike vélhetően érzékenyen reagál bizonyos vegyi anyagok, például az ösztrogén és az androgén endokrin rendszert zavaró hatására, ami végső soron az élőlények szaporodási képességének csökkenéséhez vezet.

9. Az ivarmirigyek a bipotenciális ivarredő első megjelenésekor, az NF szerinti 43. stádiumban kezdenek fejlődni. Az ivarmirigyek differenciálódása az NF szerinti 52. stádiumban veszi kezdetét, amikor az elsődleges csírasejtek vagy a medulláris szövethez migrálnak (hímeknél) vagy a fejlődő ivarmirigyek kérges régiójában maradnak (nőstényeknél) (3). Először az 1950-es években számoltak be arról, hogy a *Xenopus* ivarmirigyeinek nemi differenciálódási folyamata érzékeny a vegyi anyagok módosító hatására (5) (6). Az ivarmirigy e differenciálódási szakaszában ösztradiollal kezelt ebihalak esetében a hímek ivara megfordul, és felnőttkorukra teljes funkciójú nőstényekké válnak (7) (8). A nőstények ivara is átalakulhat hím ivarrá, erről a hereszövet ebihalakba való átültetését követően számoltak be (9). Bár

az aromatázgátlókkal szembeni kitettség is az ivari funkciók megfordulását eredményezi az *X tropicalisban* (10), ezt a jelenséget nem mutatták ki az *X. laervisban*. A múltban a toxikus anyagok ivarmirigyek differenciálódására gyakorolt hatását az átalakulás fázisában lévő ivarmirigyek szövettani vizsgálata alapján határozták meg, az ivarok megfordulását pedig kizárólag az ivararányok elemzése révén tudták megállapítani. Egészen a közelmúltig nem létezett módszer a *Xenopus* genetikai ivarának közvetlen meghatározására. Az *X. laevis* ivari markereinek közelmúltbeli létrehozása lehetővé teszi a genetikai ivar meghatározását és a megfordult ivarú állatok közvetlen azonosítását (11).

10. A hímeknél a növendékek fejlődésének előrehaladtával a vér tesztoszteronszintje a másodlagos ivari jellegek kialakulásával és a herék fejlődésével párhuzamosan növekszik. A nőstényeknél a petefészkek által termelt ösztradiol hatására vitellogenin (VTG) jelenik meg a plazmában, vitellogenikus petesejtek a petefészekben és petevezetékek fejlődnek ki (12). A petevezetékek női másodlagos ivari jellegek, amelyek a szaporodás során a petesejtek érésében játszanak szerepet. A petevezetéken áthaladó petesejtek külsejére nyálkás bevonat kerül, majd megtermékenyítésre készen összegyűlnek a petetömlőben. Úgy tűnik, hogy a petevezeték fejlődését az ösztrogén szabályozza, mivel fejlődése korrelál az *X. laevis* (13) és az *X. tropicalis* (12) vérében mért ösztradiolszintekkel. Beszámolók szerint poliklórozott bifenil vegyületekkel (14) és 4-terc-oktilfenollal (15) való kezelést követően a hímeknél petevezeték fejlődött ki.

A VIZSGÁLAT ELVE

11. A vizsgálati terv alapján az *X. laevis* embriókat az NF szerinti 8–10. stádiumban víz közvetítésével a vizsgálati vegyi anyag négy különböző koncentrációjával kezelik és kontrollvizsgálat(ok)at is végeznek egészen a kontroll NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges átlagos időtartamát követő 10 hétig, egy közbenső részmintát vesznek az NF szerinti 62. stádiumban. Bár a táplálékon keresztül elvileg a nagymértékben víztaszító vegyi anyagok adagolása is megoldható, ez idáig csekély tapasztalatot szereztek ennek az expozíciós útnak e vizsgálat keretében való alkalmazásáról. Minden vizsgálati koncentrációt négy ismétlésben és minden kontrollt nyolc ismétlésben vizsgálnak. A kezelés során értékelt végpontok közé tartoznak az általános toxicitást jelző végpontok (vagyis a mortalitás, a rendellenes viselkedés és a növekedést meghatározó tényezők (testhossz és testtömeg)), valamint azok a végpontok, amelyek révén jellemezhetők az ösztrogén, az androgén vagy a pajzsmirigy által közvetített fiziológiai folyamatokat célzó konkrét endokrin toxicitási hatásmechanizmusok (vagyis a pajzsmirigy kórszövettana, az ivarmirigy és az ivarmirigy-vezeték kórszövettana, a rendellenes viselkedés, a vérplazma vitellogenin szintje (választható) és a genotípusos/fenotípusos ivararányok).

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGI KRITÉRIUMAI

12. A vizsgálat érvényességéhez az alábbi kritériumoknak kell teljesülniük:

— a vizsgálat során az oldott oxigén koncentrációjának mindvégig el kell érnie a levegőtelítettségi érték 40 %-át;

— a vízhőmérsékletet a 21 ±1 °C-os tartományban kell tartani, az ismétlések és a kezelések közötti különbség nem haladhatja meg az 1,0 °C-ot;

— a vizsgálati oldat pH-értékét 6,5 és 8,5 között kell tartani, az ismétlések és a kezelések közötti különbség nem haladhatja meg a 0,5-öt;

— bizonyítékkal kell alátámasztani, hogy a vizsgálati vegyi anyag oldatban lévő koncentrációit az átlagos mért értékek ±20 %-os tartományán belül sikerült tartani;

— az expozíciós időszak alatt a mortalitás egyik kontrollismétlésben sem haladhatja meg a 20 %-ot;

— a vizsgálat elindításához kiválasztott íváson belül az életképességnek legalább 70 %-osnak kell lennie;

— a kontrollokban az NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges átlagos időtartam legfeljebb 45 nap lehet;

— a kontrollokban és az oldószeres kontrollokban (ha végeztek ilyet) a vizsgált élőlények átlagos testtömegének az NF szerinti 62. stádiumban el kell érnie az 1,0 ±0,2 g-ot, a vizsgálat végén pedig a 11,5 ±3 g-ot.

13. Bár ez nem érvényességi kritérium, ajánlatos legalább három – három érvényes ismétlést bevonó – kezelési szintnek rendelkezésre állnia az elemzéshez. Kezelést érvénytelenítő túlzott mortalitásról akkor lehet szó, ha legalább két ismétlésben tapasztalnak 4-nél több (vagyis 20 %-ot meghaladó) elhullást, amely technikai hibával nem magyarázható. Az elemzéshez legalább három – nyilvánvaló toxicitást nem mutató – kezelési szintnek kell rendelkezésre állnia. Nyilvánvaló toxicitásra utaló jel lehet – a teljesség igénye nélkül –, ha az élőlény a víz felszínén lebeg, a tartály alján fekszik, fordítva vagy szabálytalanul úszik, nem emelkedik fel a felszínre, nem reagál az ingerekre, illetve morfológiai rendellenességeket (pl. végtagdeformitások), haemorrhagiás léziókat vagy hasi ödémát mutat.

14. Az érvényességi kritériumoktól való eltérés esetén a vizsgálati adatok megbízhatóságára gyakorolt következményeket mérlegelni kell, az eltéréseket és a mérlegelt következményeket bele kell foglalni a jegyzőkönyvbe.

A VIZSGÁLATI MÓDSZEREK LEÍRÁSA

Berendezés

15. Normál laboratóriumi felszerelés és különösen az alábbiak:

a) hőmérséklet-szabályozó készülék (pl. 21 ±1 °C-ra beállítható fűtőtestek vagy hűtőberendezések);

b) hőmérő;

c) binokuláris preparálómikroszkóp és bonceszközök;

d) legalább 4 megapixel felbontású és mikrofunkcióval rendelkező digitális fényképezőgép (ha szükséges);

e) 0,001 mg-ig vagy 1 µg-ig mérni képes analitikai mérleg;

f) oldottoxigénkoncentráció-mérő és pH-mérő;

g) lux egységek mérésére képes fényerősségmérő.

Víz

Eredet és minőség

16. Bármely olyan helyben elérhető hígítóvíz (pl. forrásvíz vagy aktív szénen szűrt csapvíz) használható, amelyben az *X. laevis* lárvák normálisan növekednek és fejlődnek, és rendelkezésre állnak az adott vízben való normális növekedést alátámasztó bizonyítékok. Mivel a helyi vízminőség területenként lényegesen eltérhet, a víz minőségét elemezni kell, különösen ha nem állnak rendelkezésre korábbi adatok a víz kétéltű lárvák tenyésztésére való alkalmasságáról. Nehézfémek (pl. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), főbb anionok és kationok (pl. Ca^{2+}, mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), növényvédő szerek, összes szerves szén és szuszpendált szilárd anyag mérését el kell végezni a vizsgálat megkezdése előtt és/vagy például félévente, amennyiben a hígítóvíz ismerten viszonylag állandó minőségű. Az elfogadható minőségű hígítóvíz néhány kémiai tulajdonságának felsorolása a 2. függelékben található.

A vizsgálati víz jodidkoncentrációja

17. Annak érdekében, hogy a pajzsmirigy pajzsmirigyhormonok szintetizálásával biztosítani tudja a normál átalakulást, elegendő jodidnak kell elérhetőnek lennie a lárvák számára a vízben és a táplálékforrásokban. A megfelelő fejlődést biztosító minimális jodidkoncentráció tekintetében jelenleg sem a táplálékra, sem a vízre vonatkozólag nem állnak rendelkezésre empirikus iránymutatások. A jodid elérhetősége hatással lehet a pajzsmirigynek a pajzsmirigyre ható anyagokkal szembeni válaszkészségére, és ismert az is, hogy a jodid módosítja a pajzsmirigy alapaktivitását, amit figyelembe kell venni a pajzsmirigy kórszövettani eredményeinek értelmezésénél. A korábbi munkák alapján a vizsgálat bizonyítottan jól működik, ha a hígítóvíz jodid- (I^{-}) koncentrációja 0,5 és 10 µg/l között van. Ideális esetben a vizsgálat teljes időtartama alatt a hígítóvíz (nátrium vagy kálium só formájában hozzáadott) jodidkoncentrációja legalább 0,5 µg/l. Ha a vizsgálati víz ioncserélt vízből mesterségesen készített víz, legalább 0,5 µg/l koncentrációban jódot kell hozzáadni. A vizsgálati jegyzőkönyvbe bele kell foglalni a vizsgálati víz (a hígítóvíz) mért jodidkoncentrációját, valamint azt, ha adott esetben a vizsgálati vizet jóddal vagy más sóval egészítették ki. Nem csak a vizsgálati víz, hanem a táplálék jódtartalma is mérhető.

Expozíciós rendszer

18. A vizsgálatot átfolyásos hígítórendszer használatával dolgozták ki. A rendszer vízzel érintkező elemeinek üvegből, rozsdamentes acélból és/vagy más kémiailag semleges anyagból kell készülnie. Expozíciós tartályként üvegből vagy rozsdamentes acélból készült akváriumot kell használni, 4,0 és 10,0 liter közötti hasznos tartálytérfogattal (10–15 cm minimális vízmélységgel). A rendszernek képesnek kell lennie valamennyi expozíciós koncentráció, a kontroll és szükség esetén az oldószeres kontroll számára megfelelő feltételeket biztosítani, kezelésenként négy, kontrollonként nyolc ismétlésben. Az egyes tartályok áramlási sebességének állandónak kell lennie a biológiai feltételek, valamint a vegyi anyaggal történő expozíció fenntartása érdekében. Az áramlási sebességet ajánlatos úgy meghatározni (pl. naponta legalább 5 vízforgatás), hogy a vegyi anyag koncentrációja ne csökkenhessen a vizsgált élőlények és az akváriumban jelen lévő vízi mikroorganizmusok metabolikus aktivitása, abiotikus lebomlási utak (hidrolízis, fotolízis) vagy távozás (elillanás, szorpció) miatt. Az expozíciós rendszeren belül a kezelési tartályokat véletlenszerűen kell egy-egy térbeli pozícióhoz rendelni, hogy csökkenteni lehessen a pozícióból fakadó lehetséges hatásokat, köztük a hőmérséklet, a fényerő stb. enyhe eltéréseit. Az átfolyásos expozíciós rendszerek felállítására vonatkozó további információkért olvassa el az ASTM „Vizsgálati anyagok akut toxicitási vizsgálata halakon, makroszkopikus gerinctelleneken és kétéltűeken” című standard útmutatóját (16).

A vegyi anyag bejuttatása: a vizsgálati oldatok elkészítése

19. A vizsgálati oldatok expozíciós rendszerbe juttatásához a vizsgálati vegyi anyag törzsoldatát megfelelő szivattyúval vagy más készülékkel adagolják az expozíciós rendszerbe. Az expozíciót megelőzően a törzsoldat áramlási sebességét a vizsgálati oldatok analitikus módszerrel való megerősítésével összhangban kalibrálják, az áramlási mennyiséget pedig a vizsgálat során rendszeresen ellenőrzik. Az egyes kamrákba juttatott vizsgálati oldatot legalább napi 5 térfogatcsere révén megújítják.

20. A vizsgálati vegyi anyag rendszerbe történő bejuttatására alkalmazott módszer a vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságaitól függően változhat. Ezért a vizsgálat megkezdése előtt be kell gyűjteni a vegyi anyagra vonatkozó, a vizsgálhatóság meghatározása szempontjából releváns alapinformációkat. Az vizsgálati vegyi anyag tulajdonságaival kapcsolatos hasznos információk többek között a szerkezeti képlet, a molekulatömeg, a tisztaság, a vízben és a fény hatására tanúsított stabilitás, a pK_a és a K_{ow}, a vízoldékonyság (lehetőleg a vizsgálati közegben), a gőznyomás, továbbá az azonnali biológiai lebonthatóságra irányuló vizsgálat eredményei (C.4. vizsgálati módszer (17) vagy C.29. vizsgálati módszer (18)). A vízoldékonyságból és a gőznyomásból meghatározható a Henry-állandó, amely megmutatja, hogy előfordulhat-e a vizsgálati vegyi anyag párolgás miatt eltávozása. Alaposan mérlegelni kell, hogy a fenti információk hiányában elvégezhető-e a vizsgálat, mivel a vizsgálat kialakítása függ a vizsgálati vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságaitól, így ezen adatok nélkül a vizsgálat eredménye nehezen értelmezhető vagy semmitmondó lehet. Olyan megbízható analitikai módszerrel kell rendelkezni a vizsgálati oldatokban lévő vizsgálati vegyi anyag számszerűsítésére, amelynek pontossága és érzékelési határa ismert és dokumentált. A vízben oldódó vizsgálati vegyi anyagokat fel lehet oldani a hígítóvíz alikvot részeiben olyan koncentrációban, amely lehetővé teszi a vegyi anyag kívánt vizsgálati koncentrációban történő bejuttatását az átfolyásos rendszerbe. A szobahőmérsékleten folyékony vagy szilárd és vízben közepesen oldódó vegyi anyagokat folyadék:folyadék vagy folyadék:szilárd telítési módszerek (pl. üveggyapot oszlopszaturátorok) használatával lehet bejuttatni (19). Bár a táplálékon keresztül elvileg a nagymértékben víztaszító vegyi anyagok adagolása is megoldható, csekély tapasztalat áll rendelkezésre ennek az expozíciós útnak e vizsgálat keretében való alkalmazásáról.

21. A kiválasztott koncentrációjú vizsgálati oldatok a törzsoldat hígításával készíthetők el. A törzsoldatot lehetőleg a vizsgálati vegyi anyagnak a hígítóvízbe, mechanikai eszközök (pl. keverő és/vagy ultrahang) segítségével történő bekeverésével vagy megmozgatásával kell elkészíteni. Telítési oszlopok/rendszerek vagy passzív adagolási módszerek (20) is alkalmazhatók a megfelelő koncentrációjú törzsoldat elkészítéséhez. Előnyben kell részesíteni a hordozómentes vizsgálati rendszereket; a különböző vizsgálati vegyi anyagok azonban változatos fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek, ami valószínűleg eltérő megközelítést igényel a vegyi anyagoknak való expozíciót szolgáló víz elkészítése során. Minden erőfeszítést meg kell tenni az oldószerek vagy hordozók elkerülése érdekében, mivel: (1) bizonyos oldószerek maguk is toxicitást és/vagy nem kívánatos vagy nem várt válaszokat idézhetnek elő, (2) a vegyi anyagoknak a vízoldhatóságuk határán túli vizsgálata (ami gyakran előfordul oldószerek használata esetén) a hatásos koncentráció pontatlan meghatározását eredményezheti, és (3) hosszabb távú vizsgálatok során az oldószerek használata jelentős mértékű „biofilmképződést" eredményezhet, amely mikrobiális tevékenységgel jár együtt, ami befolyásolhatja a környezeti feltételeket és a vizsgált koncentrációk fenntartásának képességét, valamint (4) oldószer használata esetén olyan dokumentált adatok hiányában, amelyek igazolják, hogy az oldószer nem befolyásolja a vizsgálat kimenetelét, oldószeres kontrollként szolgáló kezelést kell végezni, aminek jelentős állatjóléti következményei vannak, mivel a vizsgálat lefolytatása további állatok bevonását igényli. A nehezen vizsgálható vegyi anyagoknál legvégső esetben oldószert lehet alkalmazni, és a legjobb módszer meghatározása érdekében tanulmányozni kell „A nehezen vizsgálható anyagok és keverékek vízi toxikológiai vizsgálata" című OECD-iránymutatást (21). A megfelelő oldószert a vizsgálati vegyi anyag kémiai tulajdonságai és az oldószer használatára vonatkozó dokumentált kontrolladatok rendelkezésre állása határozzák meg. Dokumentált adatok hiányában az oldószer megfelelőségét a végleges vizsgálat lefolytatása előtt meg kell határozni. Amennyiben elkerülhetetlen az oldószer használata, és mikrobiális tevékenység (biofilmképződés) figyelhető meg, ajánlatos a vizsgálat során (legalább hetente) feljegyezni/jelentésbe foglalni a tartályonkénti biofilmképződést. Ideális esetben az oldószer koncentrációját állandó értéken tartják az oldószeres kontroll és a vizsgálati vegyi anyaggal történő minden kezelés során. Amennyiben az oldószer koncentrációját nem tartják állandó értéken, az oldószeres kontrollban a vizsgálati kezelés során alkalmazott legmagasabb oldószerkoncentrációt kell vizsgálni. Oldószerhordozó használata esetén az oldószer legmagasabb koncentrációja nem haladhatja meg a 100 µl/l vagy 100 mg/l értéket (21), és az oldószer koncentrációját a lehető legalacsonyabb szinten (pl. ≤20 µl/l) javasolt tartani annak érdekében, hogy elkerülhetők legyenek az oldószer esetleges hatásai a mért végpontokra (22).

Kísérlethez felhasznált állatok

A vizsgálathoz használt fajok

22. A vizsgálatban alkalmazott faj az *X. laevis*, mert: (1) világszerte rutinszerűen tenyésztik a laboratóriumokban, (2) könnyen beszerezhető kereskedelmi forgalomban is és (3) genetikai ivara meghatározható.

A felnőtt állatok gondozása és tenyésztése

23. Az *X. laevis* megfelelő gondozásáról és tenyésztéséről egy szabványosított iránymutatás nyújt tájékoztatást (23). Az *X. laevis* tartását és gondozását Read is ismerteti (24). A párosodás kiváltása érdekében három–öt felnőtt nőstény és hím pár hasüregébe humán koriogonadotropint (hCG-t) fecskendeznek be. A nőstény példányokba körülbelül 800–1 000 NE, a hím példányokba körülbelül 500–800 NE 0,6–0,9 %-os sóoldatban (vagy béka Ringer-oldatban, egy kétéltűekkel való használatra kifejlesztett izotóniás sóoldatban) feloldott hCG-t injektálnak. A befecskendezett térfogatnak megközelítőleg 10 µl/g testtömegarányúnak kell lennie (~1 000 µl). Ezt követően az indukált tenyészpárokat az

amplexus elősegítése érdekében nagy tartályokban, zavartalan, statikus körülmények között tartják. A tenyésztőtartályok alján (pl. 1,25 cm-es nyílásokkal rendelkező) rozsdamentes acél hálóból készült álfenéknek kell lennie, amely lehetővé teszi, hogy a peték a tartály aljára essenek. A késő délután hCG-vel beinjekciózott békák a petéik többségét általában a következő nap délelőttjére rakják le. Miután elegendő mennyiségű petét raktak le és termékenyítettek meg, a felnőtt példányokat el kell távolítani a tenyésztőtartályokból. Ezután begyűjtik a petéket, a kocsonyás bevonatot pedig L-ciszteinnel végzett kezeléssel eltávolítják (23). Elkészítenek egy 2 %-os L-cisztein oldatot, a pH-t 1 M NaOH hozzáadásával 8,1 értékre állítják be. Ezt a 21 °C-os oldatot beleöntik egy 500 ml-es, egy ívásból származó petéket tartalmazó Erlenmeyer-lombikba, egy-két percen keresztül óvatosan kavargatják, majd 21 °C-os tenyésztővízben 6–8 alkalommal alaposan átöblítik. Ezt követően a petéket áthelyezik egy kristályosító csészébe, majd megállapítják, hogy az életképesség meghaladja-e a 70 %-ot, és a sejtosztódás fázisában lévő embriók minimális rendellenességet mutatnak-e.

VIZSGÁLATI TERV

Vizsgálati koncentrációk

24. A vegyi anyagot ajánlatos legalább négy koncentrációban vizsgálni a megfelelő kontrollokkal együtt (szükség esetén oldószeres kontrollokkal). A koncentrációk közötti távolság meghatározásához általában ajánlatos legfeljebb 3,2-es osztótényezőt használni.

25. A kétéltűekre vonatkozó korábbi vizsgálatok eredményeit a lehetőségekhez mérten fel kell használni a vizsgálatban alkalmazandó legmagasabb vizsgált koncentráció meghatározásához, hogy elkerülhető legyen a nyilvánvalóan toxikus koncentrációk használata. E legmagasabb koncentráció megállapításához hozzájárulhatnak például a meglévő kétéltűvizsgálatokból, úgymint a C.38. vizsgálati módszerből, vagyis a kétéltű-átalakulási vizsgálatból (25), a *Xenopus* fajt alkalmazó békaembrió teratogenezis vizsgálatból (23) és/vagy a halakon végzett vizsgálatokból – például a C.48., C.41. és C.49. vizsgálati módszerből (26) (27) (28) – származó mennyiségi szerkezetaktivitási összefüggések, keresztbivatkozások és adatok. A LAGDA lefolytatása előtt végezhető dózisbehatároló kísérlet. A dóziskereső kísérletben a kezelést ajánlatos a megtermékenyítést követő 24 órán belül elkezdeni és 7–14 napon keresztül (vagy szükség esetén még tovább) folytatni, a vizsgálati koncentrációkat pedig úgy kell megállapítani, hogy a köztük lévő távolságot legfeljebb 10-es tényezővel határozzák meg. A dózisbehatároló kísérlet eredményei alapján kell meghatározni a LAGDA során alkalmazott legmagasabb vizsgálati koncentrációt. Amennyiben a vizsgálat során oldószert kell használni, az oldószer megfelelőségét (vagyis hogy hatással van-e a vizsgálat kimenetelére) meg lehet határozni a dózisbehatároló vizsgálat részeként.

Vizsgálati csoportok és kontrollok ismétlései

26. Vizsgálati koncentrációnként legalább négy tartályt (ismétlést), a kontrollhoz (és szükség esetén az oldószeres kontrollhoz) pedig legalább nyolc ismétlést kell használni (vagyis a megfelelő statisztikai erő biztosítása érdekében a kontrollnak és az esetleges oldószeres kontrollnak kétszer annyi ismétlést kell tartalmaznia, mint az egyes kezelt csoportoknak). Az egyes ismétlések legfeljebb 20 állatot tartalmazhatnak. A vizsgálat állatok minimális száma 15 (az NF szerinti 62. stádiumban végzett részmintavétel során 5 a növendékek esetében 10). Mivel számolni kell az esetleges mortalitással, minden ismétléshez további állatokat adnak hozzá, miközben fenntartják a kritikus egyedszámot, azaz 15 egyedet.

ELJÁRÁS

A vizsgálat áttekintése

27. A vizsgálatot újszülött (az NF szerinti 8–10. stádiumban lévő) embriókkal kezdik meg és a növendékkori fejlődésig folytatják. Az állatokat naponta ellenőrzik, hogy felmérjék a mortalitást és a rendellenes viselkedés jeleit. Az NF szerinti 62. stádiumban a lárvák egy részmintáját (ismétlésenként legfeljebb 5 állat) begyűjtik, és megvizsgálják a különböző végpontokat (1. táblázat). Miután az összes állat elérte az NF szerinti 66. stádiumot, vagyis lezárult az átalakulási fázis (illetve a vizsgálat kezdetétől számított 70. nap után, amelyik előbb bekövetkezik), véletlenszerű selejtezéssel (részmintavétel nélkül) az állatok számát tartályonként 10-re csökkentik (lásd a 43. pontot), a fennmaradó állatokat pedig tovább kezelik a kontroll NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges átlagos időtartamát követő 10 hétig. A vizsgálat végén a növendékek mintáján további méréseket végeznek (1. táblázat).

Expozíciós körülmények

28. A vizsgálati paraméterek teljes összefoglalása a 3. függelékben található. Az expozíciós időszak alatt naponta mérni kell a vizsgálati oldatok oldottoxigén-koncentrációját, hőmérsékletét és pH-értékét. Az oldatok vezetőképességét, lúgosságát és keménységét havonta mérik. A vizsgálati oldatok vízhőmérsékletét illetően az ismétlések és a kezelések közötti (egy napon belüli) különbség nem haladhatja meg az 1,0 °C-ot. A vizsgálati oldatok pH-értéke tekintetében az ismétlések és a kezelések közötti különbség nem haladhatja meg a 0,5-öt.

29. Az el nem fogyasztott táplálék és az ürülék eltávolítása érdekében az expozíciós tartályokat naponta lehet szifonnal tisztítani, ügyelve a tartályok közötti keresztszennyeződés elkerülésére. Gondoskodni kell róla, hogy az állatokat a lehető legkisebb stressz és trauma érje, különösen az akváriumok mozgatása és takarítása, valamint az állatok kezelése közben. Kerülni kell a stresszhatást kiváltó körülményeket/tevékenységeket, mint például a hangos és/vagy szakadatlan zajt, az akváriumok kopogtatását és a tartályokban okozott rezgést.

A vizsgálati vegyi anyagnak való kezelés időtartama

30. A kezelést újszülött (az NF szerinti 8–10. stádiumban lévő) embriókkal kezdik meg és a kontrollcsoportban az NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges átlagos időtartamot (a vizsgálat kezdetétől számítva legfeljebb 45 nap) követő 10 hétig folytatják. A LAGDA időtartama általában 16 hét (legfeljebb 17 hét).

A vizsgálat elindítása

31. A vizsgálat elindításához olyan szülőket kell használni, amelyekről korábban kimutatták, hogy az utódaik genetikai ivara meghatározható (5. függelék). A felnőttek ívását követően begyűjtik az embriókat, kocsonyás bevonatuk eltávolítása érdekében ciszteinnel kezelik őket, majd egy szűrővizsgálat keretében meghatározzák életképességüket (23). A ciszteines kezelésre azért van szükség, hogy a szűrővizsgálat során az embriók ne ragadjanak hozzá a különböző felületekhez. A szűrővizsgálatot preparálómikroszkóp alatt végzik, megfelelő méretű szemcseppentővel eltávolítva a nem életképes embriókat. Lehetőség szerint egyetlen, 70 %-nál nagyobb életképességet mutató ívásból származó egyedeket használjanak a vizsgálathoz. Az NF szerinti 8–10. stádiumban lévő embriókat véletlenszerűen szétosztják a megfelelő mennyiségű hígítóvízzel feltöltött expozíciós kezelési tartályok között, úgy, hogy minden egyes tartály 20 embriót tartalmazzon. Az embriókat az áthelyezés során óvatosan kell kezelni a kezeléssel járó stressz minimalizálása és a sérülések elkerülése érdekében. A megtermékenyítés utáni 96. órára az ebihalaknak már keresztül kellett jutniuk a vízoszlopon és el kellett kezdeniük feltapadni a tartály oldalára.

Etetési rend

32. A LAGDA protokoll fontos része a táplálék és a táplálékmennyiség változtatása az *X. laevis* különböző életszakaszai során. A lárva fázis során a táplálék túladagolása jellemzően megnöveli a gerincferdülés (scoliosis) gyakoriságát és súlyosságát (8. függelék), amit kerülni kell. Ezzel szemben a lárva fázis során az elégtelen mennyiségű táplálék rendkívül eltérő fejlődési ütemet eredményez a kontrollok között, ami csökkentheti a statisztikai erőt vagy zavarhatja a vizsgálati eredményeket. A 4. függelék tájékoztatást nyújt az átfolyásos körülmények között nevelt *X. laevis* lárvák és növendékek ajánlott táplálékáról és etetési rendjéről, alternatív megoldások is alkalmazhatók, amennyiben biztosítják a vizsgálati élőlények kielégítő növekedését és fejlődését. Fontos megjegyezni, hogy az endokrin rendszerrel kapcsolatos végpontok mérése esetén a táplálóknak nem szabad az endokrin rendszerre ható anyagokat, például szójalisztet tartalmaznia.

A lárvák etetése

33. A lárvák ajánlott tápláléka tenyésztővízzel (vagy hígítóvízzel) összekevert ivadékindító pisztrángtápból, *Spirulina* algakorongokból és pehely formájú aranyhaltápból (pl. TetraFin® pelyhek, Tetra, Németország) tevődik össze. Ezt a keveréket hétköznap napi három alkalommal, hétvégén naponta egyszer adagolják az állatoknak. Az ebihalakat a megtermékenyítés utáni 8. naptól kezdve etetik élő *Artemia* sórákkal, vagyis 24 órás naupliusszal is, munkanapokon naponta kétszer, hétvégén naponta egyszer. A lárvák etetésének, amelyet minden vizsgálati edényben azonos módon kell elvégezni, lehetővé kell tennie a vizsgált állatok megfelelő növekedését és fejlődését, biztosítva ezáltal a vizsgálat eredményeinek reprodukálhatóságát és átvihetőségét: (1) a kontrolloknál az NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges átlagos időtartam legfeljebb 45 nap lehet, és (2) a kontrolloknál az NF szerinti 62. stádiumban az átlagos testtömegnek ajánlatos az 1,0 ±0,2 g tartományban lennie.

A növendékek etetése

34. Az átalakulási fázis lezárultát követően a táplálék prémium minőségű süllyedő békatápból áll, például Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, FL, USA) (4. függelék). A békaporontyok (fiatal növendékek) számára a pelletek méretét csökkenteni kell, ehhez rövid ideig kávédarálóban vagy turmixgépben őrlik, illetve mozsárban mozsártörővel apróra zúzzák a pelleteket. Amint a növendékek megfelelő méretűre nőnek ahhoz, hogy el tudják fogyasztani az egész pelleteket, nincs többé szükség azok őrlésére vagy apróra zúzására. Az állatokat naponta egyszer kell táplálni. A növendékek etetésének biztosítani kell az élőlények megfelelő növekedését és fejlődését: a vizsgálat végén a kontrollnövendékek átlagos testtömegének ajánlatos a 11,5 ±3 g tartományban lennie.

Analitikai kémia

35. A vizsgálat megkezdése előtt például a meglévő információk és ismeretek alapján meg kell határozni a vizsgálati vegyi anyag stabilitását (pl. oldhatóságát, lebonthatóságát és illékonyságát), valamint az összes elemzési módszert. Amennyiben az adagolás hígítóvízben történik, a rendszer működésének ellenőrzése céljából javasolt az egyes vizsgálati tartályokba (ismétlésekbe) helyezett vizsgálati oldatokat a vizsgálat kezdete előtt analizálni. Az expozíciós időszak során a vizsgálati vegyi anyag koncentrációit megfelelő időközönként – lehetőleg minden heten – meghatározzák az egyes kezelt csoportok egyik tartályában, az adott kezelt csoporton belül minden héten másik tartályt vizsgálva. Az eredményeket célszerű a ténylegesen mért koncentrációértékekre alapozni. Amennyiben azonban az oldatban lévő vizsgálati vegyi anyag koncentrációját sikerült a vizsgálatok során mindvégig a névleges koncentráció ±20 %-os tartományán belül tartani, akkor az eredményeket a névleges vagy a mért értékekre is lehet alapozni. Emellett a vizsgálat teljes időtartama alatt az egy kezelésen belül mért vizsgálati koncentrációk variációs koefficiense (CV) minden koncentrációban legfeljebb 20 % lehet. Amennyiben a mért koncentrációértékek nem maradnak a névleges koncentrációértékek 80–120 %-án belül (például biológiailag nagyon könnyen lebontható vagy nagymértékben abszorbeáló vegyi anyagok esetében), a hatásos koncentrációkat átfolyásos vizsgálatok esetében a számtani átlaghoz viszonyítva kell meghatározni és kifejezni.

36. A hígítóvíz és a törzsoldat áramlási sebességét az expozíciós időszak alatt mindvégig megfelelő időközönként (pl. hetente háromszor) ellenőrizni kell. Olyan vegyi anyagok esetében, amelyeket néhány vagy egyetlen névleges koncentrációban sem lehet kimutatni (például mert gyorsan lebomlanak vagy abszorbeálnak a vizsgálati edényekben, vagy mert jelentős részben felhalmozódnak a kezelt állatok szervezetében), javasolt a kísérleti oldat megújítási arányát minden kamrában úgy meghatározni, hogy a vizsgálati koncentrációk a lehető legállandóbbak legyenek.

Megfigyelések és végpontmérések

37. A kezelés során értékelt végpontok közé tartoznak a toxicitást jelző végpontok, azon belül a mortalitás, a rendellenes viselkedés, úgy mint a betegség és/vagy az általános toxicitás klinikai tünetei és a növekedést meghatározó tényezők (testhossz és testtömeg), valamint azok a patológiás végpontok, amelyek egyaránt reagálhatnak az általános toxicitásra és az ösztrogén, az androgén vagy a pajzsmirigy által közvetített útvonalakat célzó endokrin hatásmechanizmusokra. Emellett a vizsgálat végén igény szerint mérhető a vérplazma VTG-koncentrációja. A VTG mérése hozzájárulhat a vizsgálati eredményeknek az endokrin rendszert feltehetően zavaró anyagok endokrin mechanizmusaival összefüggésben történő értelmezéséhez. A végpontokat és mérésük ütemtervét az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat

A LAGDA végpontjainak áttekintése

Végpontok (*)	Naponta	Közbenső mintavétel (lárvák mintái)	Vizsgálat vége (növendékek mintái)
Mortalitás és rendellenességek	X		
Az NF szerinti 62. stádiumig eltelt idő		X	
(Kór)szövettan (pajzsmirigy)		X	
Morfometria (testtömeg és testhossz növekedése)		X	X
Hepato-szomatikus index (LSI)			X
Genetikai/fenotípusos ivararány			X
Kórszövettan (ivarmirigyek, reproduktív vezetékek, vese és máj)			X
Vitellogenin (VTG) (választható)			X

(*) Az összes végpontot statisztikailag elemzik.

Mortalitás és napi megfigyelések

38. Naponta ellenőrizni kell, hogy a vizsgálati tartályokban vannak-e elpusztult állatok, és a mortalitást minden tartály esetében fel kell jegyezni. Az elhullott állatokat észrevételüket követően azonnal el kell távolítani a vizsgálati tartályból. Az elhullott állatok fejlődési stádiumát a következők szerint kell kategorizálni: NF szerinti 58. stádium előtt (mellső végtagok megjelenése előtti időszak), NF szerinti 58.–NF szerinti 62. stádium, NF szerinti 63.–NF szerinti 66. stádium (az NF szerinti 62. stádium és a farok teljes felszívódása közötti időszak) és NF szerinti 66. stádium után (lárvakor utáni időszak). A 20 %-ot meghaladó mortalitási arány egyaránt jelezhet nem megfelelő vizsgálati körülményeket vagy a vizsgálati vegyi anyag nyilvánvaló toxikus hatását. Az állatok általában az ívást követő fejlődési szakasz első néhány napján és az átalakulás tetőpontján a legérzékenyebbek a nem vegyi anyagok által kiváltott, mortalitást okozó eseményekre. Az ilyen jellegű mortalitást kitűnik a kontrolladatokból.

39. Ezenfelül fel kell jegyezni a megfigyelt abnormális viselkedést, szabad szemmel látható fejlődési rendellenességeket (pl. a gerincferdülést) vagy léziókat. A gerincferdüléses eseteket meg kell számlálni (gyakoriság) és súlyosság szerint osztályozni kell (pl. nem észrevehető – NR, enyhe – 1, mérsékelt – 2, súlyos – 3; 8. függelék). A vizsgálat teljes időszaka alatt erőfeszítéseket kell tenni annak érdekében, hogy korlátozzák (pl. a kontrollokban 10 % alá szorítsák) a mérsékelt és a súlyos gerincferdülés előfordulását, ugyanakkor a kontrollcsoportban megfigyelt rendellenességek gyakoribb előfordulása nem feltétlenül ad okot a vizsgálat leállítására. A lárva fázisban lévő állatok normális viselkedését a következők jellemzik: az állatok a vízoszlopban lebegnek, farkuk a fejük fölé emelkedik, a farokúszójuk egyenletesen, ritmikusan mozog, időszakonként a felszínre emelkednek, a kopoltyúfedőjük mozog, és reagálnak az ingerekre. Kóros viselkedés például ha az állat a víz felszínén lebeg, a tartály alján fekszik, fordítva vagy szabálytalanul úszik, nem emelkedik fel a felszínre, vagy nem reagál az ingerekre. Az átalakulási fázison átesett állatok esetében a fenti rendellenes viselkedések mellett fel kell jegyezni a táplálékfogyasztásban a kezelések között mutatkozó jelentős eltéréseket is. A jelentős fejlődési rendellenességek és elváltozások közé tartoznak többek között a morfológiai rendellenességek (pl. végtagdeformitások), a haemorrhagiás léziók, a hasi ödéma és a bakteriális vagy gombás fertőzések. A növendékek fején, az orrlyukak hátulsó részén látható léziók elégtelen páratartalomra utalhatnak. Ezek minőségi megállapítások, amelyeket a betegségek vagy stressz okozta klinikai tünetekhez hasonlóan kell mérlegelni, és a kontrollállatokkal összehasonlításban kell megtenni. Ha a rendellenességek előfordulási aránya nagyobb az expozíciós tartályokban, mint a kontrollokban, akkor ezt a nyilvánvaló toxicitás bizonyítékának kell tekinteni.

Részmintavétel lárva szakaszban

A lárva szakaszban végzett részmintavétel sémája:

40. Az NF szerinti 62. stádiumot elért ebihalakat eltávolítják a tartályokból, és vagy felhasználják őket a mintavételhez, vagy a kezelés következő szakaszában való részvételhez új tartályba helyezik, illetve egy elválasztó segítségével ugyanazon tartályon belül fizikailag elkülönítik a többi ebihaltól. Az ebihalakat naponta ellenőrzik, és feljegyzik a vizsgálat azon napját, amelyen az egyes ebihalak elérték az NF szerinti 62. stádiumot. Ezt az időpontot a fej alakja alapján határozzák meg. Amint a fej mérete oly mértékben csökkent, hogy szemmel láthatóan körülbelül ugyanolyan széles, mint az ebihal törzse, és a mellső végtagok a szív középső részével egy vonalban helyezkednek el, az egyedek úgy tekinthetők, hogy elérték az NF szerinti 62. stádiumot.

41. Arra kell törekedni, hogy tartályonként (ismétlésenként) összesen öt NF szerinti 62. stádiumban lévő ebihaltól vegyenek mintákat. A mintavételt véletlenszerűen kell végrehajtani, viszont előre ki kell jelölni az ebihalakat. Egy adott tartályban végzett mintavétel elméleti példája látható az **1. ábrán**. Amennyiben valamely tartály 20 túlélő ebihalat tartalmaz abban az időpontban, amikor az első egyed eléri az NF szerinti 62. stádiumot, véletlenszerűen meg kell határozni 5 egy és húsz közé eső számot. Az 1. ebihal az első egyed, amelyik elérte az NF szerinti 62. stádiumot, a 20. ebihal pedig az az egyed, amelyik a tartályban utolsóként érte el az NF szerinti 62. stádiumot. Hasonlóképpen, ha 18 túlélő lárva van egy adott tartályban, akkor véletlenszerűen meg kell határozni 5 egy és tizennyolc közé eső számot. Ezt a műveletet minden egyes tartály esetén el kell végezni, amikor az első vizsgált egyed eléri az NF szerinti 62. stádiumot. Amennyiben az NF szerinti 62. stádiumban zajló mintavétel során hullanak el egyedek, a maradék minták pozícióját véletlenszerűen meg kell változtatni attól függően, hogy hány lárva nem érte még el az NF szerinti 62. stádiumot és még hány mintára van szükség az adott ismétlés összesen öt mintájának eléréséhez. Azon a napon, amikor egy ebihal eléri az NF szerinti 62. stádiumot, az elkészített mintavételi terv alapján meg kell határozni, hogy a szóban forgó egyedet fel kell használni a mintavételhez, vagy a további kezelés céljából fizikailag el kell különíteni a többi ebihaltól. Az 1. ábrán szereplő példa alapján az NF szerinti 62. stádiumot elsőként elért egyedet (amelyet az 1. mező jelez) fizikailag elkülönítik a többi lárvától, hogy továbbra is részt vegyen a kezelésben, és feljegyzik a vizsgálat azon napját, amikor elérte az NF szerinti 62. stádiumot. Ezt követően (ugyanezen példa alapján) a 2. és a 3. számú egyeddel hasonlóképpen járnak el, mint az 1. számúval, majd a 4. számú egyedet kiválasztják mintavételre, hogy megvizsgálják növekedését és pajzsmirigy szöveteit. Ezt az eljárást addig folytatják, amíg a 20. egyedet be nem sorolják az NF szerinti 62. stádiumot elért többi egyed vagy a mintavételhez használt egyedek közé. Az alkalmazott véletlenszerű eljárásnak biztosítania kell, hogy minden vizsgálatban részt vevő szervezet egyenlő valószínűséggel legyen kiválasztható. Ez bármely randomizálási eljárással elérhető, feltéve, hogy az NF szerinti 62. stádium részmintavételi időszaka során hálóba fogják az összes ebihalat.

1. ábra

Az NF szerinti 62. stádiumban végzett mintavételi eljárás egy tartályra vonatkozó elméleti példája

42. A lárva szakaszban zajló részmintavétel során a következő végpontokat értékelik: (1) az NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges idő (azaz a megtermékenyítés és az NF szerinti 62. stádium elérése között eltelt napok száma), (2) külső rendellenességek, (3) morfometria (pl. testtömeg és testhossz) és (4) pajzsmirigy szövettan.

Az ebihalak humánus elpusztítása

43. Az NF szerinti 62. stádiumban lévő ebihalak részmintáját (ismétlésenként 5 egyedet) el kell altatni, úgy, hogy 30 percre megfelelő mennyiségű (pl. 500 ml) érzéstelenítő oldatba (pl. 0,3 %-os MS-222 oldat, trikain-metán-szulfonát, CAS-száma: 886-86-2) merítik őket. Az MS-222 oldatot nátrium-hidrogénkarbonáttal pufferelni kell, hogy az oldat pH-értéke körülbelül 7,0 legyen, mert a nem pufferelt MS-222 oldat savassága irritálja a béka bőrét, ami gyenge abszorbanciához vezet, az pedig az élőlényeket szükségtelen további stressznek teszi ki.

44. A vizsgálati kamrából merítőhálóval eltávolítanak egy ebihalat, és áthelyezik a végleges elaltatást biztosító oldatba. Az állat akkor kerül megfelelően elaltatott és boncolásra kész állapotba, amikor nem reagál az olyan külső ingerekre, mint hátsó végtagjának fogóval való megfogása.

Morfometria (testtömeg és testhossz)

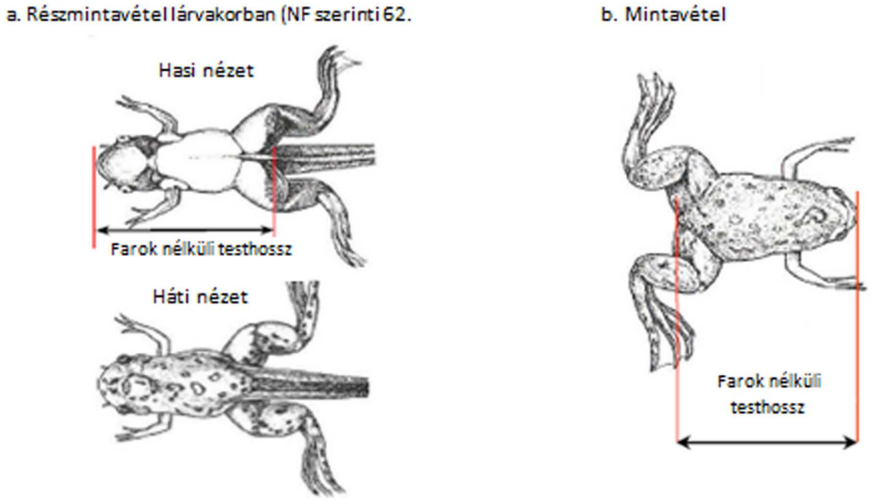
45. A nedves tömeget (a legközelebbi mg-ra kerekítve) és a farok nélküli testhosszt (a legközelebbi 0,1 mm-re kerekítve) minden ebihal esetében közvetlenül azután kell mérni, hogy az állat az altatás következtében elveszti reakcióképességét (2a. ábra). A farok nélküli testhossz mérhető fénykép alapján is, képelemző szoftver használatával. Az ebihalakról a mérés előtt szárazra itatással el kell távolítani a rájuk tapadt felesleges vizet. A testméret (testsúly és farok nélküli testhossz) meghatározását követően fel kell jegyezni az esetleges jelentős morfológiai rendellenességeket és/vagy a toxicitás klinikai tüneteit, például a gerincferdülést (lásd a 8. függeléket), a petechiákat és a vérzést, digitális fénykép készítése ajánlott. A petechiák a véredényekből származó apró vörös vagy lila vérömlenyek.

A szövetek gyűjtése és fixálása

46. A lárva szakaszban zajló részmintavétel során értékelik a pajzsmirigy szöveteket. A törzs alsó, mellső végtagok mögötti részét eltávolítják. A csonkolt testet Davidson-féle fixálószerben fixálják. Az edénybe helyezett fixálószer mennyisége legalább 10-szerese legyen a szövetek közelítőleges térfogatának. A vizsgálat tárgyát képező szövetek megfelelő fixálása érdekében a fixálószert kellő mértékben kevergetni vagy keringetni kell. Az összes szövet legalább 48, legfeljebb 96 órán át Davidson-féle fixálószerben tartják, ezt követően ionmentesített vízben átmossák és 10 %-os semleges pufferelt formalinba helyezik őket (1) (29).

Pajzsmirigy szövetvizsgálata

47. A lárva szakaszból származó mintákon (fixált szöveteken) el kell végezni a pajzsmirigyek szövettani értékelését, vagyis diagnózist kell felállítani és meg kell határozni a súlyossági fokot (29) (30).



2. ábra: A LAGDA során a farok nélküli testhossz méréséhez használt jellemzők az NF szerinti 62. stádiumban a) és a növendék békáknál b). Az NF szerinti 62. stádium megállapításához használt jellemzők a): a fej a törzzsel megegyező szélességű, a szaglóideg hossza rövidebb a szaglógumó átmérőjénél (háti nézet), és a mellső végtagok a szívvel egy vonalban helyezkednek el (hasi nézet). A képek Nieuwkoop és Faber (1994) művéből származnak.

A lárvák kezelésének vége

48. Az ebihalak kezdeti számát figyelembe véve várhatóan az egyedek egy kisebb hányada nem fog normálisan fejlődni, és észszerű időn belül nem fejezi be az átalakulást (az NF szerinti 66. stádium). A kezelés lárva szakasza nem lépheti túl a 70 napot. Az ezen időszak végéig fennmaradó ebihalakat el kell altatni (lásd a 43. pontot), meg kell mérni nedves tömegüket és farok nélküli testhosszukat, Nieuwkoop és Faber, 1994 leírása szerint meg kell határozni stádiumukat, és fel kell jegyezni esetlegesen tapasztalt fejlődési rendellenességeiket.

Az NF szerinti 66. stádium utáni selejtezés

49. Az NF szerinti 66. stádiumtól (a farok teljes felszívódásától) tartályonként tíz egyed folytatja a vizsgálatot a kezelés végéig. Ezért miután valamennyi állat elérte az NF szerinti 66. stádiumot vagy 70 nap után (amelyik hamarabb bekövetkezik), selejtezést végeznek. Az NF szerinti 66. stádiumot elért állatok közül véletlenszerűen választják ki azokat, amelyek nem vesznek részt a további kezelésben.

50. Azokat az állatokat, amelyeket nem választják ki a vizsgálatban való további részvételre, elaltatják (lásd a 43. pontot). Minden állat esetében meghatározzák a fejlődési stádiumát, nedves tömegét és farok nélküli testhosszát (2b. ábra), továbbá makroszkópos boncolást végeznek rajtuk. Az ivarmirigy morfológiája alapján megállapított fenotípusos ivart – amely lehet nőstény, hím vagy meghatározhatatlan – feljegyzik.

Mintavétel növendék szakaszban

A növendék szakaszban végzett mintavétel sémája

51. A fennmaradó állatok kezelését folytatják a hígítóvizes kontroll (és/vagy oldószeres kontroll, ha végeztek ilyet) NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges, átlagos időtartamát követő 10 hétig. Az expozíciós időszak végén a fennmaradó állatokat (ismétlésenként legfeljebb 10 békát) elaltatják, majd a különböző végpontokat megmérik vagy értékelik és feljegyzik: (1) morfometria (testtömeg és testhossz), (2) fenotípusos/genotípusos ivararányok, (3) a máj tömege (hepato-szomatikus index), (4) kórszövettan (ivarmirigyek, reproduktív vezetékek, máj és vese), valamint opcionálisan (5) a vérplazma VTG-szintje.

A békák humánus elpusztítása

52. A növendék mintákat, az átalakuláson átesett békákat hasüregbe adott érzéstelenítő injekcióval – pl. 10 % MS-222-tartalmú, megfelelő foszfátpuffert tartalmazó oldat – elaltatják. A békákat azután lehet mintavételhez felhasználni, hogy elveszítették reakcióképességüket (általában a befecskendezés után kb. 2 perccel, ha 10 %-os MS-222-t használnak békánként 0,01 ml/g koncentrációban). Bár a növendék békákat be lehetne meríteni egy magasabb koncentrációjú érzéstelenítőbe (MS-222), a tapasztalat azt mutatja, hogy ezzel a módszerrel hosszabb ideig tart az érzéstelenítés, és ez az időtartam nem mindig megfelelő mintavételhez. A befecskendezés hatékony és gyors eutanáziát biztosít a mintavétel előtt. A mintavétel nem kezdhető meg az előtt, hogy ellenőrizték a békák reakcióhiányát, ezáltal biztosítható ugyanis, hogy az állatok ténylegesen halottak legyenek. Ha a békákon jelentős mértékű szenvedésre utaló jelek figyelhetők meg és elhullásközeli állapotban vannak (súlyosan szenvednek és az elhullásukat megbízhatóan előre lehet jelezni), az állatokat érzéstelleníteni kell és el kell altatni, és adatelemzés szempontjából mortalitásként kell kezelni. A betegség miatt elaltatott békákat fel kell jegyezni és fel kell tüntetni a jegyzőkönyvben. Attól függően, hogy a békákat a vizsgálat mely szakaszában altatják el, a békákon kórszövettani elemzést végezhetnek (a békákat fixálhatják az esetleges kórszövettani elemzéshez).

Morfometria (testtömeg és testhossz)

53. A nedves tömeget és farok nélküli testhosszt (2b. ábra) a lárva szakaszban zajló részmintavétellel azonos módon mérik.

A vérplazma VTG-szintje (választható)

54. A VTG egy széles körben elfogadott biomarker, amely ösztrogénhatású vegyi anyagokkal szembeni kitettség következtében jelenik meg. A LAGDA során a vérplazma VTG-szintje a növendék mintákban igény szerint mérhető (ez különösen a gyaníthatóan ösztrogén vizsgálati vegyi anyagok esetében lehet releváns).

55. Az elaltatott növendék hátsó végtagjait lemetszik, és a vért heparinnal kezelt kapilláriscsővel felfogják (bár alkalmasak lehetnek más vérvételi módszerek is, például a szívpunkció). A vért mikrocentrifuga csőbe töltik (pl. 1,5 ml mennyiségben) és a vérplazma kinyeréséhez centrifugálják. A plazmamintákat a VTG-szint megállapításáig −70 °C-on vagy alacsonyabb hőmérsékleten tárolják. A vérplazma VTG-koncentrációja mérhető enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálati (ELISA) eljárással (6. függelék) vagy egy alternatív módszerrel, például tömegspektrometriával (31). A nagyobb érzékenység miatt fajspecifikus ellenanyagok használata ajánlott.

Genetikai ivarmeghatározás

56. Az egyes növendék békák genetikai ivarának felmérése a Josimoto és munkatársai által kifejlesztett markereken alapul (11). A genetikai ivar meghatározásához a boncolás során eltávolított egyik hátsó végtag (vagy bármely más szövet) részét vagy egészét begyűjtik és egy mikrocentrifuga csőben tárolják (békák esetében bármely szövetből vehető szövetminta). A szövet a dezoxiribonukleinsav (DNS) izolálásig –20 °C-on vagy alacsonyabb hőmérsékleten tárolható. A DNS kereskedelmi forgalomban kapható kittekkel izolálható a szövetekből, a marker jelenlétének vagy hiányának elemzése pedig egy polimeráz láncreakciót (PCR) alkalmazó módszerrel végezhető el (5. függelék). A kontrollcsoportokban a növendékektől történő mintavétel időpontjában az állatok szövetminta alapján meghatározott ivara és genotípusa általában 95 % feletti egyezést mutat.

Szövetek gyűjtése és fixálása kórszövettani vizsgálathoz

57. Az utolsó mintavétel során a szövettani elemzéshez begyűjtik az ivarmirigyeket, a reproduktív vezetékeket, a vesét és a májat. A hasüreget felnyitják, a májat kimetszik és megmérik a tömegét. Ezt követően az alhasból óvatosan eltávolítják az emésztőszerveket (pl. a gyomrot, a beleket), így feltárulnak az ivarmirigyek, a vesék és a reproduktív vezetékek. Az ivarmirigyek jelentős morfológiai rendellenességeit fel kell jegyezni. Végül eltávolítják a hátsó végtagokat, ha a vérvételhez korábban még nem távolították el őket. A begyűjtött májat és a testet a helyükön hagyott ivarmirigyekkel haladéktalanul Davidson-féle fixálószerbe kell helyezni. Az edénybe helyezett fixálószer mennyisége legalább 10-szerese legyen a szövetek közelítőleges térfogatának. Az összes szövet legalább 48, legfeljebb 96 órán át Davidson-féle fixálószerben tartják, ezt követően ionmentesített vízben átmossák és 10 %-os semleges pufferelt formalinba helyezik őket (1) (29).

Kórszövettan

58. Az egyes növendékmintákon szövettani vizsgálatot végeznek az ivarmirigyek, a reproduktív vezetékek, a vese és a máj szövetein jelentkező kóros elváltozások megállapításához, vagyis diagnózist kell felállítani és meg kell határozni a súlyossági fokot (32). Az értékelés során meghatározzák az ivari fenotípust is (pl. petefészek, here, interszexualitás alapján), és az egyedek genetikai ivarát meghatározó mérésekkel együtt ezek a megfigyelések felhasználhatók a fenotípusos/genotípusos ivararányok kiszámításához.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Statisztikai elemzés

59. A LAGDA során három statisztikai elemzésnek alávetett adattípus keletkezik: (1) kvantitatív folytonos adatok (testtömeg, farok nélküli testhossz, máj szomatikus index, VTG), (2) a fejlődési ütemre vonatkozó, „eseményig eltelt időt” jelző adatok (vagyis a vizsgálat kezdetétől az NF szerinti 62. stádium eléréséig eltelt napok) és (3) a kórszövettani vizsgálatokból származó sorrendi adatok, azaz a súlyossági pontszámok és a fejlődési stádiumok.

60. Ajánlatos a vizsgálati tervet úgy kialakítani és olyan statisztikai vizsgálatot választani, hogy a biológiai szempontból fontos változásokat az olyan végpontokon, ahol megfigyelhető hatást nem okozó koncentrációt vagy ECx koncentrációt kell jelenteni, megfelelő statisztikai erővel lehessen észlelni. Az adatok (általában az ismétlések átlagán nyugvó) statisztikai elemzéséhez lehetőség szerint az „Aktuális megközelítések az ökotoxicitási adatok statisztikai elemzésében: alkalmazási útmutató” (33) című dokumentumban leírt eljárásokat kell követni. A vizsgálati módszer 7. függeléke tartalmazza a javasolt statisztikai elemzési folyamatábrát, és útmutatást nyújt az adatok kezeléséhez, valamint a LAGDA során alkalmazandó legmegfelelőbb statisztikai vizsgálat vagy modell kiválasztásához.

61. Mivel minden béka esetében meghatározzák a genotípusos ivart, a növendékmintákból nyert adatokat (pl. növekedés, máj szomatikus index) genotípusos ivaronként külön kell elemezni.

Adatelemzési szempontok

Érvénytelen ismétlések és kezelések használata

62. A nyilvánvaló toxicitásból, betegségből vagy technikai hibából fakadó túlzott mértékű mortalitás érvénytelenné teheti az ismétléseket és kezeléseket. Amennyiben valamely kezelés betegség vagy technikai hiba következtében érvénytelennél válik, legalább három – három érvényes ismétlést bevonó – kezelésnek rendelkezésre állnia az elemzéshez. Ha a legmagasabb dózisú kezelés(ek)nél nyilvánvaló toxicitás tapasztalható, az elemzéshez lehetőség szerint biztosítani kell legalább három, három érvényes ismétléssel rendelkező kezelési szintet (összhangban az OECD vizsgálati iránymutatásainak legnagyobb elviselhető koncentrációra vonatkozó megközelítésével (34)). A mortalitáson túl nyilvánvaló toxicitásra utaló jelek lehetnek a viselkedést érintő hatások (pl. az élőlény a víz felszínén lebeg, a tartály alján fekszik, fordítva vagy szabálytalanul úszik, nem emelkedik fel a felszínre), a morfológiai léziók (pl. haemorrhagiás léziók, hasi ödéma), illetve a normál táplálkozási válaszreakciók gátlása a kontrollállatokkal való kvalitatív összevetésben.

Oldószeres kontroll

63. Oldószer alkalmazása esetén a vizsgálat befejezésekor értékelni kell az oldószer lehetséges hatásait. Ezt az oldószeres kontrollcsoport és a hígítóvizes kontrollcsoport statisztikai összehasonlítása útján végzik el. A legfontosabb vizsgálandó végpontok az elemzés során a növekedés meghatározói (tömeg és hossz), mivel az általános toxicitás ezeket tudja befolyásolni. Ha statisztikailag szignifikáns különbségeket mutatnak ki a hígítóvizes és az oldószeres kontrollcsoportok között e végpontok tekintetében, a legjobb szakmai megítélés alapján kell dönteni arról, hogy érvénytelennek tekinthető-e a vizsgálat. Amennyiben a két kontroll között eltérések tapasztalhatók, a vegyi anyaggal végzett kezeléseket az oldószeres kontrollal kell összevetni, kivéve ha ismert, hogy a hígítóvízzel való összehasonlítást részesítik előnyben. Amennyiben a két kontrollcsoport között nincs statisztikailag szignifikáns különbség, ajánlatos a vizsgálati vegyi anyaggal végzett kezeléseket az összevont oldószeres és hígítóvizes kontrollcsoportokkal összevetni, kivéve ha ismert, hogy a hígítóvizes vagy az oldószeres kontrollcsoporttal való összehasonlítást részesítik előnyben.

Vizsgálati jegyzőkönyv

64. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag:

— fizikai jelleg és adott esetben a fizikai és kémiai tulajdonságok,

— Egy összetevőből álló anyag:

fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

kémiai azonosító adatok, például IUPAC- vagy CAS-név, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet, tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. (ideértve adott esetben a szervesszén-tartalmat).

— Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítójával (lásd fent), mennyiségi előfordulásával és releváns fizikai-kémiai tulajdonságaival jellemezve.

Vizsgálati fajok:

— tudományos név, törzs (ha meghatározható), forrás és a megtermékenyített peték begyűjtésének módja, valamint a későbbi kezelés;

— a gerincferdülés előfordulása az alkalmazott törzstenyészet dokumentált kontrolljaiban.

Vizsgálati körülmények:

— megvilágítási időszak(ok);

— vizsgálati terv (pl. a kamra mérete, az anyagok és a víz mennyisége, a vizsgálati kamrák és az ismétlések száma, a vizsgált élőlények létszáma az ismétlésekben);

— a törzsoldat elkészítésének módszere és a vízcsere gyakorisága (az esetleg használt diszpergálószer nevét és koncentrációját meg kell adni);

— a vizsgálati vegyi anyag adagolásának módszere (például szivattyú, hígítási rendszerek);

— a módszer visszanyerési hatékonysága és a névleges vizsgálati koncentrációk, a meghatározási határ, a mért értékek átlaga és szórása a vizsgálati edényekben, az ilyen adatok megszerzésének módszerei és bizonyítékok annak alátámasztására, hogy a mérések a valódi oldatban lévő vizsgálati vegyi anyag koncentrációszintjeire vonatkoznak;

— a hígítóvíz jellemzői: pH-érték, keménység, hőmérséklet, oldottoxigén-koncentráció, maradékklór-tartalom (amennyiben mérik), összes jód, teljes szervesszén-tartalom (amennyiben mérik), szuszpendált szilárd anyagok (amennyiben mérik), a vizsgálati közeg sótartalma (amennyiben mérik) és bármely más mérési adat;

— a névleges vizsgálati koncentrációk, a mért értékek átlaga és ezek standard deviációja;

— vízminőség a tesztedényekben: pH-érték, (napi) hőmérséklet és oldottoxigén-koncentráció;

— részletes információk a táplálékról (pl. a haltápok típusa, eredete, az adagolt mennyiség és az adagolás gyakorisága).

Eredmények:

— Bizonyíték arra, hogy a kontrollok teljesítették az érvényességi kritériumokat;

— a kontroll (és alkalmazása esetén az oldószeres kontroll) és a kezelt csoportok következő adatai: a megfigyelt mortalitás és rendellenességek, az NF szerinti 62. stádium eléréséig szükséges idő, a pajzsmirigy szövettani vizsgálata (csak a lárvamintáknál), növekedés (tömeg és hossz), máj szomatikus index (csak a növendékmintáknál), genetikai/fenotípusos ivararányok (csak a növendékmintáknál), az ivarmirigyek, a reproduktív vezetékek, a vese és a máj kórszövettani vizsgálatának eredményei (csak a növendékmintáknál) és a vérplazma VTG-szintje (csak a növendékmintáknál, ha végeztek ilyen mérést);

— a statisztikai elemzés és az adatok feldolgozása során alkalmazott megközelítés (az alkalmazott statisztikai vizsgálat vagy modell);

— megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC) minden egyes kiértékelt válaszreakcióra nézve;

— megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció (LOEC) minden egyes kiértékelt válaszreakcióra nézve ($\alpha = 0{,}05$ értéknél); ECx adott esetben minden egyes kiértékelt válaszreakcióra nézve, konfidencia-intervallumok (például 95 %) és a számításhoz használt illesztett modell grafikonja, a koncentráció–hatás görbe meredeksége, a regressziós modell egyenlete, a modell becsült paraméterei és a becslés standard hibái.

— a vizsgálati módszertől való eltérések, az elfogadhatósági kritériumoktól való eltérések, és a vizsgálat kimenetelére gyakorolt lehetséges hatásukkal kapcsolatos megfontolások.

65. A végpontmérések eredményeit illetően fel kell tüntetni az átlagértékeket és az azoktól való standard deviációt (lehetőség szerint az ismétlések és a koncentrációk alapján).

66. A kontrolloknál az NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges átlagos időtartamot az ismétlések átlaga és szórása alapján kell kiszámolni és bemutatni. Hasonlóképpen a kezelések esetén egy adott kezelés átlagát az ismétlések átlaga és szórása alapján kell kiszámolni és bemutatni.

SZAKIRODALOM

(1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.

(2) OECD (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 150) Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(3) Nieuwkoop PD and Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.

(4) Kloas W and Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1 130: 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: 1 565.

(7) Villalpando I and Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. International Journal of Developmental Biology 34: 281-285.

(8) Miyata S, Koike S and Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335-340.

(9) Mikamo K and Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.

(10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K and Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143-150.

(11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T and Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2 469-2 474.

(12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S and Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

(13) Tobias ml, Tomasson J and Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: 441-448.

(14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR and Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321-327.

(15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A and Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159-169.

(16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, USA.

(17) E melléklet C.4., Gyors biológiai lebonthatóság című fejezete.

(18) E melléklet C.29., Gyors biológiai lebonthatóság: szén-dioxid-vizsgálat légmentesen zárt edényekben (a gőztér CO_2-tartalmának vizsgálata) című fejezete.

(19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL and Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539-551.

(20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593-9.

(21) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 23), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69-92.

(23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, USA.

(24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84 pp.

(25) E melléklet C.38., Kétéltű-átalakulási vizsgálat című fejezete.

(26) E melléklet C.48., Halak rövid távú reprodukciós vizsgálata című fejezete.

(27) E melléklet C.41., Halak ivari fejlődésének vizsgálata című fejezete.

(28) E melléklet C.49., Halembriók akut toxicitási vizsgálata (FET) című fejezete.

(29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology.Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.

(31) Luna LG and Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.

(32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

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

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Apikális végpont: populációszintű hatás előidézése.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

ELISA: enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay).

ECx: (hatásos koncentráció x % hatás eléréséhez) az a koncentráció, amely valamely hatás x %-át okozza a vizsgálati szervezetekben egy adott expozíciós időn belül, a kontrollal összehasonlítva. Például az EC50 az a becsült koncentráció, amely a vizsgálat valamilyen végpontja tekintetében a kitett populáció 50 %-ában okoz hatást a meghatározott expozíciós idő alatt.

dpf: a megtermékenyítés utáni napok száma.

Átfolyásos vizsgálat: az expozíció során a vizsgálati oldat vizsgálati rendszeren történő folyamatos áramlása mellett folytatott vizsgálat.

HPG-tengely: hipotalamusz-hipofízis-gonád tengely.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (Elméleti és Alkalmazott Kémia Nemzetközi Uniója).

Megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció (LOEC): a vizsgálati vegyi anyag azon legalacsonyabb vizsgálati koncentrációja, amelynél a kontrollal összevetve még megfigyelhető a vegyi anyag statisztikailag szignifikáns hatása ($p < 0,05$). Azonban az LOEC-szint feletti valamennyi vizsgálati koncentrációnak olyan ártalmas hatást kell kifejtenie, amely legalább egyenlő az LOEC-szinten megfigyelttel vagy súlyosabb annál. Amennyiben e két feltétel nem teljesíthető, akkor kimerítő magyarázatot kell adni arra, hogy hogyan történt az LOEC (és ennélfogva az NOEC) kiválasztása. A 7. függelék útmutatást ad.

Medián letális koncentráció (LC50): a vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely a becslések szerint a vizsgálat időtartama alatt a vizsgálati szervezetek 50 %-ára nézve halálos.

Megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC): a közvetlenül az LOEC alatti vizsgálati koncentráció, amely – a kontrollcsoporttal való összevetésben – nem fejt ki statisztikailag szignifikáns hatást ($p < 0,05$) a meghatározott expozíciós időszak alatt.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification (molekulák egyszerűsített egy sorban történő beviteli rendszere).

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

UVCB: ismeretlen szerkezetű vagy változó összetételű, összetett reakcióban keletkezett vagy biológiai eredetű anyagok.

VTG: a vitellogenin a szikben található foszfo-, lipo- és glikoproteinek prekurzora, amely alapesetben az ikrarakó fajok szexuálisan aktív nőstényeiben fordul elő.

2. függelék

AZ ELFOGADHATÓ MINŐSÉGŰ HÍGÍTÓVÍZ NÉHÁNY FONTOSABB KÉMIAI TULAJDONSÁGA

Anyag	Határkoncentráció
Szálló por	5 mg/l
Teljes szervesszén-tartalom	2 mg/l
Nem ionizált ammónia	1 µg/l
Maradék klór	10 µg/l
Szerves foszfort tartalmazó növényvédő szerek összesen	50 ng/l
Szerves klórtartalmú peszticidek + poliklórozott bifenilek	50 ng/l
Összes szerves klór	25 ng/l
Alumínium	1 µg/l
Arzén	1 µg/l
Króm	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Réz	1 µg/l
Vas	1 µg/l
ólom	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Cink	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Higany	100 ng/l
Ezüst	100 ng/l

3. függelék

A LAGDA VIZSGÁLATI KÖRÜLMÉNYEI

1. A vizsgálathoz használt fajok	*Xenopus laevis*
2. A vizsgálat típusa	Folyamatos vízcserét biztosító átfolyásos rendszer.
3. Vízhőmérséklet	A névleges vízhőmérséklet 21 °C. A vizsgálat időtartama alatt az átlagos vízhőmérséklet 21 ±1 °C (az ismétlések és a kezelések közötti különbség nem haladhatja meg az 1,0 °C-ot).
4. A megvilágítás minősége	Fluoreszcens izzók (széles spektrum) 600–2 000 lux (lumen/m^2) a víz felszínén.
5. Megvilágítási időszak	12 óra fény, 12 óra sötét.
6. Vizsgálati oldat mennyisége és vizsgálati edény (tartály)	4–10 l (legalább 10–15 cm-es vízmélység). Üveg- vagy rozsdamentes acél tartály.
7. A vizsgálati oldatok térfogatának cseréje	Állandó, a biológiai körülmények fenntartása és a vegyi anyag koncentrációja szerint (pl. napi 5 térfogatcsere).
8. A vizsgált élőlények kora a vizsgálat kezdetén	Nieuwkoop és Faber (NF) szerinti 8–10. stádium.
9. Élőlények ismétlésenkénti száma	20 állat (embrió)/tartály (ismétlés) a kezelés elindításakor és 10 állat (növendék)/tartály (ismétlés) az NF szerinti 66. stádiumtól a kezelés végéig.
10. Kezelések száma	Legalább 4 vizsgálati vegyi anyaggal végzett kezelés plusz a megfelelő kontroll(ok).
11. Kezelésenkénti ismétlések száma	4 ismétlés a vizsgálati vegyi anyaggal végzett kezelések és 8 ismétlés a kontroll(ok) esetén.
12. Élőlények száma vizsgálati koncentrációként	Legalább 80 állat a vizsgálati vegyi anyaggal végzett kezelések és legalább 160 állat a kontroll(ok) esetén.
13. Hígítóvíz	Bármely víz, amely lehetővé teszi az *X. laevis* normál növekedését és fejlődését (pl. forrásvíz vagy aktív szénen szűrt csapvíz)
14. Levegőztetés	Nem szükséges, ha viszont az oldottoxigén-tartalom az ajánlott határértékek alá esik, és az áramoltatott vizsgálati oldatban maximális szinten van jelen, akkor szükség lehet a tartályok levegőztetésére.
15. A vizsgálati oldat oldottoxigén-tartalma	Oldott oxigén: a levegőtelítettségi érték legalább 40 %-a vagy legalább 3,5 mg/l

16. A vizsgálati oldat pH-értéke	6,5–8,5 (az ismétlések és a kezelések közötti különbség értéke nem haladhatja meg a 0,5-öt).
17. A vizsgálati oldat keménysége és lúgossága	10–250 mg $CaCO_3$/l
18. Etetési rend	(Lásd a 4. függeléket).
19. Expozíciós időtartam	Az NF szerinti 8–10. stádiumtól a vizes és/vagy oldószeres kontrollcsoportban az NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges átlagos időtartamot követő 10 hétig (legfeljebb 17 hét).
20. Biológiai végpontok	Mortalitás (és rendellenes külső megjelenés), az NF szerinti 62. stádium eléréséig szükséges idő (lárvamintáknál), a pajzsmirigy szövettani vizsgálata (lárvamintáknál), növekedés (tömeg és hossz), hepato-szomatikus index (növendékmintáknál), genetikai/fenotípusos ivararányok (növendékmintáknál), az ivarmirigyek, a reproduktív vezetékek, a vese és a máj kórszövettani eredményei (növendékmintáknál) és a vérplazma vitellogeninszintje (növendékmintáknál, választható).
21. A vizsgálat érvényességi kritériumai	Az oldott oxigén szintjének meg kell haladnia a levegőtelítettségi érték 40 %-át; az átlagos vízhőmérsékletnek a 21 ±1 °C-os tartományban kell lennie, az ismétlések és a kezelések közötti különbség nem haladja meg az 1,0 °C-ot; a vizsgálati oldat pH-értékének 6,5 és 8,5 között kell lennie; a kontrollok minden ismétlésében a mortalitás legfeljebb 20 %-os lehet és a kontrollnál az NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges átlagos időtartam legfeljebb 45 nap lehet; a kontrollokban és az oldószeres kontrollokban (ha végeztek ilyet) a vizsgált élőlények átlagos testtömegének az NF szerinti 62. stádiumban el kell érnie az 1,0 ±0,2 g-ot, a vizsgálat végén pedig a 11,5 ±3 g-ot; bizonyítékkal kell alátámasztani, hogy a vizsgálati vegyi anyag oldatban lévő koncentrációit az átlagos mért értékek ±20 %-os tartományán belül sikerült tartani.

4. függelék

ETETÉSI REND

Megjegyzendő, hogy bár ez az ajánlott etetési rend, alternatív megoldások is alkalmazhatók, amennyiben biztosítják a vizsgálati élőlények megfelelő ütemű növekedését és fejlődését.

A lárvák etetése

A lárvák táplálékának előkészítése

A. 1: 1 térfogatszázalék arányban ivadékindító pisztrángtáp: alga/TetraFin® (vagy ezzel egyenértékű táp);

1. Ivadékindító pisztrángtáp: turmixoljunk össze 50 g (apró szemcsés vagy porított) ivadékindító pisztrángtápot és 300 ml kellően átszűrt vizet 20 percen keresztül egy magas fokozatra állított turmixgépben.

2. Alga/TetraFin® (vagy ezzel egyenértékű) keverék: turmixoljunk össze 12 g spirulina algakorongot és 500 ml szűrt vizet 40 másodpercig egy magas fokozatra állított turmixgépben, turmixoljunk össze 12 g Tetrafin® (vagy ezzel egyenértékű) tápot 500 ml szűrt vízzel, majd a két keveréket összeöntve 1 liternyi 12 g/l spirulina algát és 12 g/l Tetrafin® (vagy ezzel egyenértékű) tápot tartalmazó keveréket kapunk.

3. Öntsünk össze azonos mennyiségű összeturmixolt ivadékindító pisztrángtápot és alga/TetraFin® (vagy ezzel egyenértékű) keveréket.

B. Sórák:

Keltessünk ki 15 ml sórákpetét 1 liter sós vízben (amelyet úgy készíthetünk el, hogy 1 liter ionmentesített vízhez hozzáadunk 20 ml NaCl-ot). Miután folyamatos világítás mellett szobahőmérsékleten 24 órán keresztül levegőztettük a vizet, begyűjthetjük a kikelt sórákokat. Ehhez 30 percre állítsuk le a levegőztetést, hogy a sórákok leülepedjenek az edény aljára. A sórákpeték edény tetején lebegő burkát leöntjük és eltávolítjuk, a sórákokat pedig a megfelelő szűrőkkel leszűrjük és 30 ml szűrt vízzel a felszínre hozzuk.

Etetési protokoll

Az 1. táblázat támpontot nyújt a kezelés lárva stádiumaiban használandó táplálék típusához és mennyiségéhez. Az állatokat hétfőtől péntekig napi három alkalommal, hétvégén napi egy alkalommal kell etetni.

1. táblázat

Átfolyásos körülmények között nevelt *X. laevis* lárvák etetési rendje

Időszak (*) (a megtermékenyítéstől számítva)	Ivadékindító pisztrángtáp: alga/TetraFin® (vagy ezzel egyenértékű táp)		Sórák	
	Hétköznap (napi 3 alkalommal)	Hétvégén (napi egy alkalommal)	Hétköznap (napi két alkalommal)	Hétvégén (napi egy alkalommal)
4–14. nap (0–1. hét)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (8–15. nap) 1 ml (a 16. naptól)	0,5 ml (8–15. nap) 1 ml (a 16. naptól)
2. hét	0,67 ml	2,4 ml		
3. hét	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
4. hét	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml

Időszak (*) (a megtermékenyítéstől számítva)	Ivadékindító pisztrángtáp: alga/TetraFin® (vagy ezzel egyenértékű táp)		Sórák	
	Hétköznap (napi 3 alkalommal)	Hétvégén (napi egy alkalommal)	Hétköznap (napi két alkalommal)	Hétvégén (napi egy alkalommal)
5. hét	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
6. hét	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
7. hét	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
(8–10. hét)	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) A 0. nap a hCG injekció beadásának napja.

Áttérés a lárvák táplálásáról a növendékek táplálására

Az átalakulás folyamata során a lárvák az alábbiakban ismertetett módon áttérnek a növedékek étrendjére. Az átmeneti időszak során a lárva táplálék csökkentésével párhuzamosan növelni kell a növendék táplálék mennyiségét. Ennek megvalósításához fokozatosan csökkentik a lárva táplálékot, miközben fokozatosan növelik a növendék táplálékot abban az időszakban, amikor az öt ebihalból álló egyes csoportok elhagyják az NF szerinti 62. stádiumot és közelednek az átalakulás NF szerinti 66. stádiumban bekövetkező végéhez.

A növendékek etetése

Növendékek étrendje

Az átalakulási fázis lezárultát követően (66. stádium) a táplálék kizárólag 3/32 hüvelykes prémium minőségű süllyedő békatápból (Xenopus Express™, FL, USA) vagy ezzel egyenértékű tápból áll.

Zúzott pelletek készítése a növendékké alakuló lárvák számára

A süllyedő békatáp pelletdarabjait rövid ideig kávédarálóban vagy turmixgépben őrlik, illetve mozsárban mozsártörővel apróra zúzzák, hogy a pelletek méretét körülbelül az 1/3-ára csökkentsék. A túl hosszú ideig való őrlés vagy zúzás poríthatja a pelleteket, amit el kell kerülni.

Etetési protokoll

A **2. táblázat** támpontot nyújt a növendék és a felnőtt életszakaszban használandó táplálék típusához és mennyiségéhez. Az állatokat naponta egyszer kell táplálni. Megjegyzendő, hogy az állatok az átalakulási időszak alatt továbbra is megkapják sórákadagjuk egy részét, amíg az állatok több mint 95 %-a át nem alakult.

A vizsgálat utolsó napján az állatokat már nem szabad etetni, hogy a táplálék ne befolyásolja a mért testtömeget.

2. táblázat

Átfolyásos körülmények között nevelt *X. laevis* növendékek etetési rendje. Fontos megjegyezni, hogy az át nem alakult állatok, köztük azok, amelyek átalakulását a vegyi anyaggal való kezelés késlelteti, nem tudják elfogyasztani a teljes méretű pelletdarabokat.

Időszak (*) (Az átlagos átalakulási nap utáni hetekben)	Zúzott pellet (mg/békaporonty)	Teljes méretű pellet (mg/békaporonty)
Az állatok átalakulási időszaka	25	0
0–1. hét	25	28
2–3. hét	0	110
4–5. hét	0	165
6–9. hét	0	220

(*) A 0. hét első napja a kontrollállatok átlagos átalakulási napja.

5. függelék

A GENETIKAI IVAR MEGHATÁROZÁSA (NEMEK GENETIKAI ÚTON TÖRTÉNŐ MEGHATÁROZÁSA)

A *Xenopus laevis* nemének genetikai úton történő meghatározása a Josimoto és munkatársai (2008) által kidolgozott módszeren alapul. A genotípus meghatározásának részletes eljárása igény szerint tanulmányozható ebben a publikációban. Alkalmasnak ítélt egyéb módszerek (pl. nagy áteresztőképességű kvantitatív polimeráz láncreakció) is használhatók.

X. laevis primerek

DM-W marker

Forward: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Reverse: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Pozitív kontroll

Forward: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Reverse: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

DNS-tisztítás

Az izom- vagy bőrszövetből a DNS tisztítható pl. Qiagen DNeasy Blood and Tissue kittel (kat.száma: 69 506) vagy hasonló termékkel, a kithez mellékelt útmutató alapján. Amennyiben a polimeráz láncreakcióhoz koncentráltabb mintákra van szükség, a DNS kevesebb puffer használatával is elulálható a forgóoszlopokból. A DNS meglehetősen stabil, ezért ügyelni kell arra, hogy elkerüljék a keresztszennyeződést, ami a hímek és a nőstények helytelen azonosításához vezethet.

Polimeráz láncreakció

Az **1. táblázat** ismerteti a Sigmától beszerezhető JumpStart^{TM}*Taq* használatán alapuló mintaprotokollt.

1. táblázat

A Sigmától beszerezhető JumpStart^{TM}*Taq* használatán alapuló mintaprotokoll

Reakciókeverék	1x (µl)	[Végső]
NFW (*)	11	—
10X puffer	2,0	—
$MgCl_2$ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP-k (egyenként 10 mM)	0,4	200 µM
Forw. primer markere (8 µM)	0,8	0,3 µM
Rev. primer markere (8 µM)	0,8	0,3 µM
Forw. primer kontrollja (8 µM)	0,8	0,3 µM
Rev. primer kontrollja (8 µM)	0,8	0,3 µM

Reakciókeverék	1x (µl)	[Végső]
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 egység/µl
DNS-templát	1,0	~200 pg/µl

(*) Nukleázmentes víz
Megjegyzés: A reakciókeverékek készítésekor érdemes plusz mennyiségről is gondoskodni, amivel pótolni lehet a pipettázás során bekövetkezett veszteséget (például: 24 reakcióhoz 25x-ös mennyiséget készíteni).

Reakció:

Reakciókeverék	19,0 µl
Templát	1,0 µl
Összesen	20,0 µl

Hőciklus profilja:

1. lépés	94 °C	1 min
2. lépés	94 °C	30 s
3. lépés	60 °C	30 s
4. lépés	72 °C	1 min
5. lépés	Térjen vissza a 2. lépéshez.	35 ciklus
6. lépés	72 °C	1 min
7. lépés	4 °C	tárolás

A polimeráz láncreakció termékei azonnal felhasználhatók gélben, vagy tárolhatók is 4 °C-on.

Agarózgél-elektroforézis (3 %) (mintaprotokoll)

50X TAE

Tris	24,2 g
Jégecet	5,71 ml
Na_2 (EDTA)·$2H_2O$	3,72 g

Vízzel egészítsük ki 100 ml-re

1X TAE

H_2O	392 ml
50X TAE	8 ml

3: 1 Agaróz

3 rész NuSieve™ GTG™ agaróz

1 rész alacsony elektroendozmózisú (EEO) Fisher agaróz

Elkészítési mód

1. 1,2 g agarózkeverék 43 ml 1X TAE-hez való hozzáadásával készítsünk egy 3 %-os gélt. Kavarással oldjuk fel a nagyobb csomókat.

2. A csomók teljes feloldásához mikrohullámban melegítsük az agarózkeveréket (forralni nem szabad). Hagyjuk kissé lehűlni a keveréket.

3. Adjunk hozzá 1,0 µl etídium-bromidot (10 mg/ml). Keverjük össze a lombik tartalmát. Az etídium-bromid mutagén hatású, ezért amennyiben technikailag megoldható, a dolgozókra leselkedő egészségügyi veszélyek minimalizálása érdekében ([1]) ebben a lépésben alternatív vegyi anyagokat kell használni.

4. Öntsük a gélt egy barázdált formába. Hagyjuk teljesen lehűlni.

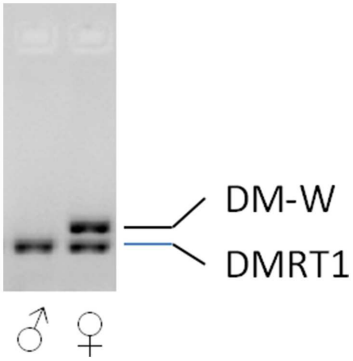
5. Öntsük bele a gélt a készülékbe. A gélre helyezzünk 1X TAE-t.

6. A polimeráz láncreakcióból származó termék minden 10 µl mennyiségéhez adjunk hozzá 1 µl 6x-os töltőfestéket.

7. Pipettával helyezzük a mintákat a barázdákba.

8. Végezzük el az elektroforézist 160 V állandó feszültségen mintegy 20 percig.

Az **1. ábrán** látható agaróz gél kép mutatja azokat a sávmintákat, amelyek jelzik a hím és a nőstény egyedek ivarát.



1. ábra: Agaróz gél kép, amely mutatja a hím (♂) egyedre jellemző sávmintát (egy sáv, ~203 bp: DMRT1) és a nőstény (♀) egyedre jellemző sávmintát (két sáv: ~259 bp: DM-W és 203 bp:DMRT1).

SZAKIRODALOM

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2 469-2 474.

([1]) A munkájuk során rákkeltő anyagokkal és mutagénekkel kapcsolatos kockázatoknak kitett munkavállalók védelméről szóló, 2004. április 29-i 2004/37/EK európai parlamenti és tanácsi irányelv (hatodik egyedi irányelv a 89/391/EGK tanácsi irányelv 16. cikkének (1) bekezdése értelmében) 4.1. cikke értelmében (HL L 158., 2004.4.30., 50. o.).

6. függelék

A VITELLOGENIN MÉRÉSE

A vitellogenin (VTG) mérése enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálati (ELISA) eljárással történik, amelyet eredetileg az amerikai cselle VTG mérésére fejlesztettek ki (Parks és munkatársai, 1999). Jelenleg kereskedelmi forgalomban nem kaphatók ellenanyagok az *X. laevis*-hez. Figyelembe véve azonban, hogy a VTG fehérjére vonatkozólag bőséges ismeretek állnak rendelkezésre és az ellenanyagok kereskedelmi forgalomban költséghatékonyan beszerezhetők, a laboratóriumok könnyen kidolgozhatnak egy ELISA-eljárást ehhez a méréshez (Olmstead és munkatársai, 2009). Szintén Olmstead és munkatársai (2009) közzétették a vizsgálat *X. tropicalis* VTG-szintjének mérésére alkalmas, alábbiakban ismertetett módosított változatát. A módszer az *X. tropicalis* VTG-vel szemben termelt ellenanyagot használ, amelyről ismert, hogy az *X. laevis* VTG-vel szemben is alkalmazható. Megjegyzendő, hogy nem kompetitív ELISA tesztek is használhatók, ugyanakkor ezek az alábbiakban ismertetett módszernél alacsonyabb kimutathatósági határértékekkel rendelkezhetnek.

Anyagok és reagensek

— Előadszorbeált 1. ellenanyag szérum

— Keverjünk össze 1 rész *X. tropicalis* VTG-vel szemben termelt 1. ellenanyag szérumot 2 rész kontrollhímből származó vérplazmával, hagyjuk a keveréket szobahőmérsékleten kb. 75 percig, helyezzük jégre 30 percig, centrifugáljuk 20000 x g-vel 1 órán keresztül 4 °C-on, távolítsuk el a felülúszót, osszuk szét alikvotokra és tároljuk –20 °C-on.

— 2. ellenanyag

— HRP-konjugált anti-nyúl kecske IgG (pl. Bio-Rad 172-1019)

— VTG szabvány

— tisztított *X. laevis* VTG 3,3 mg/ml.

— TMB (3,3',5,5' Tetrametil-benzidin) (pl. KPL 50-76-00; vagy Sigma T0440)

— Normál kecske szérum (NGS)(pl. Chemicon® S26-100 ml)

— 96 lyukú EIA polisztirol mikrotiterlemez (pl. ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher: 07-200-35)

— 37 °C hibridizáló inkubátor (vagy gyors légkiegyenlítő inkubátor) a lemezekhez, vízfürdő a csövekhez

— Egyéb szokásos laboratóriumi műszerek, vegyi anyagok és felszerelések.

Receptek

Felvivő puffer (50 mM karbonát puffer, pH 9,6):

$NaHCO_3$	1,26 g
Na_2CO_3	0,68 g
víz	428 ml

10X PBS (0,1 M foszfát, 1,5 M NaCl):

$NaH_2PO_4.H_2O$	0,83 g
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	20,1 g
NaCl	71 g
víz	810 ml

Mosópuffer (PBST):

10X PBS	100 ml
víz	900 ml

Állítsuk be a pH-t 7,3 értékre 1 M HCl-dal, majd adjunk hozzá 0,5 ml Tween-20-t

Vizsgálati puffer:

Normál kecske szérum (NGS)	3,75 ml
Mosópuffer	146,25 ml

Mintagyűjtés

A vért heparinnal kezelt mikrohematokrit csőbe gyűjtik és jégre helyezik. Miután 3 percen keresztül centrifugálták, a csövet értékelik, felnyitják és a vérplazmát 0,13 egység liofilizált aprotinint tartalmazó 0,6 ml-es mikrocentrifuga csövekbe töltik. (Ezeket a csöveket előre elkészítik: megtöltik a megfelelő mennyiségű aprotininnel, lefagyasztják, majd gyors vákuumszárítóban alacsony hőmérsékleten száradásig lipofiziálják.) A vérplazma az elemzésig –80 °C-on tárolható.

Eljárás egy lemezhez

Felvitel a lemezre

Keverjünk össze 20 µl tisztított VTG-t 22 ml karbonát pufferrel (3 µg/ml végső koncentrációban). Helyezzünk a keverékből 200 µl-t egy 96 lyukú lemez összes lyukába. Takarjuk le a lemezt tapadós zárófóliával, és inkubáljuk 2 órán keresztül 37 °C-on (vagy egy éjszakán keresztül 4 °C-on).

A lemez blokkolása

A blokkoló oldat elkészítéséhez adjunk hozzá 2 ml normál kecske szérumot (NGS) 38 ml karbonát pufferhez. Távolítsuk el a felvivő oldatot és a lemezt rázassuk szárazra. Minden lyukhoz adjunk hozzá 350 µl blokkoló oldatot. Takarjuk le a lemezt tapadós zárófóliával, és inkubáljuk 2 órán keresztül 37 °C-on (vagy egy éjszakán keresztül 4 °C-on).

A standardok elkészítése

Egy 12 x 75 mm-es, boroszilikát üvegből készült egyszer használatos kémcsőben keverjünk össze 5,8 µl tisztított VTG standardot 1,5 ml vizsgálati pufferrel. Ezzel egy 12 760 ng/ml koncentrációjú keveréket állítunk elő. Ezután hígítási sorozatot készítünk úgy, hogy az előző hígításból 750 µl mennyiséget hozzáadunk 750 µl mennyiségű vizsgálati pufferhez, így megkapjuk a következő végső koncentrációértékeket: 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 és 50 ng/ml.

A minták előkészítése

Elsőként hígítsuk a vérplazmát a vizsgálati pufferrel 1: 300 (pl. 1 µl plazma és 299 µl vizsgálati puffer összekeverésével) vagy 1: 30 arányban. Ha várhatólag nagy mennyiségű VTG-t kapunk, további vagy nagyobb arányú hígításokra lehet szükség. Törekedjünk arra, hogy a B/B_o belül maradjon a standardok tartományán. Azoknál a mintáknál, amelyeknél nem értékelhető a VTG-szint, pl. kontrollként szolgáló ivaréretlen hímeknél és nőstényeknél, érdemes 1: 30 arányú hígítást használni. Az ennél kisebb arányú hígítások esetén nem kívánt mátrixhatások léphetnek fel.

Emellett ajánlatos minden lemezzel párhuzamosan pozitív kontrollmintát futtatni. A kontrollminta olyan plazmaállományból származik, amely nagy mennyiségű indukált VTG-t tartalmaz. A plazmaállományt először normál kecske szérummal hígítják, alikvotokba osztják és −80 °C-on tárolják. Minden lemezhez felolvasztanak egy alikvotot, felhígítják a vizsgálati pufferrel és a vizsgálati mintával azonos körülmények között vizsgálják.

Inkubálás az 1. ellenanyaggal

Az 1. ellenanyag elkészítéshez az előadszorbeált 1. ellenanyag szérumot 1: 2000 arányban hígítják a vizsgálati pufferrel (pl. 8 µl mennyiséget hígítanak 16 ml vizsgálati pufferrel). Egy üveg csőben keverjünk össze 300 µl 1. ellenanyag oldatot 300 µl mintával/standarddal. Készítsük el hasonlóképpen a B_o csövet, 300 µl vizsgálati puffert összekeverve 300 µl ellenanyaggal. Ezenfelül egy normál kecske szérumot tartalmazó csövet is kell készítenünk, csak 600 µl vizsgálati pufferrel, vagyis ellenanyag nélkül. Fedjük le a csöveket Parafilm zárófóliával, majd örvénykeverővel óvatosan elegyítsük tartalmukat. Inkubáljuk a csöveket 37 °C-os vízfürdőben 1 órán keresztül.

A lemez mosása

Közvetlenül az 1. ellenanyag inkubálásának vége előtt mossuk ki a lemezt. Ehhez rázzuk ki a tartalmát és nedvszívó papírral töröljük szárazra. Ezt követően töltsük fel a lyukakat 350 µl mosóoldattal, majd öntsük ki az oldatot, és töröljük szárazra a lyukakat. Jó szolgálatot tehet egy többcsatornás ismétlőpipetta vagy lemezmosó. A mosási műveletet kétszer megismételjük, mert összesen háromszor kell kimosnunk a lemezt.

A lemez feltöltése

Miután elmostuk a lemezt, óvatosan távolítsuk el a csöveket a vízfürdőből és az örvénykeverőből. Minden mintát, standardot, B_o-t és NSB-t tartalmazó csőből öntsünk 200 µl-t a lemez két-két lyukába. Takarjuk le a lemezt tapadós zárófóliával, és inkubáljuk 1 órán keresztül 37 °C-on.

Inkubálás a 2. ellenanyaggal

Az előző lépésben végrehajtott inkubálás végén a lemezt a fentiekhez hasonlóan ismét háromszor el kell mosni. A 2. ellenanyag hígításához keverjünk össze 2,5 µl 2. ellenanyagot 50 ml vizsgálati pufferrel. A hígított 2. ellenanyagból töltsünk 200 µl-t az egyes lyukakba, majd a lemezt a fentiekben leírtak szerint zárjuk le és inkubáljuk 1 órán át 37 °C-on.

A szubsztrát hozzáadása

A 2. ellenanyag inkubálását követően mossuk ki háromszor a lemezt a fentiek szerint. Ezután minden lyukhoz adjunk hozzá 100 µl TMB szubszrátot. Ezt követően 10 percig hagyjuk a reakciót végbemenni, lehetőleg erős fénytől védett helyen. Majd 100 µl 1 M koncentrációjú foszforsav hozzáadásával állítsuk le a reakciót. Ezáltal a keverék színe kékről élénksárgára változik. Egy lemezleolvasóval mérjük meg az abszorbanciát 450 nm-en.

A B/B_o kiszámítása

Minden mérési eredményből vonjuk ki az NSB átlagértékét. Az egyes minták és standardok B/B_o arányának kiszámításához osszuk el az abszorbancia értékét (B) a B_o minta átlagos abszorbanciájával.

A standard görbe létrehozása és az ismeretlen mennyiségek meghatározása

Számítógépes grafikai szoftver (pl. Slidewrite™ vagy Sigma Plot®) segítségével hozzunk létre egy standard görbét, amely a standardok B/B_o aránya alapján extrapolálja a minta B/B_o arányából származó mennyiséget. A szóban forgó mennyiség jellemzően egy logaritmikus skálán jelenik meg, a görbe pedig szigmoid formájú. A standardok szűk tartománya esetén azonban a görbe lineáris formát vehet fel. Igazítsuk ki a mintára kapott mennyiséget a hígítási tényezővel, és mg VTG/ml plazma arányban tüntessük fel a jelentésben.

A minimális kimutathatósági határértékek (MDL) megállapítása

Különösen a normál fejlődésű hímeknél gyakran nem világos, hogyan szerepeljenek a jelentésben az alacsony értékekből származó eredmények. Ilyen esetben a 95 %-os „konfidenciahatárok” alkalmazásával kell meghatározni, hogy az értéket nullaként vagy valamely más számként kell-e feltüntetni. Amennyiben a minta eredménye a nulla standard (B_o) konfidenciaintervallumán belül van, akkor az értéket nullaként kell feltüntetni. A minimális kimutathatósági szint az a legalacsonyabb standard, amelyik következetesen eltér a nulla standardtól; vagyis a két konfidenciaintervallum között nincs átfedés. A minta azon eredményei esetében, amelyek a minimális kimutathatósági szint konfidenciahatárán belül vagy azon felül helyezkednek el, a kiszámított értéket kell feltüntetni a jelentésben. Ha pedig a minta eredménye a nulla standard és a minimális kimutathatósági szint konfidenciaintervallumai közé esik, az adott minta értéke a minimális kimutathatósági szint feleként kerül bele a jelentésbe.

SZAKIRODALOM

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

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 123: 113-125.

7. függelék

STATISZTIKAI ELEMZÉS

A LAGDA során három statisztikai elemzésnek alávetett adattípus keletkezik: (1) kvantitatív folytonos adatok, (2) a fejlődési ütemre vonatkozó, „eseményig eltelt időt" jelző adatok (az NF szerinti 62. stádium eléréséig eltelt idő) és (3) a kórszövettani vizsgálatokból származó sorrendi adatok, azaz a súlyossági pontszámok és a fejlődési stádiumok. Az 1. ábrán látható a LAGDA javasolt statisztikai elemzési folyamatábrája. Az alábbi rész pedig néhány magyarázattal szolgál, amelyek szükségesek lehetnek a LAGDA mérési eredményeinek statisztikai elemzéséhez. Az elemzési folyamatábra alapján a mortalitás, a növekedés (testtömeg és testhossz) és a hepato-szomatikus index (LSI) mérési eredményeit a „Más végpontok" elágazás szerint kell elemezni.

Folytonos adatok

A folytonos végpontokra vonatkozó adatok esetében először ellenőrzik a monotonitást, ehhez rangsorba rendezik az adatokat, beillesztik őket egy ANOVA-modellbe, majd összevetik a lineáris és kvadratikus kontrasztokat. Monoton jellegű adatoknál egy lefelé lépegető Jonckheere–Terpstra-féle trendpróbát kell végezni az ismétlések középértékein, és további elemzésekre nincs szükség. A normál eloszlású, homogén szórással rendelkező adatok elemezhetők a lefelé lépegető Williams-próbával is. Ha azonban az adatok nem monoton jellegűek (vagyis a kvadratikus kontraszt szignifikáns, a lineáris kontraszt pedig nem az), akkor elemzésükhöz kombinált hatásokat mérő ANOVA-modellt kell használni. Ezt követően meg kell vizsgálni az adatok normalitását (lehetőleg a Shapiro–Wilk- vagy az Anderson–Darling-próba alkalmazásával) és szóráshomogenitását (lehetőleg a Levene-féle próba használatával). Mindkét próbát a kombinált hatásokat mérő ANOVA-modell maradékain végzik. Ezeket a formális normalitási és szóráshomogenitási próbákat a szakértői megítélés is helyettesítheti, de a formális próbákat kell előnyben részesíteni. Ha az adatok normál eloszlásúak homogén szórással, akkor a kombinált hatásokat mérő ANOVA feltételezései beigazolódnak, és a szignifikáns kezelési hatást a Dunnett-féle próbával határozzák meg. Normálistól eltérő eloszlás vagy szórásheterogenitás esetén a Dunnett-féle próba feltételezései nem teljesülnek, és normalizáló vagy szórásstabilizáló transzformációt kell keresni. Ha nem találnak ilyen transzformációt, a szignifikáns kezelési hatást a Dunn-féle próbával határozzák meg. A lehetőségekhez mérten nem kétoldalú, hanem egyoldalú vizsgálatot kell végezni, de szakértői megítélés alapján kell dönteni arról, hogy egy adott végpont esetén melyik vizsgálat a helyénvaló.

Mortalitás

A mortalitási adatokat a vizsgálat teljes időtartamára vonatkozólag elemezni kell, és a mortalitást az egyes tartályokban elpusztult állatok arányában kell kifejezni. Azoknak az ebihalaknak az adatait, amelyek nem alakultak át teljesen az adott időkereten belül, illetve amelyeket felhasználtak a lárva szakaszban zajló mintavételhez, továbbá a kiselejtezett növendék békák és a kísérletet végző személy hibájából elpusztult állatok adatait cenzúrázott adatoknak kell tekinteni, és figyelmen kívül kell hagyni az arányszám nevezőjének meghatározásakor. Mielőtt statisztikai elemzésekre kerülne sor, a mortalitási arányszámokon négyzetgyök arkusz transzformációt kell végezni. Alternatív megoldásként a lefelé lépegető Cochran–Armitage-féle próba használható, ha az eloszlás túlbecsült, akkor lehetőleg annak Rao–Scott-féle módosítását kell alkalmazni.

Testtömeg és testhossz (növekedési adatok)

Mivel az átalakulás során a hímek és a nőstények nem mutatnak ivari kétalakúságot, a lárva részminták növekedési adatait ivartól függetlenül elemzik. A növendékek növekedési adatait azonban genetikai ivar szerint elkülönítve kell elemezni. Előfordulhat, hogy e végpontok adatain logaritmus transzformációt kell alkalmazni, miután a méretre vonatkozó adatok eloszlása gyakran követi a lognormális eloszlást.

Hepato-szomatikus index (LSI)

A máj tömegére vonatkozó adatokat a teljes testtömeg arányához viszonyítva normalizálni kell (vagyis meg kell határozni az LSI-t), és genetikai ivar szerint elkülönítve kell elemezni.

Az NF szerinti 62. stádiumig eltelt idő

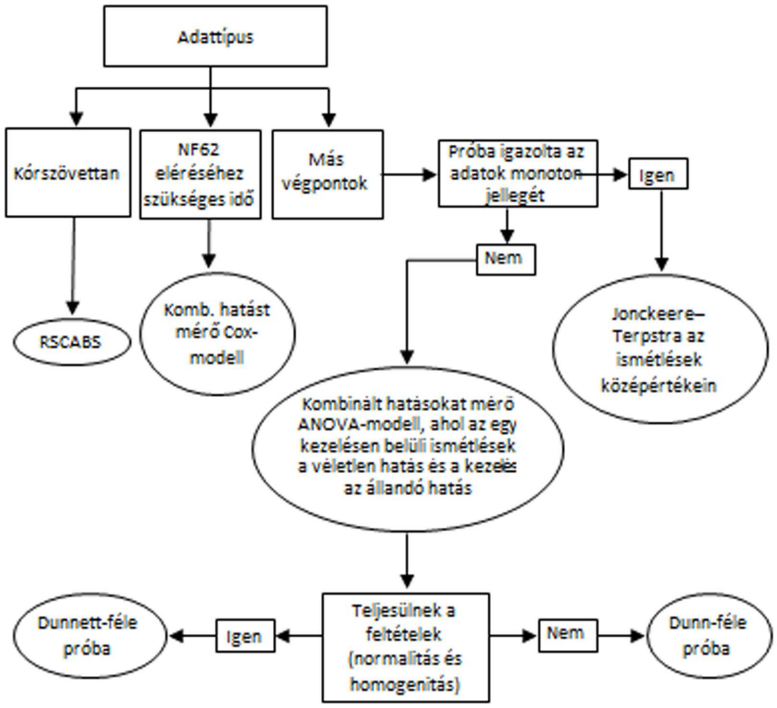
Az átalakulásig eltelt időre vonatkozó adatokat „eseményig eltelt időt" jelző adatként kell kezelni, és az elemzésből ki kell zárni az elhullott, valamint azon egyedek adatait, amelyek nem érték el 70 napon belül az NF szerinti 62. stádiumot (ezek a felső határt túllépő adatok, vagyis a valós érték nagyobb mint 70 nap, de a vizsgálat véget ér, mielőtt az állat 70 napon belül elérte volna az NF szerinti 62. stádiumot). A vizsgálat lezárásának napját a hígítóvizes kontrollokban az NF szerinti 62. stádium (vagyis az átalakulás végének) eléréséhez szükséges átlagos időtartam alapján kell meghatározni. A teljes átalakuláshoz szükséges átlagos időtartam megállapítható a terméket és határértéket vizsgáló Kaplan–Meierx becsléssel. Ezeket a végpontokat a kombinált hatásokat mérő Cox-féle arányos kockázati modellel kell elemezni, amely figyelembe veszi a vizsgálat ismétléseinek számát.

Kórszövettani adatok (súlyossági pontszámok és a fejlődési stádiumok)

Kórszövettani adatok súlyossági pontszámok vagy fejlődési stádiumok formájában állnak rendelkezésre. Az úgynevezett RSCABS (Rao–Scott Cochran–Armitage by Slices) próba a Cochran–Armitage-féle trendpróba Rao–Scott-féle lefelé lépegető módosítását alkalmazza a kórszövettani válaszreakció minden súlyossági szintjén (Green és munkatársai, 2014). A Rao–Scott-féle módosítás a próba során figyelembe veszi az edények (ismétlések) kísérleti kialakítását. A „by Slices" eljárás számításba veszi azt a biológiai elvárást, hogy a dózisok vagy koncentrációk növelésével párhuzamosan nő a hatás súlyossága, ugyanakkor megtartja az egyedi pontszámokat és meghatározza a kimutatott hatások súlyosságát. Az RSCABS eljárás nem csupán azt határozza meg, hogy melyik kezelés különbözik statisztikailag a kontrolloktól, (vagyis melyik mutat súlyosabb patológiai elváltozásokat, mint a kontrollok), hanem azt is megállapítja, hogy melyik súlyossági pontszámnál fordul elő eltérés, újabb összefüggéseket tárva fel az elemzés számára. Az ivarmirigyek és a reproduktív vezetékek fejlődési stádiumba sorolása tekintetében az adatok további feldolgozására van szükség, mivel az RSCABS egyik feltételezése, hogy a dózissal párhuzamosan nő a hatás súlyossága. A megfigyelt hatás a késleltetett vagy a felgyorsult fejlődés. Ezért a fejlődési stádiumba sorolásra vonatkozó adatok elemezhetők a jelentés szerint a felgyorsult fejlődés észleléséhez, majd a második, a késleltetett fejlődés detektálásához manuálisan invertálni kell az adatokat.

1. ábra

A LAGDA során nyert adatok statisztikai elemzésének folyamatábrája.



SZAKIRODALOM

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33: 1 108-1 116.

8. függelék

SZEMPONTOK A GERINCFERDÜLÉS ELŐFORDULÁSÁNAK NYOMON KÖVETÉSÉHEZ ÉS MINIMALIZÁLÁSÁHOZ

Az idiopátiás gerincferdülés, amely a *Xenopus laevis* ebihalaknál többnyire a farok elhajlásában nyilvánul meg, megnehezítheti a vizsgált populáció morfológiájának és viselkedésének megfigyelését. Erőfeszítéseket kell tenni annak érdekében, hogy mind a törzsállományban, mint a vizsgálati körülmények közepette minimalizálják vagy teljesen visszaszorítsák a gerincferdülés előfordulását. A végleges vizsgálat során ajánlatos a mérsékelt és a súlyos gerincferdülés gyakoriságát 10 % alatt tartani, hogy a vizsgálat megbízhatóbban észlelje a kezeléssel összefüggő fejlődési hatásokat az egyébként egészséges kétéltű lárvákban.

A végleges vizsgálat alatt tett napi megfigyelések során fel kell jegyezni az észlelt gerincferdüléses esetek előfordulását (egyedenként számlálva) és súlyosságát. A rendellenesség természetét jellemezni kell előfordulási helyével (pl. a farok elülső vagy hátsó vége) és a görbület irányával (laterális vagy dorziventrális). A súlyosság osztályozható az alábbiak szerint:

(NR) Nem észrevehető: nem látható görbület

1. Enyhe:: csekély mértékű, laterális görbület a farok hátsó részén; csak nyugalmi állapotban észlelhető.

2 Mérsékelt: .laterális görbület a farok hátsó részén; mindenkor észlelhető, de nem akadályozza a mozgást

3. Súlyos:
laterális görbület a farok elülső részén; VAGY a mozgást akadályozó bármely görbület; VAGY bármely dorziventrális görbület

Az US EPA FIFRA Tudományos Tanácsadó Testülete (FIFRA SAP 2013) áttekintette tizenöt, (NF szerinti 51–60+ stádiumban lévő) *X. laevis* egyedeken lefolytatott kétéltű-átalakulási vizsgálatból származó, gerincferdülésre vonatkozó összefoglaló adatokat, és általános ajánlásokat fogalmazott meg arra nézve, hogyan lehet csökkenteni e rendellenesség előfordulását a vizsgált populációban. Az ajánlások a LAGDA szempontjából is relevánsak, bár ez a vizsgálat hosszabb fejlődési szakaszt foglal magában.

Korábbi ívási teljesítmény

Általános elvként jó minőségű, egészséges felnőttekből kell kialakítani a tenyészpárokat; a gerincferdüléses utódokat termelő tenyészpárok eltávolítása minimalizálhatja a gerincferdülés későbbi előfordulását. Kifejezetten a vadon befogott tenyészállomány használatának visszaszorítása bizonyulhat előnyösnek. A LAGDA expozíciós időszaka az NF szerinti 8–10. stádiumban lévő embriókkal veszi kezdetét, és a vizsgálat elején nem állapítható meg, hogy az adott egyedeknél előfordul-e majd gerincferdülés. Amellett tehát, hogy a vizsgálatba felvett állatoknál nyomon követik a gerincferdülés előfordulását, dokumentálni kell a generáció korábbi teljesítményét is (azon belül a gerincferdülés fejlődő lárváknál tapasztalt gyakoriságát). Hasznos lehet az egyes generációk vizsgálatból kimaradt egyedeinek további nyomon követése, és a megfigyelések belefoglalása a jelentésbe (FIFRA SAP 2013).

Vízminőség

Fontos biztosítani a megfelelő vízminőséget, a laboratóriumi törzsállományban és a vizsgálat alatt egyaránt. A vízi toxicitási vizsgálatokban rutinszerűen értékelt vízminőségi kritériumokon túl hasznos lehet nyomon követni és kiküszöbölni a tápanyaghiányt (pl. a C-vitamin, a kalcium és a foszfor hiányát), valamint a szelén és a réz túlzott előfordulását, ami a beszámolók szerint különböző súlyosságú gerincferdülést okozott a laboratóriumban nevelt *Rana* sp. és *Xenopus* sp. fajoknál (Marshall és munkatársai 1980; Leibovitz és munkatársai 1992; Martinez és munkatársai 1992; a FIFRA SAP 2013 jelentése szerint). A megfelelő étrend biztosítása (lásd a 4. függeléket) és a tartály rendszeres tisztítása általában javítja a vízminőséget és a vizsgált egyedek egészségét.

Étrend

A 4. függelék részletesen ismerteti a LAGDA során sikeresnek bizonyult étrendre vonatkozó konkrét ajánlásokat. Javasolt ellenőrizni, hogy a táplálékforrások nem tartalmaznak-e biotoxinokat, gyomirtó szereket és egyéb növényvédő szereket, amelyről ismert, hogy az *X. laevis* egyedekben és más vízi állatokban gerincferdülést okoznak (Schlenk és Jenkins 2013). Bizonyos kolinészteráz-gátlókkal szembeni kitettséget például összefüggésbe hozták a halaknál (Schultz és munkatársai 1985) és a békáknál (Bacchetta és munkatársai 2008) megfigyelt gerincferdüléssel.

SZAKIRODALOM

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

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

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

Marshall, G.A., R.L. Amborski, and D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. Journal of the World Aquaculture Society 11: 445-453.

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

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

ISSN 1977-0731 (elektronikus kiadás)
ISSN 1725-5090 (nyomtatott kiadás)

Az Európai Unió Kiadóhivatala
L-2985 Luxembourg
LUXEMBURG

HU