

II

(Akty o charakterze nieustawodawczym)

ROZPORZĄDZENIA

ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (UE) 2017/735

z dnia 14 lutego 2017 r.

zmieniające, w celu dostosowania do postępu technicznego, załącznik do rozporządzenia (WE) nr 440/2008 ustalającego metody badań zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH)

(Tekst mający znaczenie dla EOG)

KOMISJA EUROPEJSKA,

uwzględniając Traktat o funkcjonowaniu Unii Europejskiej,

uwzględniając rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 18 grudnia 2006 r. w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH) i utworzenia Europejskiej Agencji Chemikaliów, zmieniające dyrektywę 1999/45/WE oraz uchylające rozporządzenie Rady (EWG) nr 793/93 i rozporządzenie Komisji (WE) nr 1488/94, jak również dyrektywę Rady 76/769/EWG i dyrektywy Komisji 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/WE i 2000/21/WE⁽¹⁾, w szczególności jego art. 13 ust. 2,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) Rozporządzenie Komisji (WE) nr 440/2008⁽²⁾ zawiera metody badań służące określeniu właściwości fizykochemicznych, toksyczności oraz ekotoksyczności substancji chemicznych, które to metody należy stosować do celów rozporządzenia (WE) nr 1907/2006.
- (2) Należy uaktualnić rozporządzenie (WE) nr 440/2008 w celu uwzględnienia nowych i zaktualizowanych metod badawczych przyjętych niedawno przez Organizację Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD), w celu uwzględnienia postępu technicznego oraz zmniejszenia liczby zwierząt wykorzystywanych do celów doświadczalnych zgodnie z dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE⁽³⁾. Projekt ten był przedmiotem konsultacji z zainteresowanymi stronami.
- (3) Proces dostosowania do postępu technicznego obejmuje dwadzieścia metod badawczych: jedną nową metodę oznaczania właściwości fizykochemicznych, pięć nowych metod badawczych i jedną zaktualizowaną metodę badawczą na potrzeby oceny ekotoksyczności, dwie zaktualizowane metody badawcze na potrzeby oceny losów i zachowania się w środowisku oraz cztery nowe metody badawcze i siedem zaktualizowanych metod badawczych na potrzeby ustalania skutków dla zdrowia ludzkiego.
- (4) OECD dokonuje regularnych przeglądów swoich wytycznych dotyczących badań, aby identyfikować te metody badawcze, które są przestarzałe z naukowego punktu widzenia. W niniejszym dostosowaniu do postępu technicznego usuwa się sześć metod badawczych, w odniesieniu do których anulowano odpowiednie wytyczne OECD dotyczące badań.

⁽¹⁾ Dz.U. L 396 z 30.12.2006, s. 1.

⁽²⁾ Rozporządzenie Komisji (WE) nr 440/2008 z dnia 30 maja 2008 r. ustalające metody badań zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH) (Dz.U. L 142 z 31.5.2008, s. 1).

⁽³⁾ Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (Dz.U. L 276 z 20.10.2010, s. 33).

- (5) Należy zatem odpowiednio zmienić rozporządzenie (WE) nr 440/2008.
- (6) Środki przewidziane w niniejszym rozporządzeniu są zgodne z opinią komitetu ustanowionego na mocy art. 133 rozporządzenia (WE) nr 1907/2006,

PRZYJMUJE NINIEJSZE ROZPORZĄDZENIE:

Artykuł 1

W załączniku do rozporządzenia (WE) nr 440/2008 wprowadza się zmiany zgodnie z załącznikiem do niniejszego rozporządzenia.

Artykuł 2

Niniejsze rozporządzenie wchodzi w życie dwudziestego dnia po jego opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej*.

Niniejsze rozporządzenie wiąże w całości i jest bezpośrednio stosowane we wszystkich państwach członkowskich.

Sporządzono w Brukseli dnia 14 lutego 2017 r.

W imieniu Komisji
Jean-Claude JUNCKER
Przewodniczący

ZAŁĄCZNIK

W załączniku do rozporządzenia (WE) nr 440/2008 wprowadza się następujące zmiany:

1) w części A dodaje się rozdział w brzmieniu:

„A.25 STAŁE DYSOCJACJI W WODZIE (METODA MIARECZKOWA – METODA SPEKTROFOTOMETRYCZNA – METODA KONDUKTOMETRYCZNA)

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 112 (1981).

Warunki wstępne

- odpowiednia metoda analityczna;
- rozpuszczalność w wodzie.

Wytyczne

- wzór strukturalny;
- przewodność elektryczna dla metody konduktometrycznej.

Oświadczenia kwalifikujące

- wszystkie metody badawcze można przeprowadzić na substancjach czystych lub substancjach o jakości handlowej. Należy rozważyć ewentualny wpływ zanieczyszczeń na wyniki;
- metoda miareczkowa nie jest odpowiednia w przypadku substancji o niskiej rozpuszczalności (zob. poniższa sekcja poświęcona roztworom do badań);
- metodę spektrofotometryczną stosuje się wyłącznie w odniesieniu do substancji o znacząco różniących się widmach absorpcyjnych UV/VIS dla form zdysocjowanych i niezdisocjowanych. Metoda ta jest również odpowiednia w przypadku substancji o niskiej rozpuszczalności i w przypadku dysocjacji bez użycia kwasów / z użyciem zasad, np. tworzenia kompleksów;
- w sytuacjach, w których ma zastosowanie równanie Onsagera, można wykorzystać metodę konduktometryczną nawet przy umiarkowanie niskich stężeniach i nawet w przypadkach równowagi niekwasowej/zasadowej.

Dokumenty standardowe

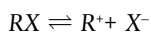
Niniejsza metoda badawcza opiera się na metodach podanych w źródłach wymienionych w sekcji „Bibliografia” oraz na wstępnym projekcie wytycznych dotyczących zgłoszenia przedprodukcyjnego EPA z 18 sierpnia 1978 r.

METODA – WPROWADZENIE, CEL, ZAKRES, ISTOTNOŚĆ, ZASTOSOWANIE I OGRANICZENIA BADANIA

Dysocjacja substancji w wodzie ma znaczenie dla oceny jej wpływu na środowisko. Określa ona formę substancji, która z kolei determinuje jej zachowanie i transport. Może wpływać na adsorpcję substancji chemicznej na glebach i osadach oraz absorpcję w komórkach biologicznych.

Definicje i jednostki

Dysocjacja to odwracalny proces rozpadu na co najmniej dwa związki chemiczne, które mogą być jonowe. Proces oznacza się na ogół za pomocą wzoru:



a stała równowagi stężenia determinująca reakcję to:

$$K = \frac{[R^+][X^-]}{[RX]}$$

Na przykład w sytuacji gdy R oznacza wodor (substancja jest kwasem), stała wynosi:

$$K_a = [H^+] \cdot \frac{[X^-]}{[HX]}$$

lub

$$pK_a = pH - \log \frac{[X^-]}{[HX]}$$

Substancje odniesienia

Poniższe substancje odniesienia nie muszą być stosowane za każdym razem, gdy badana jest nowa substancja. Podaje się je przede wszystkim w tym celu, aby okresowo można było wykonać wzorcowanie metody oraz aby umożliwić porównanie wyników w przypadku zastosowania innej metody.

	pK _a (1)	Temp. w °C
p-Nitrofenol	7,15	251
Kwas benzoesowy	4,12	20
p-Chloroanilina	3,93	20

(1) Nie są dostępne żadne wartości dla temperatury 20 °C, można jednak przyjąć, że zmienność wyników pomiarów jest wyższa niż oczekiwana zależność od temperatury.

Korzystne byłoby zastosowanie substancji z kilkoma pK, jak wskazano w przedstawionej poniżej zasadzie metody. Taką substancją mogłby być:

Kwas cytrynowy	pK _a (8)	Temp. w °C
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Zasada metody badawczej

Opisany proces chemiczny jest na ogół tylko nieznacznie zależny od temperatury w zakresie temperatur występujących w środowisku naturalnym. Do wyznaczenia stałej dysocjacji wymagany jest pomiar stężeń zdysocjowanych i niezdisocjowanych form substancji chemicznej. Korzystając z wiedzy o stechiometrii reakcji dysocjacji, o której mowa w sekcji „Definicje i jednostki” powyżej, można wyznaczyć odpowiednią stałą. W konkretnym przypadku opisanym w niniejszej metodzie badawczej substancja zachowuje się jak kwas albo zasada, a najlepszym sposobem na wyznaczenie jest określenie odpowiednich stężeń zjonizowanych i niezjonizowanych form substancji oraz pH roztworu. Zależność między tymi terminami przedstawiono na równaniu dla pK_a w sekcji „Definicje i jednostki” powyżej. Niektóre substancje wykazują więcej niż jedną stałą dysocjacji i możliwe jest opracowanie podobnych równań. Niektóre z metod opisanych w niniejszym dokumencie można również zastosować w odniesieniu do dysocjacji bez użycia kwasów / z użyciem zasad.

Kryteria jakości

Powtarzalność

Stała dysocjacji powinna być powtarzana (minimum trzy oznaczenia) w zakresie ± 0,1 jednostek logarytmicznych.

OPIS PROCEDUR BADAWCZYCH

Istnieją dwa podstawowe podejścia do wyznaczania pK_a . Jedno polega na miareczkowaniu znanej ilości substancji odpowiednio mianowanym roztworem kwasu lub mianowanym roztworem zasady; drugie polega na określeniu względnego stężenia zjonizowanych i niezjonizowanych form oraz jego zależności od pH.

Przygotowania

Metody oparte na tych zasadach można zaklasyfikować jako procedury miareczkowe, spektrofotometryczne i konduktometryczne.

Roztwory do badań

W przypadku metody miareczkowej i metody konduktometrycznej substancję chemiczną należy rozpuścić w wodzie destylowanej. W przypadku metody spektrofotometrycznej i innych metod stosuje się roztwory buforowe. Stężenie substancji badanej nie powinno przekraczać niższej spośród następujących wartości: 0,01 M albo połowy stężenia w stanie nasycenia, a do sporządzania roztworów należy stosować najczystsza dostępną formę substancji. Jeżeli substancja jest tylko częściowo rozpuszczalna, można ją rozpuścić w niewielkiej ilości rozpuszczalnika mieszalnego z wodą przed dodaniem do wskazanych powyżej stężeń.

Roztwory należy sprawdzić pod kątem obecności emulsji za pomocą stożka Tyndalla, zwłaszcza jeżeli w celu zwiększenia rozpuszczalności użyto współrozpuszczalnika. W przypadku stosowania roztworów buforowych stężenie buforowe nie powinno przekraczać 0,05 M.

Warunki badania

Temperatura

Należy wyregulować temperaturę do co najmniej ± 1 °C. Preferowana temperatura oznaczenia wynosi 20 °C.

Jeżeli podejrzewa się znaczną zależność od temperatury, oznaczenia należy dokonywać w co najmniej dwóch różnych temperaturach. W takim przypadku temperaturę należy ustawić w odstępach co 10 °C, a regulacja temperatury powinna wynosić $\pm 0,1$ °C.

Analizy

Zastosowana metoda będzie zależała od charakteru badanej substancji. Musi ona być na tyle czuła, aby umożliwić oznaczenie różnych gatunków przy każdym stężeniu roztworu do badań.

Przeprowadzenie badania

Metoda miareczkowa

Roztwór do badań określa się poprzez miareczkowanie odpowiednio mianowanym roztworem zasady lub kwasu, mierząc pH po każdym dodaniu titrantu. Należy przyrostowo dodać titrant co najmniej 10 razy przed osiągnięciem punktu równoważnikowego miareczkowania. Jeżeli równowaga zostanie osiągnięta dostatecznie szybko, można skorzystać z potencjometru rejestrującego. W przypadku tej metody konieczne są dokładne informacje na temat całkowitej ilości substancji i jej stężenia. Należy podjąć środki ostrożności, aby wykluczyć dwutlenek węgla. Szczegółowe informacje na temat procedury, środków ostrożności i obliczeń podano w badaniach standardowych, np. w pozycjach (1), (2), (3), (4) bibliografii.

Metoda spektrofotometryczna

Długość fali ustala się wówczas, gdy zjonizowane i niezjonizowane formy substancji mają wyraźnie różne współczynniki ekstynkcji. Widmo absorpcyjne UV/VIS uzyskuje się z roztworów o stałym stężeniu, w warunkach pH, w których substancja jest zasadniczo niezjonizowana i w pełni zjonizowana, oraz w szeregu pośrednich pH. W tym celu można albo dodawać przyrostowo stężony kwas (stężoną zasadę) do stosunkowo dużej objętości roztworu substancji w wieloskładnikowym roztworze buforowym, początkowo przy wysokim (niskim) pH (pozycja (5) bibliografii), albo dodawać jednakowe objętości roztworu podstawowego substancji w np. wodzie czy metanolu do stałych objętości różnych roztworów buforowych obejmujących pożądaną zakres pH. Na podstawie wartości pH i absorbancji przy wybranej długości fali oblicza się wystarczającą liczbę wartości dla pK_a , korzystając z danych uzyskanych przy co najmniej 5 pH, w których substancja jest zjonizowana w co najmniej 10 % i mniej niż 90 %. Więcej informacji szczegółowych na temat doświadczenia i metodę obliczania można znaleźć w pozycji (1) bibliografii.

Metoda konduktometryczna

Przy użyciu komórki o niskiej znanej stałej komórkowej mierzy się przewodność roztworu substancji o stężeniu około 0,1 M w wodzie do pomiarów przewodności. Mierzy się także przewodność szeregu dokładnie wykonanych rozcieńczeń tego roztworu. Za każdym razem stężenie zmniejsza się o połowę, a serie powinny obejmować co najmniej rząd wielkości stężenia. Przewodność graniczną przy rozcieńczeniu nieskończenie wielkim ustala się, przeprowadzając podobne doświadczenie z użyciem soli sodowej, a następnie dokonując ekstrapolacji. Stopień dysocjacji można wówczas obliczyć na podstawie przewodności każdego roztworu za pomocą równania Onsagera i stąd stałą dysocjacji można obliczyć zgodnie z prawem rozcieńczeń Ostwalda jako $K = \alpha^2 C / (1 - \alpha)$, gdzie C oznacza stężenie w molach na liter, a α oznacza frakcję zdysocjowaną. Należy podjąć środki ostrożności, aby wykluczyć CO₂. Więcej informacji szczegółowych na temat doświadczenia i metodę obliczania można znaleźć w standardowej literaturze i pozycjach (1), (6) i (7) bibliografii.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

Metoda miareczkowa

Wartość pK_a oblicza się dla 10 punktów mierzonych na krzywej miareczkowania. Oblicza się średnią i odchylenie standardowe takich wartości pK_a. Należy je przestawić na wykresie zestawiającym pH z objętością mianowanego roztworu zasady lub kwasu oraz w postaci tabeli.

Metody spektrofotometryczne

Absorbancję i pH zestawia się w tabeli dla każdego widma. Na podstawie pośrednich punktów danych widma oblicza się co najmniej pięć wartości pK_a, a także średnią i odchylenie standardowe tych wyników.

Metoda konduktometryczna

Przewodność równoważnikową Λ oblicza się dla każdego stężenia kwasu i dla każdego stężenia mieszaniny złożonej z jednego równoważnika kwasu oraz równoważnika wodorotlenku sodu niezawierającego węglanów w ilości 0,98. Kwas jest w nadmiarze, aby zapobiec nadmiarowi OH⁻ w wyniku hydrolizy. $1/\Lambda$ zestawia się na wykresie z \sqrt{C} , a Λ_0 soli można otrzymać przez ekstrapolację do stężenia zerowego.

Λ_0 kwasu można obliczyć, korzystając z dostępnych w literaturze wartości H⁺ i Na⁺. Wartość pK_a można wyliczyć ze wzoru $\alpha = \Lambda_i / \Lambda_0$ i $K_a = \alpha^2 C / (1 - \alpha)$ dla każdego stężenia. Lepsze wartości K_a można uzyskać, dokonując korekt o ruchliwość i aktywność. Należy obliczyć średnią i odchylenia standardowe wartości pK_a.

Sprawozdanie z badania

Wszystkie dane pierwotne i obliczone wartości pK_a należy przedłożyć wraz z metodą obliczania (najlepiej w formie tabeli, jak zasugerowano w pozycji (1) bibliografii), podobnie jak opisane powyżej parametry statystyczne. W przypadku metod miareczkowych należy przedstawić szczegółowe informacje na temat mianowania titrantów.

W przypadku metody spektrofotometrycznej należy przedstawić wszystkie widma. W przypadku metody konduktometrycznej należy przedstawić szczegółowe informacje na temat wyznaczania stałej komórkowej. Należy przedstawić informacje na temat zastosowanej techniki, metod analitycznych i charakteru wszelkich wykorzystywanych roztworów buforowych.

Należy podać temperaturę(-y) przeprowadzania badania.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Albert, A. i Sergeant, E.P.: Ionization Constants of Acids and Bases, Wiley, Inc., Nowy Jork, 1962.
- (2) Nelson, N.H. i Faust, S.D.: Acidic dissociation constants of selected aquatic herbicides, Env. Sci. Tech. 3, II, s. 1186–1188 (1969).

- (3) ASTM D 1293 – Annual ASTM Standards, Filadelfia, 1974.
 - (4) Standard Method 242. APHA/AWWA/WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, wydanie 14., Amerykańskie Stowarzyszenie Zdrowia Publicznego, Waszyngton, 1976.
 - (5) Clark, J. i Cunliffe, A.E.: Rapid spectrophotometric measurement of ionisation constants in aqueous solution. *Chem. Ind. (Londyn)* 281, (marzec 1973 r.).
 - (6) ASTM D 1125 – Annual ASTM Standards, Filadelfia, 1974.
 - (7) Standard Method 205 – APHA/AWWA/NPCF (zob. Powyżej (4)).
 - (8) *Handbook of Chemistry and Physics*, wydanie 60. CRC-Press, Boca Raton, Floryda, 33431 (1980).”
- 2) w części B rozdział B.5 otrzymuje brzmienie:

„B.5 DZIAŁANIE ŻRĄCE / SILNIE DRAŻNIĄCE NA OCZY

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 405 (2012). Okresowo dokonuje się przeglądu wytycznych OECD dotyczących badania substancji chemicznych w celu zagwarantowania, że odzwierciedlają one najlepszą dostępną wiedzę naukową. W poprzednich przeglądach przedmiotowej wytycznej dotyczącej badań szczególną uwagę poświęcono możliwym ulepszeniom, dokonując oceny wszystkich dostępnych informacji na temat badanej substancji chemicznej w celu uniknięcia niepotrzebnych badań na zwierzętach laboratoryjnych i tym samym usunięcia wątpliwości związanych z dobrostanem zwierząt. Wytyczna TG nr 405 (przyjęta w 1981 r. i zaktualizowana w latach 1987, 2002 i 2012) obejmuje zalecenie, aby przed rozpoczęciem opisywanego badania działania żrącego / silnie drażniącego na oczy *in vivo* przeprowadzić analizę wagi dowodów (1) na istniejących odpowiednich danych. Jeżeli dostępne dane są niewystarczające, zaleca się opracowanie takich danych za pomocą badań sekwencyjnych (2)(3). Strategia takich badań obejmuje przeprowadzenie zweryfikowanych i zaakceptowanych badań *in vitro* i stanowi dodatek do niniejszej metody badawczej. Do celów rozporządzenia (WE) nr 1907/2006 w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH) ⁽¹⁾ w odnośnym poradniku ECHA uwzględnia się również zintegrowaną strategię badań (21). Badania na zwierzętach należy przeprowadzać tylko wtedy, gdy zostaną uznane za konieczne po rozważeniu dostępnych metod alternatywnych, a korzystanie z nich zostanie uznane za właściwe. W momencie sporządzania niniejszej zaktualizowanej metody badawczej istnieją przypadki, w których zastosowanie tej metody jest nadal konieczne lub wymagane zgodnie z niektórymi ramami regulacyjnymi.

Najnowsza aktualizacja dotyczyła głównie wykorzystania leków przeciwbólowych i środków znieczulających i nie miała wpływu na podstawowe założenia i strukturę wytycznej dotyczącej badań. ICCVAM ⁽²⁾ oraz niezależny międzynarodowy panel naukowy ds. wzajemnej oceny dokonali przeglądu przydatności i ograniczeń związanych z rutynowym stosowaniem środków znieczulających miejscowo, leków przeciwbólowych o działaniu ogólnoustrojowym, a także humanitarne zakończenia procedur podczas badań działania drażniącego na oczy *in vivo* (12). W wyniku przeglądu stwierdzono, że stosowanie środków znieczulających miejscowo i leków przeciwbólowych o działaniu ogólnoustrojowym mogłoby pozwolić częściowo lub całkowicie wyeliminować ból i stres, nie wpływając na wyniki badania, oraz zalecono, aby substancje te były zawsze stosowane. W niniejszej metodzie badawczej uwzględniono ten przegląd. Należy rutynowo stosować środki znieczulające miejscowo, leki przeciwbólowe o działaniu ogólnoustrojowym i humanitarne zakończenie procedur w trakcie badania działania żrącego i silnie drażniącego na oczy *in vivo*. Wyjątki od ich stosowania należy uzasadnić. Udoskonalenia opisane w niniejszej metodzie znacząco zmniejszą lub wyeliminują ból i stres zwierząt podczas większości badań w przypadkach, w których badania bezpieczeństwa dla oczu *in vivo* są nadal konieczne.

Zrównoważone prewencyjne przeciwdziałanie bólowi powinno obejmować (i) rutynowe podawanie środka znieczulającego miejscowo (np. proparakainy lub tetrakainy) i leku przeciwbólowego o działaniu ogólnoustrojowym (np. buprenorfiny) przed podaniem substancji chemicznej, (ii) rutynowe podawanie środka przeciwbólowego o działaniu ogólnoustrojowym (np. buprenorfiny i meloksykamu) po podaniu substancji chemicznej, (iii) zaplanowane obserwacje, monitorowanie i nagrywanie zwierząt w celu zaobserwowania klinicznych objawów bólu lub stresu oraz (iv) zaplanowane obserwacje, monitorowanie i odnotowywanie charakteru, dotkliwości i postępowania wszystkich urazów oczu. Więcej szczegółowych informacji przedstawiono w zaktualizowanych procedurach opisanych poniżej. Po podaniu badanej substancji chemicznej nie należy podawać żadnych dodatkowych środków znieczulających miejscowo ani leków przeciwbólowych w celu uniknięcia zakłócenia badania. Nie należy stosować miejscowo leków przeciwbólowych o działaniu przeciwzapalnym (np. meloksykamu), a stosowane dawki leków o działaniu ogólnoustrojowym nie powinny zakłócać skutków dla oczu.

Definicje zamieszczono w dodatku do metody badawczej.

⁽¹⁾ Rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 18 grudnia 2006 r. w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH) i utworzenia Europejskiej Agencji Chemikaliów, zmieniające dyrektywę 1999/45/WE oraz uchylające rozporządzenie Rady (EWG) nr 793/93 i rozporządzenie Komisji (WE) nr 1488/94, jak również dyrektywę Rady 76/769/EWG i dyrektywy Komisji 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/WE i 2000/21/WE. Dz.U. L 304 z 22.11.2007, s. 1.

⁽²⁾ Amerykański Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

Z uwagi na dobrze pojęty interes nauki i dobrostan zwierząt nie należy rozważać przeprowadzania badań *in vivo*, dopóki wszystkie dostępne dane na temat potencjalnego żrącego/drażniącego działania substancji chemicznej na oczy nie zostaną ocenione w ramach analizy wagi dowodów. Tego rodzaju dane obejmują dowody z badań wykonanych na ludziach lub zwierzętach laboratoryjnych, dowody na działanie żrące/drażniące na oczy jednej substancji lub większej liczby strukturalnie powiązanych substancji lub mieszanin takich substancji, dane wskazujące na silną kwasowość lub zasadowość substancji chemicznej (4) (5) oraz wyniki zweryfikowanych i zaakceptowanych badań działania żrącego na skórę i działania żrącego/drażniającego na oczy *in vitro* lub *ex vivo* (6) (13) (14) (15) (16) (17). Takie badania mogą zostać przeprowadzone przed analizą wagi dowodów lub w jej następstwie.

W przypadku niektórych substancji chemicznych taka analiza może wskazywać na potrzebę przeprowadzenia badań potencjału działania żrącego/drażniającego substancji chemicznej na oczy *in vivo*. We wszystkich takich przypadkach, przed rozważeniem zastosowania badania na oczach *in vivo*, najlepszym rozwiązaniem byłoby przeprowadzenie w pierwszej kolejności badania działania żrącego substancji chemicznej na skórę *in vitro* lub *in vivo* oraz przeprowadzenie oceny zgodnie ze strategią badań sekwencyjnych określoną w metodzie badawczej B.4 (7) lub zintegrowaną strategią badań opisaną w poradniku ECHA (21).

Strategię badań sekwencyjnych, która obejmuje przeprowadzenie zweryfikowanych badań działania żrącego/drażniającego na oczy *in vitro* lub *ex vivo*, załączono jako dodatek do niniejszej metody badawczej oraz, do celów rozporządzenia REACH, w poradniku ECHA (21). Zaleca się realizację takiej strategii badań przed podjęciem badań *in vivo*. W przypadku nowych substancji chemicznych zaleca się zastosowanie strategii badań sekwencyjnych do celów opracowania uzasadnionych naukowo danych na temat żrącego/drażniającego działania substancji chemicznej. W odniesieniu do istniejących substancji chemicznych, na temat których brak jest wystarczających danych co do ich działania żrącego/drażniającego na skórę i oczy, strategia ta może zostać wykorzystana w celu uzupełnienia luk w danych. Użycie innej strategii lub procedury badawczej bądź podjęcie decyzji o niezastosowaniu strategii badań sekwencyjnych wymaga uzasadnienia.

ZASADA BADANIA *IN VIVO*

Po wcześniejszym podaniu leku przeciwbólowego o działaniu ogólnoustrojowym i odpowiedniego znieczulenia miejscowego aplikuje się substancję chemiczną, która ma być badana, w pojedynczej dawce na jedno oko zwierzęcia doświadczalnego; drugie oko, na które nie podano substancji chemicznej, służy jako próba kontrolna. Stopień działania drażniącego/żrącego na oczy ocenia się poprzez ocenę zmian patologicznych spojówki, rogówki oraz tęczy w określonych odstępach czasu. Inne zmiany w oku i niepożądane skutki ogólnoustrojowe są również opisywane w celu uzyskania kompletnej oceny skutków. Czas trwania badania powinien być wystarczający do oceny odwracalności lub nieodwracalności obserwowanych skutków.

Zwierzęta wykazujące oznaki silnego stresu lub bólu na którymkolwiek etapie badań lub oznaki zmian patologicznych kwalifikujące się do humanitarnego zakończenia procedury opisanego w niniejszej metodzie badawczej (zob. pkt 26) należy uśmiercić w sposób humanitarny, a substancję chemiczną należy odpowiednio ocenić. Kryteria podejmowania decyzji o uśmiercaniu zwierząt w stanie agonalnym lub cierpiących silny ból zostały określone w wytycznych OECD (8).

PRZYGOTOWANIA DO BADANIA *IN VIVO*

Wybór gatunku

Królik albinos jest preferowanym gatunkiem zwierząt laboratoryjnych. Wykorzystywane są zdrowe młode dorosłe króliki. W przypadku wykorzystania innych szczepów lub gatunków należy podać uzasadnienie.

Przygotowanie zwierząt

Obydwoje oczu zwierzęcia doświadczalnego wstępnie wybranego do badania należy zbadać na 24 godziny przed przystąpieniem do badań. Zwierzęta z objawami podrażnienia oczu, wad wzroku lub istniejących uszkodzeń rogówki nie powinny być wykorzystywane w badaniu.

Warunki utrzymywania i karmienia

Zwierzęta należy utrzymywać oddzielnie. Temperatura w pomieszczeniu dla zwierząt doświadczalnych powinna wynosić 20 °C (\pm 3 °C) w przypadku królików. Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 30 % i pożądana jest, żeby nie przekraczała 70 % poza czasem czyszczenia pomieszczenia, celem powinno być utrzymywanie jej na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne z zachowaniem cyklu 12 godzin światła i 12 godzin ciemności. Należy unikać nadmiernego natężenia światła. Do żywienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody do picia.

PROCEDURA BADAWCZA

Stosowanie środków znieczulających miejscowo i leków przeciwbólowych o działaniu ogólnoustrojowym

Zaleca się stosowanie poniższych procedur w celu uniknięcia lub zminimalizowania bólu i stresu podczas procedur badania bezpieczeństwa dla oczu. Można skorzystać z procedur alternatywnych, które opracowano w celu zapewnienia tak samo dobrych, a nawet lepszych sposobów na uniknięcie bólu i stresu lub ich uśmierzenie.

- Sześćdziesiąt minut przed podaniem badanej substancji chemicznej za pomocą wstrzyknięcia podskórnego podaje się buprenorfinę w ilości 0,01 mg/kg w celu uzyskania terapeutycznego poziomu ogólnoustrojowego działania przeciwbólowego. Z dostępnych danych wynika, że buprenorfina i inne podobne opioidowe leki przeciwbólowe podawane ogólnoustrojowo nie powodują zmiany reakcji oczu ani nie oczekuje się, że spowodują taką zmianę (12).
- Pięć minut przed podaniem badanej substancji chemicznej na każde oko podaje się jedną kroplę lub dwie krople środka znieczulającego miejscowo (np. 0,5-proc. chlorowodoru proparakainy lub 0,5-proc. chlorowodoru tetrakainy). Aby uniknąć możliwego zakłócenia badania, zaleca się stosowanie środka znieczulającego miejscowo, który nie zawiera konserwantów. Oko każdego zwierzęcia, na które zamiast badanej substancji chemicznej podaje się środek znieczulający miejscowo, służy jako próba kontrolna. Jeżeli przewiduje się, że badana substancja chemiczna spowoduje silny ból i stres, danego zwierzęcia nie należy zasadniczo poddawać badaniu *in vivo*. W przypadku wątpliwości lub gdy badanie jest konieczne, należy rozważyć jednak dodatkowe zastosowania środka znieczulającego miejscowo w odstępach pięciominutowych przed podaniem badanej substancji chemicznej. Użytkownicy powinni mieć świadomość, że wielokrotne zastosowania środków znieczulających miejscowo mogą potencjalnie spowodować nieznaczne spotęgowanie działania drażniącego lub wydłużenie czasu potrzebnego do ustąpienia zmian patologicznych wywołanych substancją chemiczną. Metodę badawczą BCOP można wykorzystać do identyfikowania substancji chemicznych.
- Osiem godzin po podaniu badanej substancji chemicznej za pomocą wstrzyknięcia podskórnego podaje się buprenorfinę w dawce 0,01 mg/kg i meloksykam w dawce 0,5 mg/kg w celu zapewnienia ciągłego terapeutycznego poziomu ogólnoustrojowego działania przeciwbólowego. Chociaż brakuje danych wskazujących, że meloksykam ma działanie przeciwzapalne na oczy, gdy jest podawany raz dziennie przez wstrzyknięcie podskórne, nie należy podawać go co najmniej 8 godzin po podaniu badanej substancji chemicznej w celu uniknięcia ewentualnego możliwego zakłócenia badania (12).
- Po ośmiu godzinach od podania badanej substancji chemicznej co 12 godzin należy wstrzykiwać podskórnie buprenorfinę w dawce 0,01 mg/kg w połączeniu z meloksykamem w dawce 0,5 mg/kg podawanym co 24 godziny do czasu ustąpienia zmian patologicznych oczu oraz klinicznych objawów bólu i stresu. Dostępne są leki przeciwbólowe o przedłużonym uwalnianiu, których stosowanie można rozważyć w celu zmniejszenia częstotliwości dawkowania leków przeciwbólowych.
- Analgezję „ratunkową” należy zastosować niezwłocznie po podaniu badanej substancji chemicznej, jeżeli analgezja prewencyjna i znieczulenie miejscowe są niewystarczające. Jeżeli zwierzę wykazuje objawy bólu i stresu w trakcie badania, należy niezwłocznie wstrzyknąć podskórnie „ratunkową” dawkę buprenorfiny w ilości 0,03 mg/kg, a następnie powtarzać w razie potrzeby nawet co 8 godzin zamiast dawki 0,01 mg/kg wstrzykiwanej podskórnie co 12 godzin. Meloksykam w dawce 0,5 mg/kg wstrzykuje się podskórnie co 24 godziny w połączeniu z „ratunkową” dawką buprenorfiny, ale nie wcześniej niż po upływie co najmniej 8 godzin od podania badanej substancji chemicznej.

Podawanie badanej substancji chemicznej

Badaną substancję chemiczną należy umieścić na spojówce jednego oka każdego ze zwierząt po delikatnym odsunięciu dolnej powieki z gałki ocznej. Następnie powieki łagodnie przytrzymuje się zamknięte przez mniej więcej jedną sekundę, aby zapobiec utracie materiału. Drugie oko, na które nie podano substancji chemicznej, służy jako próba kontrolna.

Nawilżanie

Oczu zwierząt doświadczalnych nie należy przepłukiwać przez co najmniej 24 godziny po wkropleniu badanej substancji chemicznej, z wyjątkiem badania substancji stałych (zob. pkt 18) i przypadków natychmiastowego działania żrącego lub drażniącego. W stosownych przypadkach po 24 godzinach można przepłukać oczy.

Nie zaleca się stosowania grupy satelitarnej zwierząt w celu zbadania wpływu przepłukiwania, chyba że ma to uzasadnienie naukowe. Jeżeli grupa satelitarna jest potrzebna, należy użyć dwóch królików. Warunki przepłukiwania powinny być dokładnie dokumentowane, np. czas przepłukiwania; skład i temperatura roztworu do przepłukiwania; czas trwania, objętość i szybkość aplikowania.

Poziom dawki

1) *Badanie cieczy*

W badaniu cieczy stosuje się dawkę o objętości 0,1 ml. Nie należy stosować urządzenia rozpylającego do aplikowania substancji chemicznej bezpośrednio na oko. W przypadku aerozolu ciecz należy najpierw rozpylić i zebrać w zbiorniku przed zaaplikowaniem jej na oko w ilości 0,1 ml.

2) *Badanie substancji stałych*

W badaniu substancji stałych, past i cząstek substancji chemicznych stosowana ilość powinna mieć objętość 0,1 ml lub wagę nie większą niż 100 mg. Badaną substancję chemiczną należy zmielić do uzyskania postaci sproszkowanej. Objętość substancji stałej należy mierzyć po delikatnym zbitciu, np. poprzez ostukanie pojemnika pomiarowego. Jeżeli badana substancja chemiczna w postaci stałej nie została usunięta z oka zwierzęcia doświadczalnego w wyniku działania mechanizmów fizjologicznych w pierwszym punkcie czasowym obserwacji po upływie godziny od jej podania, oko można przepłukać roztworem soli fizjologicznej lub wodą destylowaną.

3) *Badanie aerozoli*

Zaleca się, aby wszystkie urządzenia rozpylające i aerozole zostały zebrane przed rozpoczęciem wkraplania do oka. Wyjątek stanowią substancje chemiczne w aerozolach znajdujące się w pojemnikach pod ciśnieniem, których nie można zebrać z powodu parowania. W takich przypadkach należy przytrzymać oko w pozycji otwartej i zaaplikować badaną substancję chemiczną do oka jednym psknięciem trwającym około sekundy z odległości 10 cm prostopadle do oka. Odległość ta może się różnić w zależności od ciśnienia w rozpylaczu i jego zawartości. Należy uważać, aby nie doszło do uszkodzenia oka z powodu ciśnienia w rozpylaczu. W odpowiednich przypadkach może być niezbędna ocena możliwości potencjalnego „mechanicznego” uszkodzenia oka spowodowanego siłą rozpylacza.

Oszacować dawkę aerozolu można, wykonując następującą symulację badania: substancja chemiczna jest rozpylana na papierku wagowym przez otwór o rozmiarze oka królika znajdujący się bezpośrednio przed papierkiem. Przyrost wagi papierka wykorzystuje się do określenia przybliżonej ilości rozpylonej na oko. W przypadku lotnych substancji chemicznych wielkość dawki można oszacować poprzez zważenie pojemnika odbiorczego przed usunięciem i po usunięciu badanej substancji chemicznej.

Badanie wstępne (badanie działania drażniącego/żrącego na oczy *in vivo* z wykorzystaniem jednego zwierzęcia)

Zaleca się, aby badanie *in vivo* wstępnie wykonywano z wykorzystaniem jednego zwierzęcia (zob. dodatek do niniejszej metody badawczej: Strategia badań sekwencyjnych działania drażniącego i żrącego na oczy). Obserwacje powinny umożliwić określenie dotkliwości i odwracalności zmian przed przystąpieniem do badania potwierdzającego na drugim zwierzęciu.

Jeżeli wyniki tego badania wskazują, że substancja chemiczna jest żrąca lub silnie drażniąca dla oka przy zastosowaniu opisanej procedury, należy zaprzestać dalszego badania działania drażniącego na oczy.

Badanie potwierdzające (badanie działania drażniącego na oczy *in vivo* z wykorzystaniem dodatkowych zwierząt)

W przypadku niezaobserwowania działania żrącego lub silnie drażniącego na oczy w badaniu wstępnym reakcję w postaci działania drażniącego lub reakcję ujemną należy potwierdzić przy wykorzystaniu maksymalnie dwóch dodatkowych zwierząt. W przypadku stwierdzenia działania drażniącego w badaniu wstępnym zaleca się przeprowadzenie badania potwierdzającego w sposób sekwencyjny na każdym ze zwierząt z osobna, a nie narażanie obu dodatkowych zwierząt na działanie badanej substancji jednocześnie. Jeżeli badanie na drugim zwierzęciu ujawni działanie żrące lub silnie drażniące na oczy, badanie nie będzie kontynuowane. Jeżeli wyniki badania drugiego zwierzęcia są wystarczające, aby ustalić klasyfikację pod względem zagrożeń, wówczas nie należy prowadzić żadnych dalszych badań.

Okres obserwacji

Okres obserwacji powinien być wystarczająco długi, aby można było w pełni ocenić siłę i odwracalność obserwowanych skutków. Należy jednak przerwać doświadczenie w momencie, gdy zwierzę wykazuje objawy silnego bólu lub stresu (8). W celu określenia odwracalności skutków zwierzęta należy co do zasady obserwować przez 21 dni po podaniu badanej substancji chemicznej. Jeżeli odwracalność zostanie zaobserwowana przed upływem 21 dni, doświadczenie należy przerwać w tym momencie.

Obserwacje kliniczne i ocena punktowa reakcji oka

Oczy należy dokładnie ocenić pod kątem wystąpienia lub braku zmian patologicznych oczu godzinę po podaniu badanej substancji chemicznej, a następnie należy przeprowadzać takie oceny co najmniej raz dziennie. Zwierzęta należy oceniać kilka razy dziennie przez pierwsze trzy dni, aby upewnić się, że decyzje o przerwaniu badania zostaną podjęte w odpowiednim momencie. Zwierzęta doświadczalne są rutynowo poddawane ocenie przez cały czas trwania badania pod kątem klinicznych objawów bólu lub stresu (np. powtarzające się drapanie lub pocieranie oka, nadmierne mruganie, nadmierne łzawienie) (9) (10) (11), co najmniej dwa razy dziennie, z minimum sześciogodzinnym odstępem między obserwacjami lub częściej w razie potrzeby. Jest to konieczne, aby (i) właściwie ocenić zwierzęta pod kątem wystąpienia bólu i stresu w celu podjęcia świadomych decyzji dotyczących konieczności zwiększenia dawki leków przeciwbólowych oraz aby (ii) ocenić zwierzęta pod kątem dowodów na ustalone humanitarne zakończenie procedury w celu podjęcia świadomych decyzji, czy humanitarne uśmiercenie zwierząt jest właściwym rozwiązaniem, oraz w celu zapewnienia podejmowania takich decyzji w odpowiednim momencie. Wybarwienie fluoresceiną należy stosować rutynowo, a biomikroskop z lampą szczelinową należy stosować w odpowiednich przypadkach (np. przy ocenianiu dotkliwości obrażenia w sytuacji wystąpienia owrzodzenia rogówki) jako wsparcie w wykrywaniu i mierzeniu uszkodzenia oka oraz w celu oceny, czy ustalone kryteria zakończenia procedury w odniesieniu do humanitarnego uśmiercania zostały spełnione. Cyfrowe fotografie zaobserwowanych zmian patologicznych można gromadzić w celach informacyjnych oraz aby zapewnić stałe rejestrowanie skali uszkodzenia oka. Zwierzęta nie powinny być poddawane badaniu dłużej niż to konieczne po uzyskaniu ostatecznych informacji. Zwierzęta wykazujące objawy silnego bólu lub stresu należy bezzwłocznie uśmiercić w sposób humanitarny, a substancję chemiczną należy odpowiednio ocenić.

Zwierzęta, u których po podaniu substancji chemicznej wystąpiły następujące zmiany patologiczne oczu, należy uśmiercić w sposób humanitarny (opis stopni zmian patologicznych znajduje się w tabeli 1): perforacja lub znaczące owrzodzenie rogówki, w tym garbiak; krwawienie z przedniej komory oka; zmętnienia rogówki stopnia 4; brak reakcji na światło (zmiany w tęczęwce stopnia 2) utrzymujący się przez 72 godziny; owrzodzenie błony spojówkowej; martwica spojówek lub fałdu półksiężycowatego spojówki; lub tworzenie się strzępów tkanki martwiczej. Wynika to z faktu, że tego typu zmiany patologiczne są na ogół nieodwracalne. Ponadto zaleca się, aby w przypadku wystąpienia zmian patologicznych oczu stosowano humanitarne zakończenie procedury w celu przerwania badań przed zakończeniem planowanego 21-dniowego okresu obserwacji. Uznaje się, że następujące zmiany patologiczne są sygnałem uszkodzeń oka w wyniku działania silnie drażniącego lub żrącego na oczy oraz uszkodzeń, co do których nie oczekuje się, że całkowicie ustąpią do końca 21-dniowego okresu obserwacji: poważne uszkodzenie (np. owrzodzenie rogówki wykraczające poza powierzchniowe warstwy podskórne), zniszczenie rąbka spojówki >50 % (o czym świadczy zbielenie tkanki spojówkowej) oraz poważne zakażenie oka (ropna wydzielina). Połączenie: unaczynienia powierzchni rogówki (tj. łuszczki); powierzchni wybarwienia fluoresceiną, która nie zmniejsza się z czasem na podstawie codziennej oceny; lub braku ponownego nabłonkowania po upływie 5 dni od podania badanej substancji chemicznej także można uznać za potencjalnie użyteczne kryteria, które wpływają na decyzję kliniczną w sprawie wcześniejszego zakończenia badania. Powyższe ustalenia z osobna są jednak niewystarczające do uzasadnienia wcześniejszego zakończenia badania. Po zidentyfikowaniu poważnych skutków dla oczu należy skonsultować się z uczestniczącym w badaniu lub wykwalifikowanym lekarzem weterynarii zajmującym się zwierzętami laboratoryjnymi lub z personelem przeszkolonym w identyfikowaniu klinicznych zmian patologicznych, aby przeprowadzić badanie kliniczne w celu ustalenia, czy połączenie tych skutków uzasadnia wcześniejsze zakończenie badania. Należy określić i odnotować stopnie reakcji oka (spojówki, rogówki i tęczęwki) po upływie 1, 24, 48 i 72 godzin od podania badanej substancji chemicznej (tabela 1). Zwierzęta, u których nie wystąpiły zmiany patologiczne oczu, mogą zostać uśmiercone nie wcześniej niż po upływie 3 dni od zaaplikowania substancji. Zwierzęta, u których wystąpiły zmiany patologiczne oczu, które nie są poważne, powinny przebywać pod obserwacją do czasu ustąpienia zmian lub przez 21 dni, po upływie których badanie zostaje zakończone. Obserwacje należy prowadzić i odnotowywać co najmniej po upływie 1, 24, 48 i 72 godzin oraz 7, 14 i 21 dni w celu określenia statusu zmian patologicznych oraz ich odwracalności lub nieodwracalności. W razie konieczności należy prowadzić częstsze obserwacje w celu określenia, czy zwierzę doświadczalne należy uśmiercić ze względów humanitarnych lub wykluczyć z badania z powodu wyników ujemnych.

Po każdym badaniu należy zapisać oceny punktowe zmian patologicznych oczu (tabela 1). Należy również odnotowywać wszelkie inne zmiany patologiczne oczu (np. łuszczka, wybarwienie, zmiany w przedniej komorze) lub niepożądane skutki ogólnoustrojowe.

Badanie reakcji można ułatwić dzięki zastosowaniu lupy dwuokularowej, ręcznej lampy szczelinowej, biomikroskopu lub innego odpowiedniego narzędzia. Po odnotowaniu obserwacji przeprowadzonych po upływie 24 godzin oczu można poddawać dalszym badaniom za pomocą fluoresceiny.

Ocena punktowa reakcji oka jest z konieczności subiektywna. Aby ujednoczyć ocenę punktową reakcji oka oraz pomóc laboratorium badawczym i osobom biorącym udział w przeprowadzaniu i interpretowaniu obserwacji, należy odpowiednio przeszkolić personel przeprowadzający obserwacje w zakresie stosowanego systemu oceny punktowej reakcji.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Ocena wyników

Oceny punktowe działania drażniącego na oczy należy analizować w połączeniu z charakterem i dotkliwością zmian patologicznych oraz ich odwracalnością lub brakiem odwracalności. Poszczególne oceny punktowe nie stanowią normy bezwzględnej właściwości drażniących danej substancji chemicznej, ponieważ ocenie poddawane są również inne skutki działania badanej substancji chemicznej. Ewentualnie poszczególne oceny punktowe należy postrzegać jako wartości odniesienia, które mają znaczenie tylko wtedy, gdy są poparte pełnym opisem i oceną wszystkich obserwacji.

Sprawozdanie z badania

Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Uzasadnienie badań in vivo: analiza wagi dowodów dotycząca istniejących już danych na temat badania, w tym wyniki badań sekwencyjnych:

- opis odpowiednich danych dostępnych z uprzednio przeprowadzonych badań;
- dane uzyskane na każdym etapie strategii badań;
- opis przeprowadzonych badań *in vitro*, w tym szczegółowe dane na temat procedur, wyników otrzymanych z zastosowaniem badanych substancji chemicznych / substancji chemicznych odniesienia;
- opis przeprowadzonych badań działania drażniącego/żrącego na skórę *in vivo*, wraz z otrzymanymi wynikami;
- analiza wagi dowodów dla celów przeprowadzenia badania *in vivo*.

Badana substancja chemiczna:

- dane identyfikacyjne (np. nazwa systematyczna i, jeżeli jest dostępny, numer CAS, czystość, znane zanieczyszczenia, źródło, numer partii);
- stan skupienia i właściwości fizykochemiczne (np. pH, lotność, rozpuszczalność, stabilność, reaktywność w kontakcie z wodą);
- w przypadku mieszaniny należy określić składniki, w tym dane identyfikacyjne składowych substancji (np. nazwy systematyczne oraz, jeżeli są dostępne, numery CAS) i ich stężenia;
- stosowana dawka.

Nośnik:

- dane identyfikacyjne, stężenie (w stosownych przypadkach), użyta objętość;
- uzasadnienie wyboru nośnika.

Zwierzęta doświadczalne:

- wykorzystany gatunek/szczep, uzasadnienie wykorzystania zwierząt innych niż królik albinos;
- wiek każdego zwierzęcia na początku badania;
- liczba zwierząt każdej płci w grupie badanej i grupach kontrolnych (jeżeli są wymagane);
- masa ciała każdego zwierzęcia na początku i na końcu badania;
- źródło, warunki utrzymywania, pasza itp.

Środki znieczulające i leki przeciwbólowe

- dawki i godziny podawania środków znieczulających miejscowo i leków przeciwbólowych o działaniu ogólnoustrojowym;
- jeżeli zastosowano środek znieczulający miejscowo – dane identyfikacyjne, czystość, rodzaj i potencjalne interakcje z badaną substancją chemiczną.

Wyniki:

- opis metody zastosowanej do oceny punktowej działania drażniącego w każdym punkcie czasowym obserwacji (np. ręczna lampa szczelinowa, biomikroskop, fluoresceina);
- tabela danych dotyczących wywołania działania drażniącego/żrącego dla każdego zwierzęcia w każdym punkcie czasowym obserwacji aż do momentu usunięcia każdego zwierzęcia z badania;
- opis stopnia i charakteru obserwowanego działania drażniącego lub żrącego;
- opis wszelkich innych zmian patologicznych zaobserwowanych w oku (np. unaczynienie, formowanie łuszczyki, zrosty, wybarwienie);
- opis miejscowych i ogólnoustrojowych niekorzystnych skutków niezwiązanych z oczami, zapis klinicznych objawów bólu i stresu, fotografie cyfrowe i wyniki ewentualnego badania histopatologicznego.

Omówienie wyników**Interpretacja wyników**

Ekstrapolacja wyników badań działania drażniącego na oczy zwierząt laboratoryjnych na ludzi jest zasadna tylko w ograniczonym stopniu. W wielu przypadkach królik albinos jest bardziej wrażliwy niż ludzie na działanie drażniące lub żrące na oczy.

Przy interpretacji danych należy pamiętać o wykluczeniu działania drażniącego na oczy będącego wynikiem infekcji wtórnej.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Barratt, M.D., *et al.* (1995), The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard, sprawozdanie nr 8 z warsztatów ECVAM, ATLA 23, 410–429.
- (2) de Silva, O., *et al.* (1997), Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies, Food Chem. Toxicol 35, 159–164.
- (3) Worth A.P. i Fentem J.H. (1999), A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161–177.
- (4) Young, J.R., *et al.* (1988), Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals, Toxicol. *In Vitro*, 2, 19–26.
- (5) Neun, D.J. (1993), Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH, J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227–231.
- (6) Fentem, J.H., *et al.* (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, s. 483–524.
- (7) Rozdział B.4 niniejszego załącznika, *Ostre działanie drażniące/żrące na skórę*.
- (8) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria OECD dotycząca badań i oceny nr 19. (<http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).
- (9) Wright EM, Marcella KL, Woodson JF. (1985), Animal pain: evaluation and control, Lab Animal, maj/czerwiec, 20–36.
- (10) Krajowa Rada ds. Badań (NRC) (2008), Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals, Waszyngton, D.C.: The National Academies Press.
- (11) Krajowa Rada ds. Badań (NRC) (2009), Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals, Waszyngton, D.C.: The National Academies Press.

- (12) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report: Recommendations for Routine Use of Topical Anesthetics, Systemic Analgesics, and Humane Endpoints to Avoid or Minimize Pain and Distress in Ocular Safety Testing, publikacja NIH nr 10-7514, Research Triangle Park, Karolina Północna, Stany Zjednoczone Ameryki: National Institute of Environmental Health Sciences.
- <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/OcuAnest-TMER.htm>
- (13) Rozdział B.40 niniejszego załącznika, *Badanie działania żrącego na skórę in vitro: test przezskórnej oporności elektrycznej (TER)*
- (14) Rozdział B.40a niniejszego załącznika, *Badanie działania żrącego na skórę in vitro: badanie modelu skóry ludzkiej.*
- (15) OECD (2006), *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, Wytyczne OECD dotyczące badania substancji chemicznych, sekcja 4, OECD Paryż.
- (16) Rozdział B.47 niniejszego załącznika, *Metoda badania zmętnienia i przepuszczalności rogówki u bydła do celów identyfikacji* (i) substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu oraz (ii) substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania jako substancje drażniące oczy lub powodujące poważne uszkodzenie oczu.
- (17) Rozdział B.48 niniejszego załącznika, *Metoda badania na izolowanym oku kurzym do celów identyfikacji* (i) substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu oraz (ii) substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania jako substancje drażniące oczy lub powodujące poważne uszkodzenie oczu.
- (18) Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (2003). *Label Review Manual*: wyd. III. EPA737-B-96-001, Waszyngton, D.C.: Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych.
- (19) ONZ (2011), *Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS)*, wydanie czwarte zmienione, Nowy Jork i Genewa: publikacje Organizacji Narodów Zjednoczonych.
- (20) WE (2008), rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej* L 353, s. 1–1355.
- (21) Poradnik ECHA dotyczący wymagań w zakresie informacji i oceny bezpieczeństwa chemicznego, rozdział R.7a: Wytyczne dotyczące punktów końcowych.
- http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

Tabela 1

Ocena punktowa zmian patologicznych oka

Rogówka	Ocena punktowa
Zmętnienie: Stopień gęstości (odczyt powinien dotyczyć obszaru o największej gęstości) (*)	
Brak owrzodzenia lub zmętnienia	0
Rozrzucone lub rozmyte obszary zmętnienia (inne niż lekkie zmatowienie normalnego połysku); wyraźnie widoczne elementy tęczówki	1
Łatwo zauważalny obszar półprzezroczysty; lekko zaciemnione elementy tęczówki	2
Obszary o kolorze perłowym; brak widocznych elementów tęczówki; rozmiar źrenicy zwięznięcia trudny do określenia	3

Rogówka	Ocena punktowa
Zmatowienie rogówki; tęczęwka niewidoczna z powodu zmętnienia	4
Maksymalna możliwa liczba punktów: 4	
Tęczęwka	
w normie	0
Znacząco pogłębiona fałda, przekrwienie, opuchlizna, umiarkowane przekrwienie okołorogówkowe; lub wstrzyknięcie; tęczęwka reaguje na światło (przyjmuje się, że powolna reakcja stanowi skutek)	1
Krwotok, silne zniszczenia, lub brak reakcji na światło	2
Maksymalna możliwa liczba punktów: 2	
Spojówka	
Zaczerwienienie (dotyczy spojówki powiekowej i gałkowej; wyłączając rogówkę i tęczęwkę)	
w normie	0
Niektóre naczynia krwionośne przekrwione (po wstrzyknięciu)	1
Rozmycie, kolor karmazynowy; pojedyncze naczynia trudno widoczne	2
Rozmycie, kolor mięsa czerwonego	3
Maksymalna możliwa liczba punktów: 3	
Obrzęk spojówki	
Opuchlizna (dotyczy powiek i/lub fałdu półksiężycowatego spojówki)	
w normie	0
Niewielka opuchlizna powyżej normy	1
Widoczna opuchlizna z częściowym wywinięciem powieki	2
Opuchlizna, z powiekami zamkniętymi w połowie	3
Opuchlizna, z powiekami zamkniętymi więcej niż w połowie	4
Maksymalna możliwa liczba punktów: 4	
(*) Należy zapisać obszar zmętnienia rogówki	

Dodatek

DEFINICJE

Rezerwa kwasowo/zasadow: w przypadku preparatów kwasowych jest to ilość (w g) wodorotlenku sodu na 100 g preparatu wymagana do osiągnięcia określonego pH. W przypadku preparatów zasadowych jest to ilość (w g) wodorotlenku sodu odpowiadająca ilości kwasu siarkowego (w g) na 100 g preparatu wymagana do osiągnięcia określonego pH (Young *et al.* 1988).

Substancja chemiczna: substancja albo mieszanina.

Substancje niewykazujące działania drażniącego: substancje, które nie zostały zaklasyfikowane do kategorii I, II lub III EPA jako drażniące dla oczu; ani do kategorii 1, 2, 2A lub 2B wg GHS jako substancje drażniące dla oczu; lub do unijnej kategorii 1 lub 2 (17) (18) (19).

Substancja żrąca dla oczu: a) substancja chemiczna powodująca nieodwracalne uszkodzenie tkanki oka; b) substancje chemiczne zaklasyfikowane do kategorii 1 wg GHS jako drażniące dla oczu lub do kategorii I EPA jako drażniące dla oczu lub do unijnej kategorii 1 (17) (18) (19).

Substancja drażniąca dla oczu: a) substancja chemiczna, która powoduje odwracalną zmianę w oku; b) substancje chemiczne zaklasyfikowane do kategorii II lub III EPA jako drażniące dla oczu; lub do kategorii 2, 2A lub 2B wg GHS jako substancje drażniące dla oczu; lub do unijnej kategorii 2 (17) (18) (19).

Substancja silnie drażniąca dla oczu: a) substancja chemiczna powodująca uszkodzenie tkanki oka, które nie ustępuje w ciągu 21 dni od podania, lub powodująca poważne fizyczne pogorszenie widzenia; b) substancje chemiczne zaklasyfikowane do kategorii 1 wg GHS jako drażniące dla oczu lub do kategorii I EPA jako drażniące dla oczu lub do unijnej kategorii 1 (17) (18) (19).

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

Podejście zintegrowane: strategia badań sekwencyjnych, w ramach której wszystkie istniejące informacje na temat badanej substancji chemicznej są analizowane na każdym poziomie w określonym porządku z zastosowaniem procesu uwzględniającego wagę dowodów w celu określenia, czy dostępna jest wystarczająca ilość informacji do podjęcia decyzji o klasyfikacji zagrożenia, przed przejściem do następnego poziomu. Jeżeli na podstawie dostępnych informacji można przypisać badanej substancji chemicznej potencjał w zakresie wywołania podrażnienia, dodatkowe badania nie są wymagane. Jeżeli na podstawie dostępnych informacji nie można przypisać badanej substancji chemicznej potencjału w zakresie wywołania podrażnień, przeprowadza się procedurę badań sekwencyjnych na zwierzętach do momentu, w którym będzie można dokonać jednoznacznej klasyfikacji.

Waga dowodów (proces): mocne i słabe strony zgromadzonych informacji wykorzystuje się jako podstawę do wyciągnięcia wniosku, który może nie wynikać ewidentnie z poszczególnych danych.

DODATEK DO METODY BADAWCZEJ B.5 ⁽¹⁾**STRATEGIA BADAŃ SEKWENCYJNYCH DZIAŁANIA DRAŻNIĄCEGO I ŻRĄCEGO NA OCZY****Uwagi ogólne**

Zarówno w dobrze pojętym interesie nauki, jak i z uwagi na dobrostan zwierząt istotne jest uniknięcie niepotrzebnego wykorzystywania zwierząt oraz minimalizacja badań mogących powodować silne reakcje u zwierząt. Wszystkie informacje na temat substancji chemicznej istotne z punktu widzenia jej potencjalnego działania drażniącego lub żrącego na oczy powinny zostać poddane ocenie przed podjęciem badań *in vivo*. Możliwe jest, że istnieją wystarczające dowody pozwalające na sklasyfikowanie badanej substancji chemicznej jako potencjalnie drażniącej lub żrącej dla oczu, co sprawia, że przeprowadzanie badań na zwierzętach laboratoryjnych jest zbyt kosztowne. Dlatego wykorzystanie analizy wagi dowodów oraz strategii badań sekwencyjnych zminimalizuje potrzebę prowadzenia badań *in vivo*, zwłaszcza jeżeli substancja chemiczna może powodować silne reakcje.

Zaleca się wykorzystanie analizy wagi dowodów celem oceny istniejących informacji dotyczących działania drażniącego i żrącego na oczy przez substancje chemiczne, a także celem stwierdzenia, czy należy przeprowadzić dodatkowe badania, inne niż badania oka *in vivo*, aby scharakteryzować takie potencjalne działanie substancji. Jeżeli niezbędne są dalsze badania, zaleca się realizowanie strategii badań sekwencyjnych celem uzyskania odpowiednich danych doświadczalnych. W odniesieniu do substancji, które nie posiadają historii badań, należy zastosować strategię badań sekwencyjnych w celu uzyskania danych potrzebnych do oceny ich działania żrącego/drażniącego na oczy. Strategię badań wstępnych opisaną w niniejszym dodatku opracowano podczas warsztatów OECD (1). Następnie została ona potwierdzona i rozszerzona w zharmonizowanym systemie klasyfikacji substancji chemicznych pod względem zagrożeń dla zdrowia ludzi i środowiska oraz zatwierdzona podczas 28. wspólnego posiedzenia Komitetu ds. Substancji Chemicznych i Grupy Roboczej ds. Substancji Chemicznych, które odbyło się w listopadzie 1998 r. (2), i zaktualizowana przez grupę ekspertów OECD w 2011 r.

Pomimo że niniejsza strategia badań nie jest integralną częścią metody badawczej B.5, utożsamia ona zalecane podejście do określania właściwości odpowiadających za działanie drażniące/żrące na oczy. Wspomniane podejście reprezentuje zarówno najlepszą praktykę, jak i wzorzec etyczny dla badań działania drażniącego/żrącego na oczy *in vivo*. Niniejsza metoda badawcza stanowi wytyczne dotyczące prowadzenia badań *in vivo* i określa czynniki, jakim należy poświęcić uwagę przed rozpoczęciem takich badań. Strategia badań sekwencyjnych określa podejście w zakresie wagi dowodów do oceny istniejących danych na temat właściwości substancji chemicznych odpowiadających za działanie drażniące/żrące na oczy oraz zintegrowane podejście do generowania odpowiednich danych dotyczących substancji chemicznych wymagających dodatkowych badań, lub takich, w odniesieniu do których nie przeprowadzono jak dotąd żadnych badań. W ramach tej strategii zaleca się przeprowadzenie zweryfikowanych i zaakceptowanych badań *in vivo* lub *ex vivo*, a dopiero w następnej kolejności zastosowanie metody badawczej B.4 w określonych okolicznościach (3) (4).

Opis strategii badań sekwencyjnych

Przed podjęciem badań w ramach strategii badań sekwencyjnych (rysunek) należy poddać ocenie wszystkie dostępne informacje w celu określenia potrzeby prowadzenia badań *in vivo* na oku. Chociaż z oceny pojedynczych parametrów (np. wartości skrajnych pH) można uzyskać istotne informacje, należy wziąć pod uwagę ogół istniejących informacji. Przy podejmowaniu decyzji dotyczącej wagi dowodów należy poddać ocenie wszystkie dane dotyczące skutków działania danej substancji chemicznej lub substancji analogicznych oraz należy przedstawić uzasadnienie podjętej decyzji. W pierwszej kolejności należy położyć nacisk na istniejące dane na temat działania substancji chemicznej na ludzi i zwierzęta, a następnie na wyniki badań *in vitro* lub *ex vivo*. O ile to możliwe, należy unikać badań *in vivo* substancji chemicznych o działaniu żrącym. Czynniki uwzględniane w omawianej strategii badań obejmują:

ocenę istniejących danych na temat ludzi lub zwierząt lub danych z badania *in vitro* uzyskanych na podstawie zweryfikowanych i zaakceptowanych na szczeblu międzynarodowym metod (etap 1).

(¹) Zob. również poradnik ECHA dotyczący wymagań w zakresie informacji i oceny bezpieczeństwa chemicznego rozdział R.7a w celu uzyskania informacji na temat wykorzystania zintegrowanej strategii badań działania drażniącego na oczy w ramach rozporządzenia REACH: Wytyczne dotyczące punktów końcowych http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

W pierwszej kolejności należy wziąć pod uwagę istniejące dane dotyczące działania na ludzi, np. badania kliniczne lub analizy zawodowe, a także sprawozdania ze studiów przypadków lub dane pochodzące z badań przeprowadzonych na zwierzętach dotyczących działania na oczy lub dane pochodzące ze zweryfikowanych i zaakceptowanych na szczeblu międzynarodowym metod badań działania drażniącego/żrącego na oczy *in vitro*, ponieważ dostarczają informacji bezpośrednio związanych z oddziaływaniem na oczy. Następnie należy poddać ocenie dostępne dane uzyskane w wyniku badań prowadzonych na ludziach lub zwierzętach dotyczących działania żrącego/drażniącego na skórę lub badań *in vitro* opartych na zweryfikowanych i zaakceptowanych na szczeblu międzynarodowym metodach dotyczących działania żrącego na skórę. Substancje chemiczne, o których wiadomo, że wykazują działanie żrące lub silnie drażniące na oko, nie powinny być aplikowane do oczu zwierząt, podobnie jak substancje chemiczne o działaniu żrącym lub silnie drażniącym na skórę; takie substancje chemiczne należy również uznać za żrące lub drażniące dla oczu. Substancje chemiczne, wobec których istnieją wystarczające dowody, uzyskane w poprzednich badaniach okulistycznych, świadczące o braku działania żrącego i drażniącego, również nie powinny być poddawane badaniu *in vivo* na oku;

analizę zależności struktura-aktywność (SAR) (etap 2).

Należy uwzględnić wyniki badań strukturalnie powiązanych substancji chemicznych, o ile są one dostępne. W przypadku dostępności wystarczających danych na temat oddziaływania na ludzi lub zwierzęta substancji strukturalnie powiązanych lub mieszanin takich substancji, wskazujących na potencjał działania żrącego/drażniącego na oczy, można domniemywać, że badana substancja chemiczna spowoduje taką samą reakcję. W takich przypadkach badanie takiej substancji chemicznej może nie być konieczne. Wyniki ujemne badań dotyczących strukturalnie powiązanych substancji lub mieszanin takich substancji nie są wystarczającym dowodem na brak działania żrącego/drażniącego danej substancji chemicznej w świetle strategii badań sekwencyjnych. Ze zweryfikowanych i zaakceptowanych podejść SAR należy korzystać w celu zidentyfikowania potencjału działania żrącego i drażniącego na skórę i oczy;

właściwości fizykochemiczne i reaktywność chemiczną (etap 3).

Substancje chemiczne charakteryzujące się skrajnym pH, takim jak $\leq 2,0$ lub $\geq 11,5$, mogą mieć silne działanie miejscowe. Jeżeli takie skrajne pH jest podstawą do identyfikacji substancji chemicznej jako żrącej lub drażniącej dla oczu, wówczas można również uwzględnić jej rezerwę kwasowo/zasadową (tj. pojemność buforową) (5)(6)(7). Jeżeli pojemność buforowa wskazuje na to, że substancja chemiczna może nie być szkodliwa dla oka (tj. substancje chemiczne ze skrajnym pH i niską rezerwą kwasowo/zasadową), należy przeprowadzić dalsze badania w celu potwierdzenia tej cechy, najlepiej przy użyciu zweryfikowanych i zaakceptowanych badań *in vitro* lub *ex vivo* (zob. pkt 10);

uwzględnienie innych istniejących informacji (etap 4).

Na tym etapie należy ocenić wszystkie dostępne informacje na temat toksyczności ogólnoustrojowej w kontakcie ze skórą. Ponadto należy uwzględnić ostrą toksyczność skórną powodowaną przez badaną substancję chemiczną. Jeżeli wykazano, że badana substancja chemiczna jest bardzo toksyczna w kontakcie ze skórą, badanie na oku może okazać się zbędne. Pomimo że zależność między ostrą toksycznością skórną a działaniem drażniącym/żrącym na oczy nie zawsze jest oczywista, można założyć, że jeśli czynnik jest bardzo toksyczny w kontakcie ze skórą, będzie wykazywał wysoką toksyczność po zaaplikowaniu na oko. Dane na ten temat mogą również zostać rozpatrzone pomiędzy etapami 2 i 3;

ocenę działania żrącego na skórę substancji chemicznej, o ile jest to wymagane do celów regulacyjnych (etap 5).

W pierwszej kolejności potencjał działania żrącego i silnie drażniącego na skórę należy ocenić zgodnie z metodą badawczą B.4 (4) i towarzyszącym jej dodatkiem (8), w tym z wykorzystaniem zweryfikowanych i zaakceptowanych na szczeblu międzynarodowym metod badania działania żrącego na skórę *in vitro* (9) (10) (11). Jeżeli okaże się, że substancja chemiczna ma działanie żrące lub silnie drażniące na skórę, można również uznać, że jest żrąca lub silnie drażniąca dla oka. W związku z powyższym dalsze badania nie będą wymagane. Jeżeli substancja chemiczna nie działa żrąco ani silnie drażniąco na skórę, należy przeprowadzić badania na oku *in vitro* lub *ex vivo*;

wyniki uzyskane z badań *in vitro* lub *ex vivo* (etap 6).

Substancje chemiczne wykazujące właściwości żrące lub silnie drażniące w badaniach *in vitro* lub *ex vivo* (12) (13), które zostały zweryfikowane i zaakceptowane na szczeblu międzynarodowym na potrzeby oceny działania żrącego/drażniącego na skórę lub oko, nie muszą być badane na zwierzętach. Można założyć, że takie substancje chemiczne spowodują podobnie silne reakcje *in vivo*. Jeżeli zweryfikowane i zaakceptowane badania *in vitro/ex vivo* nie są dostępne, należy pominąć etap 6 i przejść bezpośrednio do etapu 7;

badania na królikach *in vivo* (etap 7 i 8):

badania na oczach *in vivo* powinny rozpoczynać się od badań wstępnych z wykorzystaniem jednego zwierzęcia. Jeżeli wyniki tych badań wskazują, że substancja chemiczna jest silnie drażniąca lub żrąca dla oczu, dalsze badania powinny zostać wstrzymane. Jeżeli badanie nie wykazuje żadnego działania żrącego ani silnie drażniącego, należy przeprowadzić badanie potwierdzające z wykorzystaniem dwóch dodatkowych zwierząt. W zależności od wyników badania potwierdzającego konieczne może być przeprowadzenie dalszych badań [zob. metoda badawcza B.5].

STRATEGIA BADAŃ I OCENY DZIAŁANIA DRAŻNIĄCEGO I ŻRĄCEGO NA OCZY

	Działanie	Ustalenie	Wniosek
1	<p>Istniejące dane na temat ludzi lub zwierząt lub dane z badania <i>in vitro</i> uzyskane na podstawie zweryfikowanych i zaakceptowanych na szczeblu międzynarodowym metod, które przedstawiają skutki dla oczu</p> <p>Istniejące dane na temat ludzi lub zwierząt lub dane z badania <i>in vitro</i> uzyskane na podstawie zweryfikowanych i zaakceptowanych na szczeblu międzynarodowym metod, które przedstawiają działanie żrące na skórę</p> <p>Istniejące dane na temat ludzi lub zwierząt lub dane z badania <i>in vitro</i> uzyskane na podstawie zweryfikowanych i zaakceptowanych na szczeblu międzynarodowym metod, które przedstawiają działanie silnie drażniące na skórę</p>	<p>Poważne uszkodzenie oczu</p> <p>Działanie drażniące na oczy</p> <p>Brak działania żrącego/drażniącego na oczy</p> <p>Działanie żrące na skórę</p> <p>Silne działanie drażniące na skórę</p>	<p>Szczytowy punkt końcowy; uznać substancję za żrącą dla oczu. Nie wymaga badań.</p> <p>Szczytowy punkt końcowy; uznać substancję za drażniącą dla oczu. Nie wymaga badań.</p> <p>Szczytowy punkt końcowy; uznać brak działania żrącego i drażniącego dla oczu. Nie wymaga badań.</p> <p>Założyć działanie żrące na oczy. Nie wymaga badań.</p> <p>Założyć działanie drażniące na oczy. Nie wymaga badań.</p>
	↓		
	<i>Brak dostępnych informacji lub dostępne informacje są niejednoznaczne</i>		
	↓		
2	<p>Przeprowadzić SAR pod kątem działania żrącego/drażniącego na oczy</p> <p>Rozważyć SAR w odniesieniu do działania żrącego na skórę</p>	<p>Przewidzieć poważne uszkodzenie oczu</p> <p>Przewidzieć działanie drażniące na oczy</p> <p>Przewidzieć działanie żrące na skórę</p>	<p>Założyć działanie żrące na oczy. Nie wymaga badań.</p> <p>Założyć działanie drażniące na oczy. Nie wymaga badań.</p> <p>Założyć działanie żrące na oczy. Nie wymaga badań.</p>
	↓		
	<i>Nie można dokonać żadnych prognoz albo prognozy nie są jednoznaczne ani ujemne</i>		
	↓		
3	<p>Zmierzyć pH (uwzględnić pojemność buforową, w stosownych przypadkach)</p>	<p>pH ≤ 2 lub ≥ 11,5 (przy wysokiej pojemności buforowej, w stosownych przypadkach)</p>	<p>Założyć działanie żrące na oczy. Nie wymaga badań.</p>
	↓		
	<i>2 < pH < 11,5, or pH ≤ 2,0 lub ≥ 11,5 przy niskiej/braku pojemności buforowej, w stosownych przypadkach</i>		
	↓		

	Działanie	Ustalenie	Wniosek
4	Uznać istniejące dane na temat toksyczności ogólnoustrojowej w kontakcie ze skórą	Wysoka toksyczność przy stężeniach, które byłyby testowane na oku.	Substancja chemiczna byłaby zbyt toksyczna, aby przeprowadzić badanie. Nie wymaga badań.
	↓ <i>Brak informacji na ten temat lub substancja chemiczna nie jest wysoce toksyczna.</i>		
5	Ocenić w doświadczeniu potencjał działania żrącego na skórę zgodnie ze strategią badań opisaną w rozdziale B.4 niniejszego załącznika, jeżeli jest to wymagane również do celów regulacyjnych	Reakcja w postaci działania żrącego lub silnie drażniącego	Założyć działanie żrące na oczy. Nie wymaga dalszych badań.
	↓ <i>Substancja chemiczna nie działa żrąco ani silnie drażniąco na skórę</i>		
6	Przeprowadzić zweryfikowane i zaakceptowane badania na oku <i>in vitro</i> lub <i>ex vivo</i>	Reakcja w postaci działania żrącego lub silnie drażniącego Reakcja w postaci działania drażniącego Reakcja w postaci działania niedrażniącego	Założyć działanie żrące lub silnie drażniące na oczy, pod warunkiem że przeprowadzone badanie(-a) można wykorzystać do identyfikacji substancji żrących/silnie drażniących, a substancja chemiczna wchodzi w zakres dziedziny zastosowania badania lub badań. Nie wymaga dalszych badań. Założyć działanie drażniące na oczy, pod warunkiem że przeprowadzone badanie(-a) można wykorzystać do prawidłowej identyfikacji substancji żrących, silnie drażniących i drażniących, a substancja chemiczna wchodzi w zakres dziedziny zastosowania badania lub badań. Nie wymaga dalszych badań. Założyć brak działania drażniącego na oczy, pod warunkiem że przeprowadzone badanie (-a) można wykorzystać do prawidłowej identyfikacji substancji żrących, silnie drażniących lub drażniących dla oczu, a substancja chemiczna wchodzi w zakres dziedziny zastosowania badania. Nie wymaga dalszych badań.
	↓ <i>Zweryfikowanych i zaakceptowanych badań na oku <i>in vitro</i> lub <i>ex vivo</i> nie można wykorzystać do sformułowania wniosku</i>		
7	Przeprowadzić badanie wstępne na oku królika <i>in vivo</i> z wykorzystaniem jednego zwierzęcia	Poważne uszkodzenie oczu	Uznać substancję za żrącą dla oczu. Nie wymaga dalszych badań.
	↓ <i>Brak poważnych uszkodzeń lub brak reakcji</i>		

	Działanie	Ustalenie	Wniosek
8	Przeprowadzić badanie potwierdzające z wykorzystaniem jednego dodatkowego zwierzęcia lub dwóch dodatkowych zwierząt.	Działanie żrące lub drażniące Brak działania żrącego lub drażniącego	Uznać substancję za żrącą lub drażniącą dla oczu. Nie wymaga dalszych badań. Uznać brak działania drażniącego i żrącego dla oczu. Nie wymaga dalszych badań.;

BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Sprawozdanie końcowe z warsztatów OECD na temat harmonizacji kryteriów weryfikowania i akceptowania w odniesieniu do alternatywnych toksykologicznych metod badawczych. Warsztaty odbyły się w Solnej w Szwecji w dniach 22–24 stycznia 1996 r. (<http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, zatwierdzony podczas 28. wspólnego posiedzenia Komitetu ds. Substancji Chemicznych i Grupy Roboczej ds. Substancji Chemicznych, które odbyło się w listopadzie 1998 r. (<http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (3) Worth, A.P. i Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161–177.
- (4) Rozdział B.4 niniejszego załącznika, Ostre działanie drażniące/żrące na skórę.
- (5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. In Vitro, 2, 19–26.
- (6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhtuter, H.G. i 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, s. 483–524.
- (7) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227–231.
- (8) Dodatek do rozdziału B.4 niniejszego załącznika – Strategia badań sekwencyjnych działania drażniącego i żrącego na oczy.
- (9) Rozdział B.40 niniejszego załącznika, Badanie działania żrącego na skórę *in vitro*: test przezskórnej oporności elektrycznej (TER).
- (10) Rozdział B.40a niniejszego załącznika, Badanie działania żrącego na skórę *in vitro*: badanie modelu skóry ludzkiej.
- (11) OECD (2006), badanie nr 435: *In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, Wytyczne OECD dotyczące badania substancji chemicznych, sekcja 4, OECD Paryż.
- (12) Rozdział B.47 niniejszego załącznika, Metoda badania zmętnienia i przepuszczalności rogówki u bydła do celów identyfikacji substancji żrących i silnie drażniących dla oczu.
- (13) Rozdział B.48 niniejszego załącznika, Metoda badania na izolowanym oku kurzym do celów identyfikacji substancji żrących i silnie drażniących dla oczu.”

3) w części B rozdział B.10 otrzymuje brzmienie:

„B.10 Badanie aberracji chromosomowej w komórkach ssaków *in vitro*”

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 473 (2016). Stanowi ona część cyklu metod badawczych dotyczących toksykologii genetycznej. Opracowany został dokument OECD, który zawiera związane informacje na temat badań w zakresie toksykologii genetycznej oraz przegląd ostatnich zmian, jakie wprowadzono do wytycznych dotyczących badań (1).

Celem badania aberracji chromosomowej *in vitro* jest zidentyfikowanie substancji chemicznych, które powodują strukturalne aberracje chromosomowe w hodowanych komórkach ssaków (2) (3) (4). Strukturalne aberracje mogą występować w dwóch typach – chromosomowym lub chromatydowym. W trakcie przeprowadzania testów aberracji chromosomowych *in vitro* może wystąpić poliploidalność (w tym endoreduplikacja). Mimo że aneugeny mogą powodować poliploidalność, sama poliploidalność nie musi jednak świadczyć o właściwościach aneugenicznych i może stanowić po prostu skutek zaburzenia cyklu komórkowego lub cytotoxyczności (5). Celem niniejszego testu nie jest pomiar aneuploidii. W celu wykrycia aneuploidii zalecane będzie przeprowadzenie testu mikrojądrowego *in vitro* (6).

W badaniu aberracji chromosomowej w komórkach ssaków *in vitro* można wykorzystywać kultury ustanowionych linii komórkowych lub pierwotne hodowle komórek pochodzących od człowieka lub od gryzoni. Wykorzystywane komórki należy dobrać na podstawie ich zdolności do wzrostu w kulturach, stabilności kariotypu (w tym liczby chromosomów) oraz spontanicznych częstości występowania aberracji chromosomowych (7). W chwili obecnej dostępne dane nie pozwalają na opracowanie konkretnych zaleceń, ale wynika z nich, że istotne jest, aby podczas oceny zagrożeń stwarzanych przez substancje chemiczne wziąć pod uwagę status białka p53, stabilność genetyczną (kariotypową), zdolność do naprawy DNA oraz pochodzenie (od gryzoni lub od człowieka) komórek wybranych do badania. Zachęca się zatem użytkowników niniejszej metody badawczej do uwzględniania wpływu tych oraz innych właściwości komórek na zachowanie linii komórkowej przy wykrywaniu indukcji aberracji chromosomowych w miarę rozwoju wiedzy w tej dziedzinie.

Stosowane definicje znajdują się w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

Badania przeprowadzane *in vitro* wymagają zazwyczaj wykorzystania egzogenego źródła aktywacji metabolicznej, chyba że komórki są metabolicznie wydolne w odniesieniu do badanych substancji chemicznych. Egzogeny układ metabolizujący nie jest w stanie całkowicie naśladować warunków *in vivo*. Należy zachować ostrożność, aby uniknąć wystąpienia warunków, które mogą doprowadzić do zniekształconych wyników dodatnich, tj. uszkodzenia chromosomu niespowodowanego bezpośrednią interakcją między badanymi substancjami chemicznymi a chromosomami; do takich warunków zalicza się zmiany pH lub osmolalność (8) (9) (10), interakcje z elementami podłoża (11) (12) bądź zbyt wysokie poziomy cytotoxyczności (13) (14) (15) (16).

Test ten wykorzystuje się do wykrywania aberracji chromosomowych, które mogą wynikać ze zdarzeń klastogennych. Analizę indukcji aberracji chromosomowej należy przeprowadzić przy użyciu komórek w metafazie. Dlatego istotne jest, aby komórki przeszły mitozę zarówno w kulturach poddanych, jak i niepoddanych działaniu substancji chemicznej. W przypadku wytworzonych nanomateriałów konieczne może być specjalne dostosowanie niniejszej metody badawczej, które jednak nie zostało tu opisane.

Przed zastosowaniem niniejszej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się, czy zastosowanie niniejszej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak – dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny.

ZASADA BADANIA

Kultury komórkowe pochodzące od ludzi lub od innych ssaków poddaje się działaniu badanej substancji chemicznej zarówno z zastosowaniem egzogennej źródła aktywacji metabolicznej, jak i bez takiego źródła, pod warunkiem że nie wykorzystuje się komórek o odpowiednich zdolnościach metabolicznych (zob. pkt 13). W odpowiednich z góry określonych odstępach czasu po rozpoczęciu poddawania kultur komórkowych działaniu badanej substancji chemicznej są one poddawane działaniu substancji chemicznej zatrzymującej metafazę (np. colcemidu lub kolchicyny), następnie pobierane i barwione, a komórki w metafazie są analizowane pod mikroskopem na obecność aberracji typu chromatydowego i chromosomowego.

OPIS METODY

Przygotowania*Komórki*

Można korzystać z różnych linii komórkowych (np. komórek jajnika chomika chińskiego (CHO), komórek płucnych chomika chińskiego V79, komórek płucnych chomika chińskiego (CHL)/IU, TK6) lub pierwotnych hodowli komórek, w tym limfocytów krwi obwodowej ludzi lub innych ssaków (7). Należy przedstawić naukowe uzasadnienie wyboru linii komórkowych. Jeżeli stosowane są komórki pierwotne, ze względu na dobrostan zwierząt należy rozważyć użycie komórek pierwotnych pochodzących od ludzi, jeżeli jest to możliwe; należy je pobrać w zgodzie z zasadami etycznymi i przepisami mającymi zastosowanie do ludzi. Ludzkie limfocyty krwi obwodowej należy pozyskiwać od młodych (w wieku około 18–35 lat) niepalących osób, u których nie stwierdzono żadnych schorzeń oraz które nie były narażone w ostatnim czasie na czynniki genotoksyczne (tj. substancje chemiczne, promieniowanie jonizujące) w stopniu, który mógłby zwiększyć podstawową częstość występowania aberracji chromosomowych. Zagwarantuje to niską i stałą podstawową częstość występowania aberracji chromosomowych. Wyjściowa częstość występowania aberracji chromosomowych wzrasta wraz z wiekiem, a tendencja ta jest bardziej widoczna u kobiet niż u mężczyzn (17) (18). Jeżeli dla celów stosowania łączy się komórki pochodzące od większej liczby dawców niż jeden, należy wskazać liczbę dawców. Należy wykazać, że komórki uległy podziałowi w okresie od rozpoczęcia poddawania ich działaniu badanej substancji chemicznej do momentu pobrania próbek. Kultury komórkowe utrzymuje się w fazie wzrostu wykładniczego (linie komórkowe) bądź stymuluje się ich podział (pierwotne kultury limfocytów) celem narażenia komórek na działanie badanej substancji chemicznej w różnych stadiach cyklu komórkowego, ponieważ czułość stadiów komórek na badaną substancję chemiczną może być nieznana. Komórki pierwotne, które wymagają stymulacji mitogenami, aby się podzielić, zasadniczo nie podlegają synchronizacji podczas narażenia na działanie badanej substancji chemicznej (np. limfocyty ludzkie po 48-godzinnej stymulacji mitogenami). Wykorzystywanie zsynchronizowanych komórek podczas podawania badanej substancji chemicznej nie jest zalecane, ale może zostać zaakceptowane w uzasadnionych przypadkach.

Podłoża i warunki hodowli

W celu utrzymania kultur należy zastosować odpowiednie podłoże oraz warunki inkubacji (naczynia do hodowli komórkowych, wilgotne środowisko o zawartości CO₂ 5 %, w stosownych przypadkach, oraz temperatura inkubacji w wysokości 37 °C). Linie komórkowe powinny być rutynowo sprawdzane pod kątem stabilności zmiennej liczby chromosomów oraz nieobecności zanieczyszczenia *mykoplazmą* (7) (19), a komórki nie powinny być wykorzystywane, jeżeli są zanieczyszczone lub w przypadku, gdy zmienna liczba chromosomów uległa zmianie. Należy ustalić normalny czas trwania cyklu komórkowego linii komórkowych lub pierwotnych kultur wykorzystywanych w laboratorium badawczym, który powinien być zgodny z opublikowanymi właściwościami komórek (20).

Przygotowanie kultur

Linie komórkowe: komórki są rozmnażane z kultur wyjściowych i wysiewane na podłoże w takiej gęstości, by komórki w zawieszynie lub w jednowarstwowej hodowli komórek mogły nadal rosnąć wykładniczo aż do czasu pobrania (np. należy unikać konfluencji w przypadku komórek rosnących w jednowarstwowej hodowli komórek).

Limfocyty: krew pełną z antykoagulantem (np. heparyną) lub oddzielone limfocyty hoduje się (np. przez 48 godzin dla limfocytów ludzkich) w obecności mitogenu [np. fitohemaglutyniny (PHA) dla limfocytów ludzkich] w celu indukcji podziału komórek przed ich narażeniem na działanie badanej substancji chemicznej.

Aktywacja metaboliczna

Egzogenne układy metabolizujące należy stosować w przypadku, gdy stosuje się komórki o nieodpowiedniej endogennej wydolności metabolicznej. Najpowszechniej stosowanym układem, który jest domyślnie zalecany, jeżeli nie jest uzasadnione zastosowanie innego systemu, jest frakcja postmitochondrialna suplementowanego kofaktora (S9) przygotowywana z wątroby gryzoni (najczęściej szczurów) otrzymujących czynniki pobudzające enzymy takie jak Aroclor 1254 (21) (22) (23) lub kombinacja fenobarbitalu i β -naftoflawonu (24) (25) (26) (27) (28) (29). Ta ostatnia kombinacja nie pozostaje w sprzeczności z Konwencją sztokholmską w sprawie trwałych zanieczyszczeń organicznych (30) i okazała się równie skuteczna jak Aroclor 1254 w wywoływaniu oksydaz wieloczynnościowych (24) (25) (26) (28). Frakcja S9 jest zazwyczaj wykorzystywana w stężeniach w zakresie 1–2 % (objętościowo), ale stężenie to może być zwiększone do 10 % (obj.) w końcowym podłożu użytym do badania. Podczas poddawania zwierzęcia czynnikom należy unikać stosowania produktów, które zmniejszają indeks mitotyczny, a zwłaszcza czynników wiążących wapń (31). Klasa badanych substancji chemicznej może mieć wpływ na wybór rodzaju i stężenia egzogenego układu metabolizującego lub czynnika pobudzającego metabolizm.

Przygotowanie badanej substancji chemicznej

Badane substancje chemiczne w stanie stałym należy rozpuścić w odpowiednich rozpuszczalnikach oraz rozcieńczyć, jeżeli jest to odpowiednie, przed podaniem komórek ich działaniu (zob. pkt 23). Ciekłe substancje chemiczne można dodać do układu badawczego bezpośrednio lub rozcieńczyć przed podaniem do układu badawczego. Gazowe lub lotne substancje chemiczne należy badać za pomocą odpowiednich modyfikacji standardowych protokołów, takich jak poddawanie komórek działaniu substancji badanej w szczelnie zamkniętych naczyniach do hodowli komórkowych (32) (33) (34). Preparaty badanej substancji chemicznej należy przygotowywać tuż przed podaniem komórek jej działaniu, chyba że dane dotyczące stabilności wskazują, iż dopuszczalne jest składowanie substancji.

Warunki badania

Rozpuszczalniki

Rozpuszczalnik należy wybrać tak, aby zoptymalizować rozpuszczalność badanych substancji chemicznych, unikając niepożądanego wpływu na przeprowadzenie badania, np. zmiany wzrostu komórek, wpływu na spójność badanej substancji chemicznej, reakcji z naczyniami do hodowli komórkowych czy zakłócenia układu metabolizującego. Zaleca się, aby w miarę możliwości w pierwszej kolejności rozważyć zastosowanie wodnego rozpuszczalnika (lub podłoża). Sprawdzone rozpuszczalnikami są woda lub siarkowodór. Zasadniczo zawartość rozpuszczalników organicznych nie powinna przekraczać 1 % (obj.) a zawartość rozpuszczalników wodnych (soli fizjologicznej lub wody) w końcowym podłożu użytym do badania nie powinna przekroczyć 10 % (obj.). Jeżeli używane są niesprawdzone rozpuszczalniki (np. etanol czy aceton), ich użycie powinno być uzasadnione danymi, które potwierdzają ich zgodność z badanymi substancjami chemicznymi, układem badawczym oraz brak toksyczności genetycznej w zastosowanym stężeniu. W razie braku takich danych potwierdzających należy uwzględnić próby kontrolne niepoddawane działaniu substancji (zob. dodatek 1) w celu wykazania, że wybrany rozpuszczalnik nie wywołuje skutków szkodliwych lub klastogennych.

Pomiar proliferacji komórek i cytotoksyczności oraz wybór badanych stężeń

Przy ustalaniu najwyższego stężenia badanej substancji chemicznej należy unikać stężeń, które mogą dawać zniekształcone wyniki dodatnie, np. stężeń powodujących nadmierną cytotoksyczność (zob. pkt 22), strącanie substancji w podłożu (zob. pkt 23) i znaczne zmiany pH lub osmolalności (zob. pkt 5). Jeżeli badana substancja chemiczna powoduje znaczną zmianę pH podłoża w momencie dodania, pH może zostać dopasowane poprzez buforowanie końcowego podłoża użytego do badania, aby uniknąć zniekształconych wyników dodatnich i utrzymać odpowiednie warunki hodowli.

Dokonuje się pomiaru proliferacji komórek, aby upewnić się, że odpowiednia liczba komórek poddanych działaniu substancji przeszła mitozę podczas testu oraz że substancja chemiczna jest podawana przy odpowiednim poziomie cytotoksyczności (zob. pkt 18 i 22). Cytotoksyczność powinna zostać określona w ramach głównego doświadczenia z użyciem aktywacji metabolicznej lub bez niej, przy wykorzystaniu odpowiedniego wskazania dotyczącego śmierci i wzrostu komórek. Chociaż ocena cytotoksyczności w badaniu wstępnym może być przydatna w lepszym określeniu stężeń, które mają zostać użyte w głównym doświadczeniu, badanie wstępne nie jest obowiązkowe. Jeżeli taka ocena zostanie przeprowadzona, nie może ona zastąpić pomiaru cytotoksyczności w głównym doświadczeniu.

Względne podwojenie populacji (RPD) lub względny wzrost liczby komórek (RICC) to odpowiednie metody oszacowania cytotoksyczności w badaniach cytogenetycznych (13) (15) (35) (36) (55) (zob. wzory w dodatku 2). W przypadku długoterminowego poddania działaniu substancji chemicznej i pobierania próbek po rozpoczęciu podawania substancji chemicznej w czasie dłuższym niż 1,5-krotność normalnego czasu trwania cyklu komórkowego (tj. w sumie dłużej niż 3-krotność czasu trwania cyklu komórkowego) RPD może prowadzić do niedoszacowania cytotoksyczności (37). W takich warunkach RICC może być lepszą miarą; pomocne oszacowanie z wykorzystaniem RPD może również zapewnić ocenę cytotoksyczności po 1,5-krotności normalnego czasu trwania cyklu komórkowego.

W przypadku limfocytów z pierwotnych hodowli chociaż indeks mitotyczny jest miarą skutków cytotoksycznych/cytostatycznych, może mieć na niego wpływ czas po podaniu substancji chemicznej, wykorzystany mitogen i ewentualne zakłócenie cyklu komórkowego. Indeks mitotyczny jest jednak akceptowalny, ponieważ inne miary cytotoksyczności mogą być niewiarygodne i niepraktyczne oraz mogą nie mieć zastosowania do docelowej populacji limfocytów zwiększającej się w reakcji na stymulację PHA.

Chociaż RICC i RPD dla linii komórkowych i indeks mitotyczny pierwotnej hodowli limfocytów są zalecanymi parametrami cytotoksyczności, inne wskaźniki (np. integralność komórek, apoptoza, martwica, cykl komórkowy) mogą zapewnić przydatne informacje dodatkowe.

Należy ocenić co najmniej trzy badane stężenia (poza kontrolami z rozpuszczalnikiem i kontrolami dodatnimi), które spełniają kryteria dopuszczalności (odpowiednia cytotoksyczność, liczba komórek itp.). Bez względu na rodzaj komórek (linie komórkowe bądź pierwotne kultury limfocytów) przy każdym badanym stężeniu można stosować zarówno zduplikowane, jak i pojedyncze kultury poddane działaniu substancji. Mimo że zalecane jest stosowanie zduplikowanych kultur, dopuszczalne jest również stosowanie pojedynczych kultur, pod warunkiem że policzono taką samą całkowitą liczbę komórek w przypadkach zarówno kultur pojedynczych, jak i zduplikowanych. Zastosowanie pojedynczych kultur jest szczególnie uzasadnione, jeżeli ocenie poddaje się więcej niż 3 stężenia (zob. pkt 31). Wyniki uzyskane na podstawie niezależnych zduplikowanych kultur przy danym stężeniu można łączyć na potrzeby analizy danych (38). W przypadku badanych substancji chemicznych wykazujących niewielką cytotoksyczność lub niewykazujących żadnej cytotoksyczności na ogół odpowiednie będzie zastosowanie 2–3-krotnych przedziałów stężenia. W przypadku wystąpienia cytotoksyczności wybrane badane stężenia powinny obejmować zakres rozpoczynający się od stężenia, które wykazuje cytotoksyczność, jak opisano w pkt 22, oraz uwzględniający stężenia, w których wystąpiła umiarkowana i niewielka cytotoksyczność lub nie wystąpiła żadna cytotoksyczność. Wiele badanych substancji chemicznych wykazuje gwałtowny wzrost krzywych stężenie-odpowiedź, w związku z czym aby uzyskać dane przy niskiej i umiarkowanej cytotoksyczności lub aby szczegółowo zbadać zależność dawka-odpowiedź, konieczne będzie zastosowanie stężeń o bardziej zbliżonych wartościach lub więcej niż trzech stężeń (kultury pojedyncze lub zduplikowane), w szczególności w sytuacjach, w których wymagane jest powtórzenie doświadczenia (zob. pkt 47).

Jeżeli maksymalne stężenie opiera się na cytotoksyczności, najwyższe stężenie powinno dążyć do osiągnięcia cytotoksyczności na poziomie $55 \pm 5\%$ przy wykorzystaniu zalecanych parametrów cytotoksyczności (tj. zmniejszenie RICC i RPD dla linii komórkowych i zmniejszenie indeksu mitotycznego pierwotnych hodowli limfocytów do poziomu $45 \pm 5\%$ jednoczesnej kontroli ujemnej). Należy zachować ostrożność w interpretowaniu wyników dodatnich, które wystąpiły wyłącznie w górnym przedziale tego zakresu cytotoksyczności $55 \pm 5\%$ (13).

Dla słabo rozpuszczalnych badanych substancji chemicznych, które nie wykazują cytotoksyczności w stężeniach niższych od najniższego stężenia nierozpuszczalnego, najwyższe badane stężenie powinno spowodować mętność lub osad widoczny gołym okiem lub przez mikroskop w układzie odwróconym pod koniec podawania badanej substancji chemicznej. Nawet jeżeli cytotoksyczność wystąpi dla stężeń powyżej najniższego stężenia nierozpuszczalnego, zaleca się przeprowadzenie testu tylko dla jednego stężenia powodującego mętność bądź wytrącenie się widocznego osadu, ponieważ osad może spowodować pojawienie się wyników zniekształconych. W przypadku stężenia powodującego powstanie osadu należy zadbać o to, aby pojawienie się osadu nie zakłóciło przebiegu testu (np. barwienia lub oceny). Pomocne może się okazać określenie rozpuszczalności podłoża przed wykonaniem doświadczenia.

Jeżeli nie zaobserwowano żadnego osadu ani ograniczenia cytotoksyczności, najwyższe badane stężenie powinno odpowiadać 10 mM, 2 mg/ml lub 2 µl/ml w zależności od tego, która z tych wartości jest najniższa (39) (40) (41). Jeżeli badana substancja chemiczna nie ma określonego składu, np. substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne (UVCB) (42), wyciągi pochodzące ze środowiska itp., może być konieczne podwyższenie (np. do 5 mg/ml) najwyższego stężenia w przypadku braku dostatecznej cytotoksyczności, tak aby zwiększyć stężenie każdego ze składników. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że wymagania te mogą się różnić w przypadku produktów leczniczych przeznaczonych dla ludzi (43).

Kontrole

Dla każdego czasu pobrania należy włączyć jednoczesną kontrolę ujemną (zob. pkt 15), obejmującą sam rozpuszczalnik w podłożu użytym do badania, w ramach której test przeprowadza się w identyczny sposób, jak w przypadku kultur poddanych działaniu substancji.

Jednoczesna kontrola dodatnia jest konieczna, aby wykazać zdolność laboratorium do zidentyfikowania klastogenów w warunkach określonych w stosowanym protokole badania oraz skuteczność egzogenego układu metabolizującego, w stosownych przypadkach. Przykładowe substancje służące do kontroli dodatniej są przedstawione poniżej w tabeli 1. W uzasadnionych przypadkach dopuszcza się zastosowanie alternatywnych substancji chemicznych służących do kontroli dodatniej. Ponieważ testy na komórkach ssaków *in vitro* pod kątem toksyczności genetycznej są w dostatecznym stopniu ustandaryzowane, zastosowanie kontroli dodatniej można ograniczyć do klastogenu wymagającego aktywacji metabolicznej. W tym przypadku pojedyncza reakcja klastogenna w ramach kontroli dodatniej wykaże zarówno aktywność układu metabolizującego, jak i reaktywność układu badawczego, pod warunkiem że odbywa się jednocześnie z nieaktywowanym testem o takim samym czasie podawania badanej substancji. W przypadku długoterminowego poddawania działaniu substancji chemicznej (bez S9) należy zastosować jednak oddzielną kontrolę dodatnią, ponieważ czas podawania badanej substancji chemicznej będzie się różnił od czasu w badaniu z wykorzystaniem aktywacji metabolicznej. Każdą kontrolę dodatnią należy zastosować przy co najmniej jednym stężeniu, od którego oczekuje się wytworzenia odtwarzalnego oraz wykrywalnego wzrostu wykraczającego poza poziom wyjściowy, w celu wykazania czułości układu badawczego (tj. efekty są jasne, ale nie ujawniają badającemu bezpośrednio tożsamości zakodowanych szkiełek mikroskopowych), a reakcja nie powinna być zakłócona cytotoksycznością wykraczającą poza limity określone w niniejszej metodzie badawczej.

Tabela 1

Chemiczne substancje odniesienia zalecane do oceny biegłości laboratorium oraz do wyboru substancji do kontroli dodatniej

Kategoria	Substancja chemiczna	Numer CAS
1. Klastogeny aktywne bez aktywacji metabolicznej		
	Metanosulfonian metylu	66-27-3
	Mitomycyna C	50-07-7
	N-tlenek 4-nitrochinoliny	56-57-5
	Arabinozyd cytozyny	147-94-4
2. Klastogeny wymagające aktywacji metabolicznej		
	Benzo[a]piren	50-32-8
	Cyklofosfamid	50-18-0

PROCEDURA

Poddanie działaniu substancji chemicznej

Rozmnażające się komórki są poddawane działaniu badanej substancji chemicznej w obecności układu metabolizującego oraz przy jego braku.

Czas pobrania kultury komórkowej

W celu gruntownej oceny, która jest niezbędna do potwierdzenia wyniku ujemnego, należy przeprowadzić doświadczenie we wszystkich trzech następujących warunkach z zastosowaniem krótkoterminowego poddawania działaniu substancji chemicznej z aktywacją metaboliczną i bez niej oraz długoterminowego poddawania działaniu substancji bez aktywacji metabolicznej (zob. pkt 43, 44 i 45):

- komórki należy poddawać działaniu badanej substancji chemicznej bez aktywacji metabolicznej przez 3–6 godzin, a następnie należy pobrać próbki w czasie równoważnym około 1,5-krotności normalnego czasu trwania cyklu komórkowego po rozpoczęciu poddawania działaniu substancji (18);
- komórki należy poddawać działaniu badanej substancji chemicznej z użyciem aktywacji metabolicznej przez 3–6 godzin, a następnie należy pobrać próbki w czasie równoważnym około 1,5–2-krotności normalnego czasu trwania cyklu komórkowego po rozpoczęciu poddawania działaniu substancji (18);
- komórki powinny być nieprzerwanie poddawane działaniu badanej substancji chemicznej bez aktywacji metabolicznej aż do pobrania próbek w czasie równoważnym około 1,5-krotności normalnego czasu trwania cyklu komórkowego. Niektóre substancje chemiczne (np. analogi nukleozydowe) mogą być łatwiej wykryte w okresie podawania substancji chemicznej/pobierania próbek, który jest dłuższy niż 1,5-krotność normalnego czasu trwania cyklu komórkowego (24).

Jeżeli którekolwiek z powyższych warunków doświadczalnych wywołały reakcję dodatnią, badanie któregośkolwiek z pozostałych schematów poddawania działaniu substancji chemicznej może okazać się zbędne.

Przygotowanie chromosomów

Kultury komórkowe są poddawane działaniu colcemidu lub kolchicyny zazwyczaj przez 1–3 godzin przed pobraniem komórek. Każda kultura komórkowa jest pobierana oraz poddawana działaniu substancji oddzielnie w celu przygotowania chromosomów. Przygotowanie chromosomów obejmuje hipotoniczne poddawanie komórek działaniu substancji chemicznej, utrwalanie oraz wybarwienie. Po upływie 3–6-godzin poddawania działaniu substancji w jednowarstwowych hodowlach komórek mogą być obecne komórki mitotyczne (można je rozpoznać po okrągłym kształcie i fakcie, że oddzielają się od powierzchni). Z uwagi na łatwość oddzielania się komórek mitotycznych można je utracić w momencie usuwania podłoża zawierającego badaną substancję chemiczną. Jeżeli istnieją dowody na znaczny wzrost liczby komórek mitotycznych w porównaniu z próbkami kontrolnymi, co wskazuje na prawdopodobieństwo zatrzymania mitozy, należy zebrać komórki poprzez odwirowanie i dodać je z powrotem do hodowli, aby w czasie poboru uniknąć utraty komórek będących w fazie mitozy i zagrożonych aberracją chromosomową.

Analiza

Wszystkie preparaty, w tym te stanowiące kontrolę dodatnią i ujemną, należy niezależnie zakodować przed przeprowadzeniem analizy mikroskopowej aberracji chromosomowych. Ze względu na fakt, że procedury utrwalania często skutkują odsetkiem komórek w metafazie, które utraciły chromosomy, zliczone komórki powinny zatem zawierać liczbę centromerów równą liczbie modalnej ± 2 .

Należy ocenić co najmniej 300 dobrze rozciągniętych metafaz na stężenie oraz grupę kontrolną, aby uznać, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie ujemny (zob. pkt 45). Wspomniane 300 komórek należy równo podzielić między kontrpróby w przypadku wykorzystania zduplikowanych kultur. W przypadku stosowania pojedynczych kultur na każde stężenie (zob. pkt 21) w takiej pojedynczej kulturze należy ocenić co najmniej 300 dobrze rozciągniętych metafaz. Ocena 300 komórek przynosi korzyść w postaci zwiększenia mocy statystycznej testu, a ponadto rzadko obserwowane są wartości zerowe (oczekuje się zaledwie 5 %) (44). Liczbę zliczanych metafaz można zmniejszyć w przypadku odnotowania dużej liczby komórek z aberracjami chromosomowymi oraz w przypadku uznania badanej substancji chemicznej za dającą wynik wyraźnie dodatni.

Należy ocenić ilościowo komórki ze strukturalnymi aberracjami chromosomowymi, z uwzględnieniem lub z pominięciem przerw. Terminy „złamanie” i „przerwa” są zdefiniowane w dodatku 1 zgodnie z (45) (46). Aberracje typu chromatydowego i chromosomowego należy odnotowywać oddzielnie i klasyfikować według podtypów (złamania, wymiany). Procedury stosowane w laboratorium powinny zapewniać przeprowadzanie analizy aberracji chromosomowych przez odpowiednio przeszkolonych pracowników odpowiadających za zliczanie oraz – w stosownych przypadkach – poddanie wyników tej analizy wzajemnej ocenie.

Mimo że badanie przeprowadza się w celu wykrycia strukturalnych aberracji chromosomowych, należy pamiętać o konieczności odnotowywania częstości występowania poliploidalności i endoreduplikacji, jeżeli zaobserwowano wystąpienie tych zjawisk. (Zob. pkt 2).

Biegłość laboratorium

Aby ustalić wystarczające doświadczenie laboratorium w zakresie omawianego testu przed zastosowaniem go w rutynowych badaniach, laboratorium powinno wcześniej przeprowadzić szereg doświadczeń z wykorzystaniem substancji chemicznych służących do kontroli dodatniej, działających za pomocą różnych mechanizmów i różnych kontroli ujemnych (z wykorzystaniem różnych rozpuszczalników/nośników). Reakcje otrzymane w wyniku takiej kontroli dodatniej i ujemnej powinny odpowiadać reakcjom opisanym w literaturze. Nie dotyczy to laboratoriów, które dysponują odpowiednim doświadczeniem, tj. laboratoriów prowadzących bazę danych historycznych, o której mowa w pkt 37.

Aby wykazać biegłość w zakresie wykrywania klastogennych substancji chemicznych i określić skuteczność układu metabolizującego, należy zbadać szereg substancji chemicznych służących do kontroli dodatniej (zob. tabela 1 w pkt 26) przy krótkoterminowym i długoterminowym poddawaniu działaniu substancji chemicznej przy braku aktywacji metabolicznej oraz przy krótkoterminowym poddawaniu działaniu substancji chemicznej w obecności aktywacji metabolicznej. Należy dobrać szereg stężeń wybranych substancji chemicznych, tak aby uzyskać powtarzalne i powiązane ze stężeniem wzrosty wykraczające poza poziom wyjściowy w celu wykazania czułości i zakresu oznaczania układu badawczego.

Dane historyczne dotyczące kontroli

Laboratorium powinno ustalić:

- zakres i rozkład historycznych wyników kontroli dodatniej,
- zakres i rozkład historycznych wyników kontroli ujemnej (bez poddania działaniu substancji chemicznej, z rozpuszczalnikami).

Przy pierwszym gromadzeniu danych dotyczących rozkładu historycznych wyników kontroli ujemnej wyniki jednoczesnej kontroli ujemnej powinny być zgodne z opublikowanymi danymi dotyczącymi kontroli, o ile takie dane istnieją. W miarę dodawania kolejnych danych doświadczalnych do rozkładu kontroli jednoczesne kontrole ujemne powinny w idealnych warunkach mieścić się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % dla tego rozkładu (44) (47). Prowadzona przez dane laboratorium baza danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej powinna wyjściowo zawierać dane z co najmniej 10 doświadczeń, a najlepiej z co najmniej 20 doświadczeń przeprowadzonych w porównywalnych warunkach doświadczalnych. Laboratoria powinny stosować metody kontroli jakości, takie jak karty kontrolne (np. karty C lub karty X-średnie (48)) w celu określania stopnia zmienności gromadzonych przez nie danych dotyczących kontroli dodatniej i ujemnej oraz w celu wykazania, że stosowana przez nie metodologia jest „pod kontrolą” (44). Dalsze zalecenia dotyczące sposobu gromadzenia i wykorzystywania danych historycznych (tj. kryteria włączania danych do zbioru danych historycznych i wykluczania danych z tego zbioru oraz kryteria dopuszczalności dla danego doświadczenia) można znaleźć w literaturze (47).

Wszelkie zmiany w protokole doświadczalnym należy rozpatrywać pod kątem ich spójności z dotychczas prowadzonymi przez laboratorium bazami danych historycznych dotyczących kontroli. Wszelkie poważne niespójności powinny skutkować utworzeniem nowej bazy danych historycznych dotyczących kontroli.

Dane dotyczące kontroli ujemnej powinny obejmować częstość występowania komórek z aberracjami chromosomowymi w pojedynczej kulturze lub w ramach sumy zduplikowanych kultur, jak opisano w pkt 21. Jednoczesne kontrole ujemne powinny w idealnych warunkach mieścić się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % dla rozkładu danych zawartych w prowadzonej przez laboratorium bazie danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (44) (47). W przypadku gdy dane dotyczące jednoczesnej kontroli ujemnej znajdują się poza granicami kontrolnymi wyznaczającymi przedział 95 %, włączenie ich do rozkładu kontroli historycznej może być dopuszczalne, pod warunkiem że dane te nie stanowią skrajnych obserwacji nietypowych oraz że istnieją dowody świadczące o tym, iż dany układ badawczy znajduje się „pod kontrolą” (zob. pkt 37), a także dowody wykluczające błąd techniczny czy ludzki.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Przedstawienie wyników

Należy ocenić ilościowo odsetek komórek ze strukturalnymi aberracjami chromosomowymi. Aberracje typu chromosomowego i chromatydowego sklasyfikowane według podtypów (złamania, wymiany) należy wyszczególnić oddzielnie, podając ich liczbę i częstość występowania w kulturach doświadczalnych i kontrolnych. Przerwy odnotowuje się i zgłasza odrębnie, przy czym nie bierze się ich pod uwagę przy ustalaniu ogólnej częstości występowania aberracji. Odsetek komórek, w których odnotowano poliploidalność lub endoreduplikację, zgłasza się, jeżeli zostaną zaobserwowane.

Należy odnotowywać jednoczesne pomiary cytotoksyczności w odniesieniu do wszystkich kultur poddanych działaniu substancji chemicznej, kultur kontroli ujemnej i kultur kontroli dodatniej w ramach głównego doświadczenia lub głównych doświadczeń aberracji.

Należy dostarczyć dane dotyczące poszczególnych kultur. Dodatkowo wszystkie dane należy podsumować w postaci tabeli.

Kryteria dopuszczalności

Dopuszczalność testu ocenia się na podstawie następujących kryteriów:

- uznaje się, że dopuszczalne jest włączenie danych dotyczących jednoczesnej kontroli ujemnej do prowadzonej przez laboratorium bazy danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej, jak opisano w pkt 39;
- jednoczesne kontrole dodatnie (zob. pkt 26) powinny wywoływać reakcje zgodne z reakcjami odnotowanymi w bazie danych historycznych dotyczących kontroli dodatniej i wykazywać statystycznie istotny wzrost w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną;
- kryteria proliferacji komórek w kontroli z rozpuszczalnikiem powinny zostać spełnione (pkt 17 i 18);
- zbadano wszystkie warunki doświadczalne do momentu uzyskania w jednych z nich wyników dodatnich (zob. pkt 28);
- można poddać analizie wystarczającą liczbę komórek i stężeń (pkt 31 i 21);
- kryteria wyboru najwyższego stężenia są spójne z kryteriami opisanymi w pkt 22, 23 i 24.

Ocena i interpretacja wyników

O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie dodatni, jeżeli w dowolnych ze zbadanych warunków doświadczalnych (zob. pkt 28):

- a) co najmniej jedno z badanych stężeń wykazuje statystycznie istotny wzrost w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną,
- b) ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu tendencji pokazuje, że wzrost jest powiązany z dawką,
- c) którykolwiek wynik znajduje się poza rozkładem danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (np. poza granicami kontrolnymi wyznaczającymi przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona; zob. pkt 39).

W przypadku gdy wszystkie wspomniane kryteria są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna jest w stanie wywołać aberracje chromosomowe w kulturze komórek ssaków w danym układzie badawczym. Zalecenia dotyczące najodpowiedniejszych metod statystycznych można znaleźć w literaturze (49) (50) (51).

O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie ujemny, jeżeli we wszystkich zbadanych warunkach doświadczalnych (zob. pkt 28):

- a) żadne z badanych stężeń nie wykazuje statystycznie istotnego wzrostu w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną,

- b) ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu tendencji pokazuje, że wzrost nie jest powiązany ze stężeniem,
- c) wszystkie wyniki mieszczą się w rozkładzie danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (np. w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona; zob. pkt 39).

Badaną substancję chemiczną uznaje się następnie za niezdolną do wywołania aberracji chromosomowych w kulturze komórek ssaków w danym układzie badawczym.

Weryfikacja wyraźnie dodatniej lub ujemnej reakcji nie jest wymagana.

Jeżeli reakcja nie jest ani wyraźnie ujemna, ani wyraźnie dodatnia, jak opisano powyżej, oraz aby ułatwić ustalenie biologicznego znaczenia wyniku, dane powinny zostać ocenione na podstawie opinii eksperta lub wyników dalszych badań. Przydatna może być ocena dodatkowych komórek (w stosownych przypadkach) lub powtórne przeprowadzenie doświadczenia, potencjalnie z zastosowaniem zmienionych warunków doświadczalnych (np. odstępów czasu między stężeniami, innych warunków aktywacji metabolicznej (tj. stężenie S9 lub pochodzenie S9)).

W rzadkich przypadkach nawet po przeprowadzeniu dalszych badań uzyskany zbiór danych uniemożliwi uznanie wyników za dodatnie lub ujemne i w takiej sytuacji reakcja badanej substancji chemicznej zostanie uznana za niejednoznaczna.

Wzrost liczby komórek poliploidalnych może świadczyć o tym, że badane substancje chemiczne mogą potencjalnie hamować procesy mitotyczne oraz indukować aberracje liczby chromosomów (52). Wzrost liczby komórek z endoreduplikowanymi chromosomami może świadczyć o tym, że badane substancje chemiczne mogą potencjalnie hamować przebieg cyklu komórkowego (53) (54) (zob. pkt 2). Dlatego też częstość występowania komórek poliploidalnych i komórek z endoreduplikowanymi chromosomami należy odnotowywać oddzielnie.

Sprawozdanie z badania

Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna:

- źródło, numer partii, data graniczna do użytku, jeżeli jest dostępna;
- stabilność badanej substancji chemicznej, jeżeli jest znana;
- rozpuszczalność i stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku, jeżeli są znane;
- pomiar pH, osmolalności i osadu w podłożu, do którego dodano badaną substancję chemiczną, w stosownych przypadkach.

Substancja jednoskładnikowa:

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

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:

- opisane w miarę możliwości poprzez podanie nazwy systematycznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

Rozpuszczalnik:

- uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika,
- należy wskazać również zawartość procentową rozpuszczalnika w końcowym podłożu.

Komórki:

- rodzaj i źródło komórek;
- cechy kariotypu oraz odpowiedniość wykorzystywanych rodzajów komórek;
- nieobecność mykoplazmy w przypadku linii komórkowych;
- w przypadku linii komórkowych – informacje na temat czasu trwania cyklu komórkowego, czasu podwojenia lub wskaźnika proliferacji;
- płeć, wiek i wszelkie inne istotne informacje na temat dawców krwi, krew pełna lub oddzielone limfocyty, wykorzystany mitogen;
- w przypadku linii komórkowych – liczba pasaży, o ile informacje na ten temat są dostępne;
- w przypadku linii komórkowych – metody utrzymania kultur komórkowych;
- w przypadku linii komórkowych – modalna liczba chromosomów.

Warunki badania:

- nazwa substancji chemicznej zatrzymującej metafazę, jej stężenie oraz okres narażenia komórek na działanie tej substancji;
- stężenie badanej substancji chemicznej wyrażone jako stężenie końcowe w podłożu (np. µg lub mg/mL lub mM podłoża);
- uzasadnienie wyboru stężeń oraz liczby kultur, z uwzględnieniem np. danych dotyczących cytotoksyczności oraz granic rozpuszczalności;
- skład podłoża, w stosownych przypadkach stężenie CO₂, poziom wilgotności;
- stężenie (lub objętość) rozpuszczalnika i badanej substancji chemicznej dodanych do podłoża;
- temperatura inkubacji;
- czas inkubacji;
- czas poddawania działaniu substancji chemicznej;
- czas pobrania po podaniu substancji chemicznej;
- w stosownych przypadkach zagęszczenie komórek w czasie osadzania;
- typ oraz skład układu metabolizującego (źródło frakcji S9, metoda przygotowania preparatu frakcji S9, stężenie lub objętość preparatu frakcji S9 i frakcji S9 w końcowym podłożu, kontrole jakości frakcji S9);
- substancje chemiczne służące do kontroli dodatniej i ujemnej, stężenia końcowe w poszczególnych warunkach poddawania działaniu substancji chemicznej;
- metody przygotowywania preparatów oraz stosowane techniki barwienia;
- kryteria dopuszczalności metod oznaczania zawartości;
- kryteria oceny aberracji;
- liczba przeanalizowanych metafaz;
- metody pomiaru cytotoksyczności;
- wszelkie informacje uzupełniające istotne w kontekście cytotoksyczności i stosowanej metody;
- kryteria uznawania wyników badań za dodatnie, ujemne lub niejednoznaczne;
- metody stosowane w celu ustalenia poziomu pH, osmolalności i strącania.

Wyniki:

- liczba komórek poddanych działaniu substancji chemicznej i liczba komórek pobranych z każdej kultury w przypadku zastosowania linii komórkowych;
- wyniki pomiaru cytotoksyczności, np. RPD, RICC, indeks mitotyczny, ewentualne inne obserwacje;
- w przypadku linii komórkowych – informacje na temat czasu trwania cyklu komórkowego, czasu podwojenia lub wskaźnika proliferacji;
- oznaki strącania i czas oznaczenia;
- definicja aberracji, w tym przerw;
- liczba ocenionych komórek, liczba komórek z aberracjami chromosomowymi i rodzaj aberracji chromosomowych podany osobno dla każdej hodowli poddanej działaniu substancji chemicznej i dla każdej hodowli kontrolnej, z uwzględnieniem i z pominięciem przerw;
- zmiany ploidalności (podane osobno dla komórek poliploidalnych i dla komórek z endoreduplikowanymi chromosomami), jeżeli zaobserwowano takie zmiany;
- w stosownych przypadkach zależność stężenie-odpowiedź;
- dane dotyczące jednoczesnych kontroli ujemnych (rozpuszczalnik) i dodatnich (stężenia i rozpuszczalniki);
- dane historyczne dotyczące kontroli ujemnej (z rozpuszczalnikiem) i dodatniej wraz z zakresami, średnimi oraz odchyleniami standardowymi oraz granice kontrolne wyznaczające przedział 95 % dla rozkładu, uwzględniając ilość danych;
- analizy statystyczne, ewentualne p-wartości.

Omówienie wyników.**Wnioski.****BIBLIOGRAFIA**

- (1) OECD, „Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015”, Publikacje OECD na temat środowiska, seria dotycząca badań i oceny, nr 234, OECD, Paryż.
- (2) Evans, H.J. (1976), „Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens”, w: *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, t. 4, Hollaender, A. (red.), Plenum Press, Nowy Jork i Londyn, s. 1–29.
- (3) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni (1985), The *in vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture, w: *Progress in Mutation Research*, t. 5, Ashby, J. et al. (red.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam-Nowy Jork-Oksford, s. 427–432.
- (4) Galloway, S.M. et al. (1987), Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 10 / suplement 10, s. 1–175.
- (5) Muehlbauer, P.A. et al. (2008), „Improving dose selection and identification of aneugens in the *in vitro* chromosome aberration test by integration of flow cytometry-based methods”, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 49/4, s. 318–327.
- (6) Rozdział B.49 niniejszego załącznika: *Test mikrojądrowy na komórkach ssaków in vitro*.
- (7) Opracowanie ILSI (projekt), Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, F. Darroudi, M. Honma, A. Czich, J van Benthem, S. Galloway, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, D.J. Kirkland, Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing.
- (8) Scott, D. et al. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. Sprawozdanie 9. grupy zadaniowej ICMPEMC, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, t. 257/2, s. 147–204.

- (9) Morita, T. *et al.* (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, t. 268/2, s. 297–305.
- (10) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 8/6, s. 789–886.
- (11) Long, L.H. *et al.* (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 Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, t. 634/1–2, s. 177–183.
- (12) Nesslany, F. *et al.* (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrotriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 49/6, s. 439–452.
- (13) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 35/3, s. 191–201.
- (14) Kirkland, D. *et al.* (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 Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, t. 584/1–2, s. 1–256.
- (15) Greenwood, S. *et al.* (2004), Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 43/1, s. 36–44.
- (16) Hilliard, C.A. *et al.* (1998), Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 31/4, s. 316–326.
- (17) Hedner K. *et al.* (1982), Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex, *Human Genetics*, t. 62, s. 305–309.
- (18) Ramsey M.J. *et al.* (1995), The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutation Research*, t. 338, s. 95–106.
- (19) Coecke S. *et al.* (2005), Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, t. 33/3, s. 261–287.
- (20) Henderson, L. *et al.* (1997), Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, *Mutagenesis*, t. 12/3, s. 163–167.
- (21) Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, t. 31/6, s. 347–363.
- (22) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, t. 113/3–4, s. 173–215.
- (23) Natarajan, A.T. *et al.* (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 Research*, t. 37/1, s. 83–90.
- (24) Matsuoka, A., M. Hayashi, M. Jr. Ishidate (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *in vitro*, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, t. 66/3, s. 277–290.
- (25) 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, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, t. 4/1, s. 55–65.

- (26) Elliot, B.M. *et al.* (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, t. 7/3, s. 175–177.
- (27) Matsushima, T. *et al.* (1976), „A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems”, w *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al.* (red.), Elsevier, North-Holland, s. 85–88.
- (28) Galloway, S.M. *et al.* (1994). Report from Working Group on *in vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, t. 312/3, s. 241–261.
- (29) Johnson, T.E., D.R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 28/1, s. 51–59.
- (30) UNEP (2001), Konwencja sztokholmska w sprawie trwałych zanieczyszczeń organicznych, Program Narodów Zjednoczonych ds. Ochrony Środowiska (UNEP). Dostępny na stronie internetowej: <http://www.pops.int/>.
- (31) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes, *Mutation Research*, t. 190/3, s. 225–8.
- (32) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982), „CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids”, w: *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (red.), Plenum, Nowy Jork, s. 91–103.
- (33) Zamora, P.O. *et al.* (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 5/6, s. 795–801.
- (34) Asakura, M. *et al.* (2008), An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, *Mutation Research*, t. 652/2, s. 122–130.
- (35) Lorge, E. *et al.* (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, t. 655/1-2, s. 1–3.
- (36) Galloway, S. *et al.* (2011), Workshop summary: Top concentration for *in vitro* mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for *in vitro* cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, t. 723/2, s. 77–83.
- (37) Honma, M. (2011), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, t. 724/1-2, s. 86–87.
- (38) Richardson, C. *et al.* (1989), *Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays. W: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (red.) Cambridge University Press, Cambridge, s. 141–154.
- (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 (wytyczne dotyczące badań 473, 476 i 487) ENV/JM/TG(2014)17. Dostępny na wniosek.
- (40) Morita, T., M. Honma, K. Morikawa (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 Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, t. 741/1-2, s. 32–56.
- (41) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *in vitro* chromosome aberrations assay. In Vitro Chromosome Aberrations Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 54/1, s. 36–43.

- (42) EPA, Urząd ds. Bezpieczeństwa Substancji Chemicznych i Zapobiegania Zanieczyszczeniom (2011), Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances, <http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt>.
 - (43) USFDA (2012), International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Dostępny na stronie internetowej: <https://federalregister.gov/a/2012-13774>.
 - (44) OECD (2014), „Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines”, Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria OECD dotycząca badań i oceny nr 198, OECD Publishing, Paryż.
 - (45) ISCN (2013), *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Schaffer, L.G., J. MacGowan-Gordon, M. Schmid (red.), Karger Publishers Inc., Connecticut.
 - (46) Scott, D. *et al.* (1990), Metaphase chromosome aberration assays *in vitro*, w: *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*, Kirkland, D.J. (red.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 62–86.
 - (47) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research*, t. 723/2, s. 87–90.
 - (48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, wyd. II, John Wiley and Sons, Nowy Jork.
 - (49) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*, wyd. III, John Wiley & Sons, Nowy Jork.
 - (50) Galloway, S.M. *et al.* (1987), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 10 / suplement 10, s. 1–175.
 - (51) Richardson, C. *et al.* (1989), „Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays”, w *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (red.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 141–154.
 - (52) Warr, T.J., E.M. Parry, J.M. Parry (1993), A comparison of two *in vitro* mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens, *Mutation Research*, t. 287/1, s. 29–46.
 - (53) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Research*, t. 119/3, s. 403–413.
 - (54) Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), Aphidicolin – induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Research*, t. 43/3, s. 1362–1364.
 - (55) Soper, K.A., S.M. Galloway (1994), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research*, t. 312, s. 139–149.
-

Dodatek 1

DEFINICJE

Aneuploidia: wszelkie odchylenia od zwykłej diploidalnej (lub haploidalnej) liczby chromosomów w pojedynczym chromosomie lub w większej ich liczbie, ale nie w całym zestawie czy całych zestawach chromosomów (poliploidalność).

Apoptoza: zaprogramowana śmierć komórki, na którą składa się szereg etapów prowadzących do rozpadu komórek w cząstki otoczone błoną, które są następnie eliminowane przez fagocytozę lub wydalanie.

Proliferacja komórek: wzrost liczby komórek w wyniku mitotycznego podziału komórek.

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

Złamanie chromatydowe: przerwanie ciągłości pojedynczej chromatyd, w której wyraźnie doszło do wypaczenia jednej z chromatyd.

Przerwa chromatydowa: niebarwiący obszar (achromatyczne uszkodzenie) pojedynczej chromatyd, w którym doszło do nieznacznego wypaczenia chromatyd.

Aberracja typu chromatydowego: strukturalne uszkodzenie chromosomu wyrażone jako złamanie pojedynczych chromatyd lub złamanie i ponowne połączenie się chromatyd.

Aberracja typu chromosomowego: strukturalne uszkodzenie chromosomu wyrażone jako złamanie chromatyd lub złamanie i ponowne połączenie się obu chromatyd w tym samym miejscu.

Klastogen: każda substancja chemiczna, która powoduje strukturalne aberracje chromosomowe w populacjach komórek lub organizmów eukariotycznych.

Stężenia: oznaczają stężenia końcowe badanej substancji chemicznej w podłożu.

Cytotoksyczność: w odniesieniu do badań objętych niniejszą metodą badawczą przeprowadzanych z wykorzystaniem linii komórkowych cytotoksyczność określa się jako obniżenie względnego podwojenia populacji (RPD) lub obniżenie względnego wzrostu liczby komórek (RICC) komórek poddanych działaniu substancji w porównaniu z kontrolą ujemną (zob. pkt 17 i dodatek 2). W odniesieniu do badań objętych niniejszą metodą badawczą przeprowadzanych z wykorzystaniem pierwotnych kultur limfocytów cytotoksyczność określa się jako obniżenie indeksu mitotycznego (MI) komórek poddanych działaniu substancji w porównaniu z kontrolą ujemną (zob. pkt 18 i dodatek 2).

Endoreduplikacja: proces, w którym po fazie S replikacji DNA jądro komórkowe nie wchodzi w fazę mitozy, lecz rozpoczyna się kolejna faza S. Wynikiem są chromosomy o 4, 8, 16, ... chromatydach.

Genotoksyczny: ogólny termin odnoszący się do wszelkiego rodzaju uszkodzeń DNA lub chromosomu, w tym złamań, delecji, adduktów, modyfikacji i sprzężeń nukleotydów, rearanżacji, mutacji genowych, aberracji chromosomowych oraz aneuploidii. Nie wszystkie rodzaje efektów genotoksycznych powodują mutacje lub stałe uszkodzenia chromosomu.

Indeks mitotyczny (MI): stosunek liczby komórek w metafazie do całkowitej liczby komórek zaobserwowanych w populacji komórek; wskazanie stopnia proliferacji tej populacji.

Mitoza: podział jądra komórkowego, na który zazwyczaj składają się profaza, prometafa, metafaza, anafaza i telofaza.

Mutagenny: tworzący dziedziczne zmiany w sekwencji lub sekwencjach par zasad DNA w genach lub w strukturze chromosomów (aberracje chromosomowe).

Aberracja liczby: zmiana liczby chromosomów względem standardowej liczby chromosomów typowej dla wykorzystywanych komórek.

Poliploidalność: aberracje liczby chromosomów w komórkach lub organizmach, obejmujące cały zestaw lub zestawy chromosomów, a nie pojedynczy chromosom lub chromosomy (aneuploidia).

Status p53: białko p53 bierze udział w procesie regulacji cyklu komórkowego, apoptozy i naprawy DNA. Komórki, w których odnotowuje się niedobór białka p53 i które są niezdolne do zatrzymania cyklu komórkowego lub do usunięcia uszkodzonych komórek poprzez apoptozę lub inne mechanizmy (np. poprzez zainicjowanie procesu naprawy DNA) powiązane z funkcjami, jakie białko p53 pełni w reakcji na uszkodzenie DNA, powinny teoretycznie być bardziej podatne na mutacje genowe lub aberracje chromosomowe.

Względny wzrost liczby komórek (RICC): wzrost liczby komórek w kulturach poddanych działaniu substancji chemicznej w zestawieniu ze wzrostem liczby komórek w kulturach, które nie zostały poddane działaniu substancji chemicznej, wyrażony jako odsetek.

Względne podwojenie populacji (RPD): wzrost liczby podwojeń populacji w kulturach poddanych działaniu substancji chemicznej w zestawieniu ze wzrostem liczby komórek w kulturach, które nie zostały poddane działaniu substancji chemicznej, wyrażony jako odsetek.

Frakcja S9 uzyskana z wątroby: supernatant z homogenatu wątroby po odwirowaniu przy 9 000 g, tj. surowy ekstrakt z wątroby.

Preparat frakcji S9: preparat złożony z frakcji S9 uzyskanej z wątroby i kofaktorów niezbędnych do aktywności metabolicznej enzymów.

Kontrola z rozpuszczalnikiem: ogólny termin opisujący kultury kontrolne otrzymujące wyłącznie rozpuszczalnik stosowany do rozpuszczenia badanej substancji chemicznej.

Strukturalna aberracja chromosomowa: zmiana w strukturze chromosomu wykrywalna przez badanie mikroskopowe etapu metafazy w cyklu podziału komórki, zaobserwowana jako delecje, fragmenty, zmiany zachodzące między chromosomami lub w obrębie chromosomu.

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

Próby kontrolne niepoddawane działaniu substancji: hodowle, które nie są poddawane działaniu żadnej substancji (tj. badanej substancji chemicznej ani rozpuszczalnika), lecz które są równolegle przetwarzane w taki sam sposób jako hodowle otrzymujące badaną substancję chemiczną.

Dodatek 2

WZORY DO OCENY CYTOTOKSYCZNOŚCI

Indeks mitotyczny:

$$MI(\%) = \frac{\text{liczba komórek mitotycznych}}{\text{całkowita liczba zliczonych komórek}} \times 100$$

Zaleca się korzystanie ze wskaźnika **względnego wzrostu liczby komórek (RICC)** lub **względnego podwojenia populacji (RPD)**, ponieważ oba te wskaźniki uwzględniają odsetek populacji komórek, które uległy podziałowi.

$$RICC(\%) = \frac{(\text{wzrost l. Kom. W hodowlach poddanych działaniu subst. chem. (l. końcawa-l. początkowa)})}{(\text{wzrost liczby komórek w hodowlach kontrolnych (l. końcawa-l. początkowa)})} \times 100$$

$$RPD(\%) = \frac{(\text{liczba podwojeń populacji w kulturach poddanych działaniu substancji chemicznej})}{(\text{liczba podwojeń populacji w kulturach kontrolnych})} \times 100$$

gdzie:

Podwojenie populacji = $[\log(\text{liczba komórek po poddaniu działaniu substancji chemicznej} \div \text{początkowa liczba komórek})] \div \log 2$

Na przykład RICC lub RPD wynoszący 53 % oznacza, że cytotoksyczność/cytostazę na poziomie 47 %, natomiast cytotoksyczność/cytostaza na poziomie 55 % mierzona za pomocą indeksu mitotycznego oznacza, że faktyczny indeks mitotyczny wynosi 45 % wartości dla grupy kontrolnej.

W każdym razie należy ustalić liczbę komórek przed poddaniem działaniu substancji chemicznej, przy czym liczba ta powinna być taka sama zarówno w przypadku hodowli poddanych działaniu substancji chemicznej, jak i w przypadku hodowli na potrzeby kontroli ujemnej.

Chociaż wskaźnik RCC (tj. liczba komórek w hodowlach poddanych działaniu substancji chemicznej podzielona przez liczbę komórek w hodowlach kontrolnych) był w przeszłości wykorzystywany jako parametr cytotoksyczności, nie zaleca się dalszego korzystania z tego wskaźnika, ponieważ może to skutkować niedoszacowaniem cytotoksyczności.

W przypadku hodowli na potrzeby kontroli ujemnej przy podwajaniu populacji należy zachować zgodność z wymogiem pobierania próbek komórek po poddaniu ich działaniu substancji chemicznej w czasie równoważnym około 1,5-krotności normalnego czasu trwania cyklu komórkowego, przy czym wartość indeksu mitotycznego powinna być na tyle wysoka, aby zapewnić dostateczną liczbę komórek na etapie mitozy i zagwarantować możliwość wiarygodnego wyliczenia wartości 50-procentowej redukcji.”;

4) w części B rozdział B.11 otrzymuje brzmienie:

„B.11 Test aberracji chromosomowych na szpiku kostnym ssaków

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 475 (2016). Stanowi ona część cyklu metod badawczych dotyczących toksykologii genetycznej. Opracowany został dokument OECD, który zawiera zwięzłe informacje na temat badań w zakresie toksykologii genetycznej oraz przegląd ostatnich zmian, jakie wprowadzono do wytycznych dotyczących badań (1).

Test aberracji chromosomowej na szpiku kostnym ssaków *in vivo* ma szczególne znaczenie dla oceny genotoksyczności, ponieważ czynniki związane z metabolizmem, farmakokinetyką oraz procesami naprawy DNA *in vivo* – choć mogą różnić się w zależności od gatunku – są aktywne i wywierają wpływ na reakcje. Przeprowadzenie testu *in vivo* jest również przydatne do celów dalszego badania genotoksyczności stwierdzonej w układzie *in vitro*.

Test aberracji chromosomowej na szpiku kostnym ssaków *in vivo* przeprowadza się w celu wykrycia strukturalnych aberracji chromosomowych indukowanych badanymi substancjami chemicznymi w komórkach szpiku kostnego zwierząt, zazwyczaj gryzoni (2) (3) (4) (5). Strukturalne aberracje chromosomowe mogą występować w dwóch typach – chromosomowym lub chromatydowym. Choć większość genotoksycznych aberracji indukowanych substancjami chemicznymi ma postać aberracji typu chromatydowego, niekiedy występują również aberracje typu chromosomowego. Aberracje chromosomowe i powiązane z nimi zdarzenia są przyczyną wielu ludzkich chorób genetycznych, a także istnieją istotne dowody wskazujące, że tego rodzaju zmiany patologiczne i powiązane z nimi zdarzenia powodują zmiany w onkogenach oraz w antyonkogenach i przyczyniają się do powstawania zmian nowotworowych u ludzi oraz w układach doświadczalnych. W trakcie przeprowadzania testów aberracji chromosomowych *in vivo* może wystąpić poliploidalność (w tym endoreduplikacja). Sam fakt wzrostu poliploidalności nie musi jednak świadczyć o właściwościach aneugenicznych i może stanowić po prostu skutek zaburzenia cyklu komórkowego lub cytotoksyczności. Celem niniejszego testu nie jest pomiar aneuploidii. Testy *in vivo* i *in vitro* zalecane do wykrywania aneuploidii to, odpowiednio, test mikrojądrowy na erytrocytach ssaków *in vivo* (rozdział B.12 niniejszego załącznika) lub test mikrojądrowy na komórkach ssaków *in vitro* (rozdział B.49 niniejszego załącznika).

Definicje stosowanych terminów zamieszczono w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

Chociaż niniejszy test przeprowadza się zazwyczaj na gryzoniach, w niektórych przypadkach dopuszcza się również możliwość wykorzystania innych gatunków, jeżeli zostanie to naukowo uzasadnione. Tkanką docelową w tym teście jest szpik kostny, ponieważ jest on wysoce unaczynioną tkanką zawierającą populację komórek o szybkim cyklu podziału, które można w łatwy sposób wyizolować i poddać działaniu substancji chemicznej. W sprawozdaniu powinno się przedstawić naukowe uzasadnienie wykorzystania gatunków innych niż szczury i myszy. W przypadku wykorzystywania zwierząt innych niż gryzonie zaleca się włączenie pomiaru aberracji chromosomowych w szpiku kostnym do innego stosownego badania toksyczności.

Jeżeli istnieją dowody świadczące o tym, że badana(-e) substancja(-e) chemiczna(-e) lub jej (ich) metabolit(y) nie dotrą do tkanki docelowej, przeprowadzenie tego badania może nie być wskazane.

Przed zastosowaniem niniejszej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się, czy zastosowanie niniejszej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak – dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny.

ZASADA METODY BADAWCZEJ

Zwierzęta poddaje się działaniu badanej substancji chemicznej z zastosowaniem odpowiedniej drogi narażenia, a po upływie odpowiedniego czasu od podania substancji chemicznej uśmierca się je w humanitarny sposób. Przed uśmierceniem zwierzętom podaje się substancję chemiczną zawierającą środek zatrzymujący metafazę (np. kolchicynę lub colcemid). Następnie z komórek szpiku kostnego przygotowuje się preparaty chromosomowe, które się barwi, po czym komórki w metafazie bada się pod kątem wystąpienia aberracji chromosomowych.

WERYFIKACJA BIEGŁOŚCI LABORATORIUM

Badanie biegłości

Aby ustalić wystarczające doświadczenie laboratorium w zakresie omawianego testu przed zastosowaniem go w rutynowych badaniach, laboratorium powinno wykazać zdolność do odtworzenia oczekiwanych wyników na podstawie opublikowanych danych (np. (6)) w odniesieniu do częstości występowania aberracji chromosomowych z zastosowaniem co najmniej dwóch substancji chemicznych służących do kontroli dodatniej (uwzględniając słabe reakcje wywołane niskimi dawkami substancji służących do kontroli dodatniej), takich jak substancje wymienione w tabeli 1, oraz z zastosowaniem kontroli ze zgodnym nośnikiem/rozpuszczalnikiem (zob. pkt 22). W tego rodzaju doświadczeniach należy stosować dawki, które prowadzą do powstania możliwych do odtworzenia i powiązanych z wielkością dawki przyrostów i które umożliwiają wykazanie czułości i zakresu oznaczania układu badawczego w odniesieniu do tkanki będącej przedmiotem zainteresowania (szpik kostny) przy wykorzystaniu metody zliczania, która ma być stosowana w laboratorium. Wymóg ten nie dotyczy laboratoriów, które dysponują odpowiednim doświadczeniem, tj. laboratoriów prowadzących bazę danych historycznych, o której mowa w pkt 10–14.

Dane historyczne dotyczące kontroli

W toku badań biegłości laboratorium powinno ustalić:

- zakres i rozkład historycznych wyników kontroli dodatniej oraz
- zakres i rozkład historycznych wyników kontroli ujemnej.

Przy pierwszym gromadzeniu danych dotyczących rozkładu historycznych wyników kontroli ujemnej wyniki jednoczesnej kontroli ujemnej powinny być zgodne z opublikowanymi danymi dotyczącymi kontroli, o ile takie dane istnieją. W miarę dodawania kolejnych danych doświadczalnych do rozkładu danych historycznych dotyczących kontroli jednoczesne kontrole ujemne powinny w idealnych warunkach mieścić się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % dla tego rozkładu. Prowadzona przez dane laboratorium baza danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej powinna być statystycznie istotna, aby zapewnić zdolność laboratorium do oceny rozkładu własnych danych dotyczących kontroli ujemnej. Z literatury przedmiotu wynika, że baza danych powinna zawierać wyniki co najmniej 10 doświadczeń, ale najlepiej co najmniej 20 doświadczeń przeprowadzonych w porównywalnych warunkach doświadczalnych. Laboratoria powinny stosować metody kontroli jakości, takie jak karty kontrolne (np. karty C lub karty X-średnie (7)) w celu określania stopnia zmienności gromadzonych przez nie danych oraz w celu wykazania, że stosowana przez nie metodologia jest „pod kontrolą”. Dalsze zalecenia dotyczące sposobu gromadzenia i wykorzystywania danych historycznych (tj. kryteria włączania danych do zbioru danych historycznych i wykluczania danych z tego zbioru oraz kryteria dopuszczalności dla danego doświadczenia) można znaleźć w literaturze (8).

Jeżeli laboratorium nie przeprowadziło dostatecznie dużej liczby doświadczeń, aby ustalić istotny statystycznie rozkład danych z kontroli ujemnej (zob. pkt 11) w trakcie badań biegłości (opisanych w pkt 9), dopuszcza się możliwość ustalenia rozkładu w trakcie pierwszych rutynowych badań. Takie podejście powinno być zgodne z zaleceniami przedstawionymi w literaturze (8), a wyniki kontroli ujemnej uzyskane w ramach tych doświadczeń powinny pozostać zgodne z opublikowanymi danymi dotyczącymi kontroli ujemnej.

Wszelkie zmiany w protokole doświadczalnym należy rozpatrywać pod kątem tego, czy ich wpływ na otrzymywane dane pozostaje spójny z dotychczas prowadzonymi przez laboratorium bazami danych historycznych dotyczących kontroli. Wyłącznie poważne niespójności powinny skutkować utworzeniem nowej bazy danych historycznych dotyczących kontroli, w przypadku gdy z ekspertyzy wynika, że dane odbiegają od poprzedniego rozkładu (zob. pkt 11). Podczas tworzenia nowej bazy danych utworzenie kompletnej bazy danych dotyczących kontroli ujemnej może nie być konieczne do przeprowadzenia samego badania, o ile laboratorium może wykazać, że wartości uzyskiwane przez nie w ramach jednoczesnej kontroli ujemnej pozostają zgodne z wynikami zawartymi w jego poprzedniej bazie danych albo z odpowiednimi opublikowanymi danymi.

Dane dotyczące kontroli ujemnej powinny obejmować częstość występowania strukturalnych aberracji chromosomowych (w tym przerw) u każdego zwierzęcia. Jednoczesne kontrole ujemne powinny w idealnych warunkach mieścić się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % dla rozkładu danych zawartych w prowadzonej przez laboratorium bazie danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej. W przypadku gdy dane dotyczące jednoczesnej kontroli ujemnej nie mieszczą się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 %, włączenie ich do rozkładu kontroli historycznej może być dopuszczalne, pod warunkiem że dane te nie stanowią skrajnych obserwacji nietypowych oraz że istnieją dowody świadczące o tym, iż dany układ badawczy znajduje się „pod kontrolą” (zob. pkt 11), a także nie ma dowodów wskazujących na błąd techniczny lub ludzki.

OPIS METODY

Przygotowania

Wybór gatunku zwierząt

Należy prowadzić badania na zdrowych, młodych, dorosłych zwierzętach pochodzących ze szczepów na ogół wykorzystywanych w badaniach laboratoryjnych. Badania przeprowadza się zazwyczaj na szczurach, choć wykorzystywanie myszy również można uznać za stosowne. Dopuszcza się również możliwość wykorzystania wszelkich innych odpowiednich gatunków ssaków, o ile w sprawozdaniu zostanie przedstawione uzasadnienie naukowe.

Warunki utrzymywania i karmienia

W przypadku gryzoni temperatura w pomieszczeniu dla zwierząt powinna wynosić 22 °C (\pm 3 °C). Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 40 % i pożądana jest, żeby nie przekraczała 70 % poza okresami czyszczenia pomieszczenia, celem powinno być utrzymywanie jej na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne z zachowaniem cyklu 12 godzin światła i 12 godzin ciemności. Do karmienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne oraz należy zapewnić zwierzętom nieograniczony dostęp do wody do picia. Wybór paszy może zależeć od potrzeby zapewnienia odpowiedniej domieszki badanej substancji chemicznej, jeżeli jest ona podawana tą drogą. Gryzonie należy trzymać w małych grupach (nie więcej niż pięć sztuk) składających się ze zwierząt tej samej płci i należących do tej samej grupy badanej, jeżeli nie przewiduje się, że mogłoby dojść do agresywnego zachowania, najlepiej w klatkach z pełną podłogą, oraz zapewnić im odpowiednie urozmaicenie warunków bytowania. Zwierzęta można utrzymywać pojedynczo tylko wtedy, gdy ma to uzasadnienie naukowe.

Przygotowanie zwierząt

Zazwyczaj wykorzystuje się zdrowe, młode, dorosłe zwierzęta (w przypadku gryzoni najlepiej w wieku 6–10 tygodni na początku poddawania działaniu substancji chemicznej, chociaż dopuszcza się również używanie nieco starszych zwierząt), które losowo przydziela się do grup kontrolnych i grup poddawanych działaniu substancji chemicznej. Zwierzęta zostają indywidualnie oznakowane przy użyciu humanitarnej, mało inwazyjnej metody (np. poprzez obrączkowanie, kolczykowanie, wszczepianie mikroukładów i identyfikację biometryczną, ale nie przycinanie uszu lub palców) i aklimatyzowane do warunków laboratoryjnych przez co najmniej pięć dni. Klatki należy rozmieścić w taki sposób, aby zminimalizować potencjalny wpływ ich układu. Należy unikać zanieczyszczenia krzyżowego kontrolą dodatnią i badaną substancją chemiczną. W momencie rozpoczęcia badania różnice w masie ciała zwierząt powinny być minimalne i nie powinny przekraczać \pm 20 % średniej masy dla każdej płci.

Przygotowanie dawek

Badane substancje chemiczne w stanie stałym należy rozpuszczać lub przygotowywać w postaci zawiesiny w odpowiednich rozpuszczalnikach lub nośnikach lub dodawać do paszy lub wody do picia przed podaniem dawki zwierzętom. Badane substancje chemiczne w stanie ciekłym mogą być dawkowane bezpośrednio lub można je rozcieńczać przed dawkowaniem. W przypadku narażenia inhalacyjnego badane substancje chemiczne można podawać w postaci gazu, pary lub stałych/ciekłych aerozoli, w zależności od ich właściwości fizykochemicznych. Należy stosować świeże preparaty badanej substancji chemicznej, chyba że z danych dotyczących stabilności wynika, iż przechowywanie tych preparatów jest dopuszczalne, i chyba że w danych tych określono warunki prawidłowego przechowywania takich preparatów.

Kontrola z rozpuszczalnikiem/nośnikiem

Rozpuszczalnik/nośnik nie powinien wywoływać efektów toksycznych przy stosowanych poziomach dawek oraz nie powinno istnieć ryzyko, że wejdzie on w reakcję chemiczną z badanymi substancjami chemicznymi. Jeśli wykorzystywane są inne niż dobrze znane rozpuszczalniki/nośniki, ich włączenie do doświadczenia powinno być poparte danymi wskazującymi ich zgodność. Zaleca się, aby w miarę możliwości w pierwszej kolejności rozważyć zastosowanie wodnego rozpuszczalnika/nośnika. Wśród przykładów powszechnie wykorzystywanych zgodnych rozpuszczalników/nośników można wymienić wodę, sól fizjologiczną, roztwór metylocelulozy, roztwór soli sodowej karboksymetylocelulozy, oliwę z oliwek i olej kukurydziany. W przypadku braku historycznych lub opublikowanych danych dotyczących kontroli wskazujących, że wybrany nietypowy rozpuszczalnik/nośnik nie indukuje strukturalnych aberracji chromosomowych ani nie powoduje żadnego innego szkodliwego efektu, należy wykonać badanie wstępne w celu ustalenia dopuszczalności stosowania kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem.

Kontrola

Kontrola dodatnie

W każdym badaniu należy co do zasady uwzględnić grupę zwierząt otrzymującą substancję chemiczną służącą do kontroli dodatniej. Od tego obowiązku można odstąpić, jeżeli laboratorium badawcze wykaże biegłość w przeprowadzaniu takiego badania i ustanowi zakres historycznych wyników kontroli dodatniej. W przypadku nieuwzględnienia jednoczesnej kontroli dodatniej do każdego doświadczenia należy włączyć kontrolę na potrzeby oceny ilościowej (utrwalone i niebarwione preparaty). Tego rodzaju kontrole można przeprowadzić, włączając do oceny ilościowej wyników badania odpowiednie próbki referencyjne, które zostały pozyskane w trakcie odrębnego przeprowadzanego okresowo (np. co 6–18 miesięcy) doświadczenia z wykorzystaniem kontroli dodatniej i które są przechowywane w laboratorium przeprowadzającym test; na przykład w trakcie badania biegłości i – w stosownych przypadkach – w regularnych odstępach czasu w późniejszym okresie.

Substancje chemiczne służące do kontroli dodatniej powinny w przewidywalny sposób generować zauważalny wzrost częstości występowania komórek ze strukturalnymi aberracjami chromosomowymi w porównaniu z częstością samorzutną. Dawki stosowane do celów kontroli dodatniej należy dobierać w taki sposób, aby efekty były jasne, lecz aby osoba zliczająca nie była w stanie natychmiast zidentyfikować zakodowanych próbek. Dopuszcza się, aby substancja chemiczna służąca do kontroli dodatniej była podawana inną drogą niż badana substancja chemiczna i zgodnie z innym harmonogramem podawania substancji chemicznej, a także aby próbki były pobierane wyłącznie w określonym czasie. Ponadto w stosownych przypadkach można rozważyć możliwość zastosowania substancji chemicznych służących do kontroli dodatniej powiązanych z określoną klasą chemiczną. W tabeli 1 przedstawiono przykładowe substancje chemiczne służące do kontroli dodatniej.

Tabela 1

Przykładowe substancje chemiczne służące do kontroli dodatniej

Substancja chemiczna	Numer CAS
Metanosulfonian etylu	62-50-0
Metanosulfonian metylu	66-27-3
Etylonitrozomocznik	759-73-9
Mitomycyna C	50-07-7
Cyklofosfamid (monohydrat)	50-18-0 (6055-19-2)
Trietylenomelamina	51-18-3

Kontrole ujemne

Od zwierząt z grupy kontrolnej ujemnej należy pobierać próbki w każdym okresie pobierania próbek i należy postępować z nimi w taki sam sposób, jak ze zwierzętami należącymi do grupy badanej, z tym że nie poddaje się ich działaniu badanej substancji chemicznej. Jeżeli do podania badanej substancji chemicznej wykorzystuje się rozpuszczalnik/nośnik, zwierzętom należącym do grupy kontrolnej również należy podać ten rozpuszczalnik/nośnik. Jeżeli jednak dane historyczne dotyczące kontroli ujemnej gromadzone przez laboratorium badawcze przy każdorazowym pobieraniu próbek będą wskazywały na stałą poziom zmienności pomiędzy zwierzętami i stałą częstość występowania komórek ze strukturalnymi aberracjami chromosomowymi, konieczne może być tylko jedno pobranie próbek na potrzeby kontroli ujemnej. Jeżeli w ramach kontroli ujemnej przeprowadza się tylko jedno pobieranie próbek, próbki należy pobrać w pierwszym okresie pobierania próbek w ramach badania.

PROCEDURA

Liczba i płeć zwierząt

Na ogół reakcja mikrojądrowa jest podobna u samców i samic (9) i oczekuje się, że podobnie będzie w przypadku strukturalnych aberracji chromosomowych; dlatego też większość badań można przeprowadzić na zwierzętach dowolnej płci. Dane wskazujące na występowanie istotnych różnic między samcami i samicami (np. różnice w toksyczności ogólnoustrojowej, metabolizmie, biodostępności, toksyczności w szpiku kostnym itd., w tym np. w badaniu ustalającym zakres dawkowania) stanowią przesłankę przemawiającą za przeprowadzaniem badań na zwierzętach obu płci. W takim przypadku właściwe może być przeprowadzenie badania na zwierzętach obu płci, np. w ramach badania toksyczności dawki powtórzonej. Zastosowanie planu czynnikowego może być właściwe, jeżeli do badania używa się zwierząt obu płci. Szczegółowe informacje dotyczące sposobu analizy danych z wykorzystaniem tego planu można znaleźć w dodatku 2.

Na początku badania należy ustalić liczebność grup w celu zapewnienia w każdej grupie co najmniej 5 nadających się do poddania analizie zwierząt jednej płci lub każdej płci, jeżeli wykorzystuje się zwierzęta obu płci. Jeżeli narażenie człowieka na działanie substancji chemicznych może mieć charakter uzależniony od płci, jak to na przykład ma miejsce w przypadku niektórych produktów leczniczych, badanie należy przeprowadzić na zwierzętach odpowiedniej płci. Wskazówka odnośnie do maksymalnych typowych wymagań w zakresie liczby zwierząt – w przypadku badania szpiku kostnego, w ramach którego dwukrotnie pobiera się próbki, z trzema grupami otrzymującymi dawki i jednoczesną kontrolą ujemną i dodatnią (każda grupa złożona z pięciu zwierząt jednej płci) wymagane byłoby użycie 45 zwierząt.

Poziomy dawek

W przypadku przeprowadzenia wstępnego badania ustalającego zakres dawkowania ze względu na brak dostępnych odpowiednich danych umożliwiających dobranie dawki, badanie takie należy wykonać w tym samym laboratorium z wykorzystaniem tego samego gatunku, szczepu, płci i schematu podawania substancji chemicznej, jakie mają być stosowane w badaniu głównym (10). Celem badania powinno być określenie maksymalnej tolerowanej dawki (MTD) zdefiniowanej jako najwyższa dawka tolerowana bez wywoływania objawów toksyczności ograniczającej badanie w stosunku do czasu trwania badania (na przykład dawka wywołująca spadek masy ciała lub cytotoksyczność układu krwiotwórczego, ale niepowodująca śmierci lub objawów bólu, cierpienia lub stresu, które wiązałyby się z koniecznością uśmiercenia zwierzęcia w humanitarny sposób (11)).

Najwyższą dawkę można również zdefiniować jako dawkę, która wywołuje pewne oznaki toksyczności w szpiku kostnym.

Substancje chemiczne wykazujące intensywne parametry toksykokinetyczne lub wywołujące procesy detoksykacji, które mogą prowadzić do zmniejszenia narażenia po długim okresie podawania substancji chemicznej, mogą stanowić wyjątki w odniesieniu do kryteriów ustalania dawki i powinny być oceniane na zasadzie jednostkowych przypadków.

Aby uzyskać informacje na temat zależności dawka-odpowiedź, w kompletnym badaniu należy uwzględnić grupę kontrolną ujemną oraz co najmniej trzy poziomy dawek, przy czym każda kolejna dawka jest większa od poprzedniej na ogół dwukrotnie, ale nie więcej niż czterokrotnie. Jeżeli wyniki badania ustalającego zakres dawkowania lub istniejące dane będą wskazywały, że badana substancja chemiczna nie wywołuje toksyczności, najwyższa dawka w przypadku podania jednorazowego powinna wynosić 2 000 mg/kg masy ciała. Jeżeli jednak badana substancja chemiczna będzie miała działanie toksyczne, maksymalną tolerowaną dawkę należy ustalić na poziomie odpowiadającym najwyższej podanej dawce, przy czym najlepiej byłoby, gdyby zastosowane poziomy dawek obejmowały zakres od dawki maksymalnej do dawki wywołującej toksyczność w niewielkim stopniu lub dawki niewywołującej toksyczności. W przypadku zaobserwowania toksyczności w tkance docelowej (szpiku kostnym) przy wszystkich badanych poziomach dawek zaleca się dalsze badania z wykorzystaniem dawek nietoksycznych. W przypadku badań przeprowadzanych w celu uzyskania bardziej szczegółowych ilościowych informacji na temat zależności dawka-odpowiedź konieczne może okazać się utworzenie dodatkowych grup otrzymujących dawki. Wspomniane wartości graniczne mogą różnić się w przypadku niektórych rodzajów badanych substancji chemicznych (np. produktów leczniczych przeznaczonych dla ludzi), które podlegają szczególnym wymogom.

Badanie graniczne

Jeżeli wyniki badania ustalającego zakres dawkowania lub dostępne dane na temat powiązanych szczepów zwierząt będą wskazywały, że poddanie zwierząt działaniu substancji chemicznej w stężeniu odpowiadającym co najmniej dawce granicznej (o której mowa poniżej) nie wywołuje żadnych możliwych do zaobserwowania efektów toksycznych (w tym spadku tempa dzielenia się komórek szpiku kostnego lub innych oznak świadczących o cytotoksyczności tkanki docelowej), i jeżeli wyniki badań genotoksyczności *in vitro* lub dane dotyczące strukturalnie powiązanych substancji chemicznych nie będą wskazywały na możliwość wystąpienia genotoksyczności, przeprowadzenie pełnego badania z trzema poziomami dawek może nie być konieczne, o ile wykazano, że badane substancje chemiczne docierają do tkanki docelowej (szpiku kostnego). W takich przypadkach pojedynczy poziom dawki, odpowiadający dawce granicznej, może być wystarczający. Jeżeli okres podawania przekracza 14 dni, dawka graniczna wynosi 1 000 mg/kg masy ciała na dobę. W przypadku okresów podawania wynoszących 14 dni lub mniej dawka graniczna wynosi 2 000 mg/kg masy ciała na dobę.

Podawanie dawek

Planując badanie, należy wziąć pod uwagę przewidywaną drogę narażenia ludzi. W związku z tym można wybrać jako uzasadnione takie drogi podawania, jak: w pokarmie, z wodą do picia, miejscowe, podskórne, dożylnie, ustne (przez sondę), przez wdychanie, dotchawicze lub przez implantację. W każdym razie drogę narażenia należy dobrać w taki sposób, aby zapewnić odpowiednie narażenie tkanek docelowych. Nie zaleca się na ogół dokonywania wstrzyknięć dootrzewnowych, ponieważ nie jest to typowa droga narażenia ludzi – taką drogę należy stosować wyłącznie w przypadku wystąpienia konkretnego uzasadnienia naukowego. Jeżeli badaną substancję chemiczną dodaje się do paszy lub wody do picia, w szczególności w przypadku pojedynczej dawki substancji, należy upewnić się, że okres między spożyciem paszy i wody a pobraniem próbki jest wystarczający do tego, aby zapewnić możliwość wykrycia skutków podania substancji (zob. pkt 33–34). Maksymalna objętość płynu, jaką można podać przez sondę lub wstrzyknąć jednorazowo, zależy od wielkości zwierzęcia doświadczalnego. Objętość ta nie powinna co do zasady przekraczać 1 ml/100 g masy ciała, oprócz roztworów wodnych, w przypadku których można zastosować maksymalnie 2 ml/100 g masy ciała. Wykorzystanie objętości wyższych niż podane musi być uzasadnione. Należy ograniczyć zmienność objętości stosowanej w badaniu, dostosowując stężenie w taki sposób, by zapewnić podawanie substancji chemicznej w takiej samej objętości w stosunku do masy ciała przy wszystkich poziomach dawek – nie dotyczy to jednak badanych substancji chemicznych o podrażniającym lub żrącym działaniu, które w normalnych warunkach wywołują poważniejsze skutki w przypadku ich podania w wyższych stężeniach.

Harmonogram podawania substancji chemicznej

Badane substancje chemiczne podaje się zwykle jako pojedynczą dawkę, ale można je również podawać jako dawkę dzieloną (tj. co najmniej dwa podania substancji tego samego dnia w odstępie czasu nie większym niż 2–3 godziny), aby łatwiej było podawać substancję w dużej objętości. W takim przypadku lub przy podawaniu badanej substancji chemicznej drogą wziewną okres pobierania próbek należy zaplanować w oparciu o czas podania ostatniej dawki lub czas ustania narażenia na działanie substancji.

Obecnie dostępnych jest niewiele danych na temat odpowiedniości metody powtarzanego dawkowania w kontekście niniejszego testu. W przypadku jednak, gdy połączenie niniejszego testu z badaniem toksyczności dawki powtórzonej byłoby pożądane, należy dołożyć starań, aby uniknąć utraty komórek mitotycznych z aberracjami chromosomowymi, co może nastąpić w przypadku podania dawek toksycznych. Tego rodzaju połączenie jest dopuszczalne, w przypadku gdy najwyższa dawka jest większa niż dawka graniczna lub równa dawce granicznej (zob. pkt 29), a dawkę graniczną podaje się grupie otrzymującej dawkę przez cały okres podawania substancji chemicznej. Test mikrojądrowy (metoda badawcza B.12) należy postrzegać jako preferowaną metodę badania *in vivo* pod kątem aberracji chromosomowych, w przypadku gdy pożądane jest połączenie tej metody z innymi metodami badawczymi.

Próbki szpiku kostnego należy pobrać dwukrotnie w różnym czasie po poddaniu pojedynczych dawek substancji. W przypadku gryzoni czas trwania pierwszego okresu pobierania próbek powinien odpowiadać 1,5-krotności normalnego czasu trwania cyklu komórkowego (cykl komórkowy trwa zazwyczaj od 12 do 18 godzin od zakończenia okresu poddawania działaniu substancji chemicznej). Ponieważ czas wymagany na wchłonięcie i metabolizm badanych substancji chemicznych oraz jego skutki dla kinetyki cyklu komórkowego mogą wywierać wpływ na optymalny czas na wykrycie aberracji chromosomowej, zaleca się pobranie próbek w późniejszym terminie, tj. po upływie 24 godzin od pierwszego pobrania próbek. Przy pierwszym pobraniu próbek wszystkie grupy otrzymujące dawki powinny zostać poddane działaniu substancji chemicznej, po czym należy pobrać próbki do analizy; w kolejnych okresach pobierania próbek należy jednak podawać wyłącznie najwyższą dawkę. Jeżeli z uzasadnionych powodów względów dawki podaje się częściej niż raz dziennie, z reguły powinno się przeprowadzić jedno pobranie próbek po upływie około 1,5-krotności normalnego czasu trwania cyklu komórkowego od ostatniego poddania działaniu substancji chemicznej.

Po poddaniu działaniu substancji chemicznej i przed pobraniem próbki zwierzętom wstrzykuje się dootrzewnowo odpowiednią dawkę środka zatrzymującego metafazę (np. colcemidu lub kolchicyny), a próbki pobiera się po upływie odpowiedniego czasu od wstrzyknięcia tego środka. W przypadku myszy przed pobraniem próbek musi upłynąć 3–5 godzin, a w przypadku szczurów – 2–5 godzin. Komórki pobiera się ze szpiku kostnego, powiększa się je, utrwała i barwi, po czym bada się je pod kątem wystąpienia aberracji chromosomowych (12).

Obserwacje

Ogólne obserwacje kliniczne zwierząt doświadczalnych wraz z rejestrowaniem objawów klinicznych powinny odbywać się co najmniej raz dziennie, najlepiej każdego dnia o tej samej porze oraz z uwzględnieniem szczytowego okresu przewidywanych skutków po dawkowaniu. Co najmniej dwa razy dziennie w trakcie okresu dawkowania wszystkie zwierzęta powinny być obserwowane pod kątem zachorowalności i upadkowości. Wszystkie zwierzęta powinny być ważone na początku badania, co najmniej raz w tygodniu w trakcie badań dawki powtórzonej oraz po uśmierceniu. W przypadku badań trwających co najmniej tydzień co najmniej raz w tygodniu należy dokonywać pomiaru ilości spożytego pokarmu. Jeżeli badana substancja chemiczna jest podawana w wodzie do picia, należy mierzyć spożycie wody przy każdej zmianie wody i co najmniej raz w tygodniu. Zwierzęta, u których stwierdzono oznaki podwyższonej toksyczności nieprowadzące do śmierci, należy uśmiercić w humanitarny sposób przed zakończeniem okresu badania (11).

Narażenie tkanki docelowej

W odpowiednim momencie badania należy pobrać próbkę krwi, aby zbadać poziomy osocza po zastosowaniu badanych substancji chemicznych celem wykazania, że doszło do narażenia szpiku kostnego, jeżeli będzie to zasadne i jeżeli nie ma żadnych innych danych dotyczących narażenia (zob. pkt 44).

Szpik kostny i preparaty chromosomowe

Natychmiast po uśmierceniu zwierząt w humanitarny sposób z ich kości udowych lub piszczelowych pobiera się komórki szpiku kostnego, które są następnie poddawane działaniu roztworu hipotonicznego i utrwalane. Komórki w metafazie rozprowadza się następnie na szkiełkach mikroskopowych i barwi się je, stosując standardowe metody (zob. (3) (12)).

Analiza

Wszystkie preparaty, w tym te stanowiące kontrolę dodatnią i ujemną, należy indywidualnie zakodować i zrandomizować, tak aby osoba zliczająca nie знаła warunków podawania substancji chemicznej.

Indeks mitotyczny należy oznaczyć jako miarę cytotoksyczności w przynajmniej 1 000 komórek na zwierzę w odniesieniu do wszystkich zwierząt poddanych działaniu substancji chemicznej (uwzględniając kontrole dodatnie), zwierząt niepoddanych działaniu substancji chemicznej lub zwierząt z grupy kontroli ujemnej z nośnikiem/rozpuszczalnikiem.

W odniesieniu do każdego zwierzęcia należy zbadać co najmniej 200 metafaz pod kątem występowania strukturalnych aberracji chromosomowych, z uwzględnieniem lub z pominięciem przerw (6). Jeżeli informacje przechowywane w bazie danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej wskazują, że średnia podstawowa częstość występowania strukturalnych aberracji chromosomowych w danym laboratorium badawczym jest niższa niż 1 %, należy rozważyć możliwość oceny ilościowej dodatkowych komórek. Aberracje typu chromatydowego i chromosomowego należy odnotowywać oddzielnie i klasyfikować według podtypów (złamania, wymiany). Procedury stosowane w laboratorium powinny zapewniać przeprowadzanie analizy aberracji chromosomowych przez odpowiednio przeszkolonych pracowników odpowiadających za zliczanie oraz – w stosownych przypadkach – poddanie wyników tej analizy wzajemnej ocenie. Z uwagi na fakt, że w trakcie przygotowywania preparatów często dochodzi do złamań w części komórek w metafazie, co prowadzi do utraty chromosomów, zliczane komórki powinny zawierać liczbę centromerów wynoszącą co najmniej $2n \pm 2$, gdzie n stanowi haploidalną liczbę chromosomów dla danego gatunku.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ**Opracowanie wyników**

Dane dotyczące poszczególnych zwierząt należy przedstawić w postaci tabeli. W odniesieniu do każdego zwierzęcia należy ocenić indeks mitotyczny, liczbę zliczonych komórek w metafazie, liczbę aberracji wykrytych w poszczególnych komórkach metafazy oraz odsetek komórek ze strukturalnymi aberracjami chromosomowymi. Należy wymienić rodzaje strukturalnych aberracji chromosomowych, podając informacje o ich liczbie i częstości występowania u grup poddanych działaniu substancji chemicznej i u grup kontrolnych. Przerwy, jak również komórki poliploidalne i komórki z endoreduplikowanymi chromosomami, odnotowuje się odrębnie. Częstość występowania przerw zgłasza się, lecz zazwyczaj nie bierze się jej pod uwagę do celów analizy ogólnej częstości występowania strukturalnych aberracji chromosomowych. W przypadku braku dowodów na różnicę w reakcji pomiędzy płciami dane można połączyć na potrzeby analizy statystycznej. Należy również zgłosić dane dotyczące toksyczności u zwierząt i objawów klinicznych.

Kryteria dopuszczalności

Dopuszczalność badania ocenia się na podstawie następujących kryteriów:

- a) uznaje się, że dopuszczalne jest włączenie danych dotyczących jednoczesnej kontroli ujemnej do prowadzonej przez laboratorium bazy danych historycznych dotyczących kontroli (zob. pkt 11–14);
- b) jednoczesne kontrole dodatnie lub kontrole na potrzeby oceny ilościowej powinny wywoływać reakcje zgodne z reakcjami odnotowanymi w bazie danych historycznych dotyczących kontroli dodatniej i wykazywać statystycznie istotny wzrost w porównaniu z kontrolą ujemną (zob. pkt 20–21);
- c) objęto analizą odpowiednią liczbę dawek i komórek;
- d) kryteria wyboru najwyższej dawki są spójne z kryteriami opisanymi w pkt 25–28.

Ocena i interpretacja wyników

O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie dodatni, jeżeli:

- a) co najmniej jedna z grup badanych wykazuje statystycznie istotny wzrost częstości występowania komórek ze strukturalnymi aberracjami chromosomowymi (z wyjątkiem przerw) w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną,
- b) ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu tendencji pokazuje, że wzrost jest powiązany z dawką w co najmniej jednym okresie pobierania próbek, oraz
- c) którykolwiek z otrzymanych wyników znajduje się poza rozkładem danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (np. poza granicami kontrolnymi wyznaczającymi przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona);

Jeżeli w danym okresie pobierania próbek bada się wyłącznie najwyższą dawkę, badaną substancję chemiczną uznaje się za dającą wynik wyraźnie dodatni, jeżeli odnotowano statystycznie istotny wzrost w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną, a wyniki znajdują się poza rozkładem danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (np. poza granicami kontrolnymi wyznaczającymi przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona). Zalecenia dotyczące odpowiednich metod statystycznych można znaleźć w literaturze (13). Przy przeprowadzaniu analizy dawka-odpowiedź należy zbadać co najmniej trzy grupy otrzymujące dawkę, które poddano działaniu substancji chemicznej. W badaniach statystycznych należy przyjąć, że jednostką doświadczalną jest zwierzę. Wyniki dodatnie uzyskane w teście aberracji chromosomowej świadczą o tym, że badana substancja chemiczna indukuje strukturalne aberracje chromosomowe w szpiku kostnym badanego gatunku.

O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie ujemny, jeżeli we wszystkich zbadanych warunkach doświadczalnych:

- a) w żadnej grupie badanej nie odnotowano statystycznie istotnego wzrostu częstości występowania komórek ze strukturalnymi aberracjami chromosomowymi (z pominięciem przerw) w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną,

- b) ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu tendencji pokazuje, że wzrost nie jest powiązany z dawką w żadnym okresie pobierania próbek,
- c) wszystkie wyniki mieszczą się w rozkładzie danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (np. w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona), oraz
- d) doszło do narażenia szpiku kostnego na działanie badanej substancji chemicznej lub badanych substancji chemicznych.

Zalecenia dotyczące najodpowiedniejszych metod statystycznych można znaleźć w literaturze (13). Za dowody świadczące o narażeniu szpiku kostnego na działanie badanej substancji chemicznej można uznać spadek wartości indeksu mitotycznego lub wyniki pomiaru stężenia badanej substancji chemicznej w osoczu lub we krwi. Jeżeli substancję chemiczną podano drogą dożylną, przedstawienie dowodów narażenia na działanie substancji chemicznej nie jest konieczne. Ewentualnie narażenie szpiku kostnego na działanie substancji chemicznej można wykazać w oparciu o dane dotyczące wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i wydalania (ADME) pozyskane w ramach niezależnego badania przeprowadzonego z zastosowaniem tej samej drogi i na tych samych gatunkach. Wyniki ujemne świadczą o tym, że w warunkach badania badana substancja chemiczna nie indukuje strukturalnych aberracji chromosomowych w szpiku kostnym badanego gatunku.

Weryfikacja wyraźnie dodatniej lub ujemnej reakcji nie jest wymagana.

Jeżeli reakcja nie jest ani wyraźnie ujemna, ani wyraźnie dodatnia, oraz aby ułatwić ustalenie biologicznego znaczenia wyniku (np. niewielki lub graniczny wzrost), dane powinny zostać ocenione na podstawie opinii eksperta lub wyników dalszych badań przeprowadzonych w ramach już zakończonych doświadczeń. W niektórych przypadkach warto rozważyć możliwość zbadania większej liczby komórek lub powtórzenia doświadczenia w zmienionych warunkach doświadczalnych.

W rzadkich przypadkach nawet po przeprowadzeniu dalszych badań uzyskane dane uniemożliwią wyciągnięcie wniosku, iż badana substancja chemiczna daje wyniki dodatnie albo ujemne i w takiej sytuacji badanie zostanie uznane za niejednoznaczne.

Informacje na temat częstości występowania metafaz, w których odnotowano wystąpienie poliploidalności i endoreduplikacji, w stosunku do łącznej liczby metafaz należy odnotować osobno. Wzrost liczby komórek poliploidalnych/endoreduplikowanych może świadczyć o tym, że badana substancja chemiczna może potencjalnie hamować procesy mitotyczne lub przebieg cyklu komórkowego (zob. pkt 3).

Sprawozdanie z badania

Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Podsumowanie

Badana substancja chemiczna:

- źródło, numer partii, data graniczna do użytku, jeżeli jest dostępna;
- stabilność badanej substancji chemicznej, jeżeli jest znana;

Substancja jednoskładnikowa:

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

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:

- opisane w miarę możliwości za pomocą nazwy systematycznej (zob. powyżej), określenia ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

Przygotowanie badanej substancji chemicznej:

- uzasadnienie wyboru nośnika;
- rozpuszczalność i stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku/nośniku, jeżeli są znane;
- przygotowanie postaci użytkowych przeznaczonych do spożycia w paszy i z wodą do picia lub w formie wziewnej;
- oznaczenie analityczne postaci użytkowych (np. stabilność, homogeniczność, stężenia nominalne), jeżeli jest przeprowadzane.

Zwierzęta doświadczalne:

- gatunek/szczep wykorzystywany w badaniu wraz z uzasadnieniem jego wyboru;
- liczba, wiek i płeć zwierząt;
- źródło, warunki utrzymywania, pasza itp.;
- metoda indywidualnego znakowania zwierząt;
- w przypadku badań krótkoterminowych: masa ciała poszczególnych zwierząt na początku i na końcu badania; w przypadku badań trwających dłużej niż jeden tydzień: masa ciała poszczególnych zwierząt w trakcie badania oraz informacje o spożyciu pokarmu. W odniesieniu do każdej grupy należy uwzględnić informacje o zakresie masy ciała oraz o średniej i odchyleniu standardowym.

Warunki badania:

- kontrole dodatnie i ujemne (z nośnikiem/rozpuszczalnikiem);
- dane zgromadzone w ramach badania ustalającego zakres dawkowania, jeżeli zostało przeprowadzone;
- uzasadnienie wyboru poziomu dawkowania;
- szczegółowe informacje dotyczące przygotowania badanej substancji chemicznej;
- szczegółowe informacje dotyczące podawania badanej substancji chemicznej;
- uzasadnienie drogi podawania i długości okresu podawania;
- metody stosowane w celu sprawdzenia, czy badane substancje chemiczne dostały się do krwiobiegu lub dotarły do szpiku kostnego;
- dawka faktyczna (mg/kg masy ciała na dobę) obliczona w oparciu o stężenie badanej substancji chemicznej w paszy / wodzie do picia (ppm) i spożycie, w stosownych przypadkach;
- szczegółowe informacje dotyczące jakości pokarmu i wody;
- metoda uśmiercenia;
- metoda analgezji (jeżeli jest stosowana);
- szczegółowy opis harmonogramów podawania substancji chemicznej i pobierania próbek oraz ich uzasadnienie;
- metody przygotowywania preparatów;
- metody pomiaru toksyczności;
- nazwa substancji chemicznej zatrzymującej metafazę, jej stężenie, dawkowanie i czas podawania przed pobraniem próbek;
- procedury izolowania i konserwacji próbek;
- kryteria oceny aberracji;

- liczba zbadanych komórek w metafazie na zwierzę i liczba komórek zbadanych pod kątem oznaczenia indeksu mitotycznego;
- kryteria dopuszczalności badania;
- kryteria uznawania wyników badań za dodatnie, ujemne lub niejednoznaczne.

Wyniki:

- stan zwierząt przed badaniem i podczas całego okresu badania, w tym oznaki toksyczności;
- indeks mitotyczny podawany osobno dla każdego zwierzęcia;
- rodzaj i liczba aberracji oraz komórek, w których stwierdzono wystąpienie aberracji, podawane osobno dla każdego zwierzęcia;
- łączna liczba aberracji na grupę wraz ze średnimi i odchyleniami standardowymi;
- liczba komórek z aberracjami na grupę wraz ze średnimi i odchyleniami standardowymi;
- zmiany ploidalności, jeżeli zostały zaobserwowane, w tym informacje na temat częstości występowania komórek poliploidalnych lub endoreduplikowanych;
- w stosownych przypadkach zależność dawka-odpowiedź;
- zastosowane analizy i metody statystyczne;
- dane potwierdzające, że doszło do narażenia szpiku kostnego na działanie substancji chemicznej;
- dane dotyczące jednoczesnej kontroli ujemnej i jednoczesnej kontroli dodatniej wraz z zakresami, średnimi oraz odchyleniami standardowymi;
- dane historyczne dotyczące kontroli ujemnej i dodatniej wraz z zakresami, średnimi i odchyleniami standardowymi oraz granice kontrolne wyznaczające przedział 95 % dla rozkładu, uwzględniając czas objęty obserwacją oraz liczbę obserwacji;
- spełnienie kryteriów pozwalających uznać reakcję za dodatnią lub ujemną.

Omówienie wyników.

Wniosek.

Bibliografia.

BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD, Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015, publikacje OECD na temat środowiska, seria dotycząca badań i oceny, nr 234, OECD, Paryż.
- (2) Adler, I.D. (1984), „Cytogenetic Tests in Mammals”, w: Mutagenicity Testing: A Practical Approach, Venittand, S., J.M. Parry (red.), IRL Press, Waszyngton, D.C., s. 275–306.
- (3) Preston, R.J. *et al.* (1987), Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, Mutation Research, t. 189/2, s. 157–165.
- (4) Richold, M. *et al.* (1990), „In Vivo Cytogenetics Assays”, w: Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Sprawozdanie. Część I zmieniona, Kirkland, D.J. (red.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 115–141.
- (5) Tice, R.R. *et al.* (1994), Report from the working group on the *in vivo* mammalian bone marrow chromosomal aberration test, Mutation Research, t. 312/3, s. 305–312.

- (6) Adler, I.D. *et al.* (1998), Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, t. 417/1, s. 19–30.
 - (7) Ryan, T.P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, wyd. II, John Wiley and Sons, Nowy Jork.
 - (8) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, t. 723/2, s. 87–90.
 - (9) Hayashi, M. *et al.* (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, t. 312/3, s. 293–304.
 - (10) Fielder, R.J. *et al.* (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, *Mutagenesis*, t. 7/5, s. 313–319.
 - (11) OECD (2000), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation”, publikacje OECD na temat środowiska zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny, nr 19, OECD Publishing, Paryż.
 - (12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, *Methods in Molecular Biology*, t. 1044, s. 147–163.
 - (13) Lovell, D.P. *et al.* (1989), „Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays”, w: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (red.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 184–232.
-

Dodatek 1

DEFINICJE

Aneuploidia: wszelkie odchylenia od zwykłej diploidalnej (lub haploidalnej) liczby chromosomów w pojedynczym chromosomie lub w większej ich liczbie, ale nie w całym zestawie czy całych zestawach chromosomów (por. poliploidalność).

Centromer: region(y) chromosomu, w którym(-ch) mikrotubule wrzeciona podziałowego są asocjowane w trakcie podziału komórki, co umożliwia przemieszczenie się chromosomów potomnych do biegunów komórek potomnych.

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

Aberracja typu chromatydowego: strukturalne uszkodzenie chromosomu wyrażone jako złamanie pojedynczych chromatyd lub złamanie i ponowne połączenie się chromatyd.

Aberracja typu chromosomowego: strukturalne uszkodzenie chromosomu wyrażone jako złamanie chromatyd lub złamanie i ponowne połączenie się obu chromatyd w tym samym miejscu.

Endoreduplikacja: proces, w którym po fazie S replikacji DNA jądro komórkowe nie wchodzi w fazę mitozy, lecz rozpoczyna się kolejna faza S. Wynikiem są chromosomy o 4, 8, 16, ... chromatydach.

Przerwa: achromatyczne uszkodzenie mniejsze niż szerokość jednej chromatydę prowadzące od minimalnego wypaczenia chromatyd.

Indeks mitotyczny: stosunek liczby komórek w fazie mitozy do całkowitej liczby komórek w populacji będący miarą statusu proliferacji danej populacji komórek.

Aberracja liczby: zmiana liczby chromosomów względem standardowej liczby chromosomów typowej dla wykorzystywanych zwierząt (aneuploidia).

Poliploidalność: aberracja liczby, która skutkuje zmianą liczby chromosomów w całym zestawie chromosomów, w odróżnieniu od zmiany liczby chromosomów w części zestawu chromosomów (por. aneuploidia).

Strukturalna aberracja chromosomowa: zmiana w strukturze chromosomu wykrywalna przez badanie mikroskopowe etapu metafazy w cyklu podziału komórki, zaobserwowana jako delecje, fragmenty, zmiany zachodzące między chromosomami lub w obrębie chromosomu.

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

Dodatek 2

PLAN CZYNNIKOWY MAJĄCY NA CELU USTALENIE RÓŻNIC PŁCIOWYCH W BADANIU ABERRACJI CHROMOSOMOWYCH IN VIVO**Plan czynnikowy i jego analiza**

W ramach takiego planu poddaje się badaniu co najmniej 5 samców i 5 samic przy każdym poziomie stężenia, co oznacza wykorzystanie co najmniej 40 zwierząt (20 samców i 20 samic oraz odpowiednie kontrole dodatnie).

Plan ten, będący jednym z prostszych planów czynnikowych, jest równoważny dwukierunkowej analizie wariancji, w której płęć i poziom stężenia stanowią efekty główne. Dane te można analizować, stosując wiele standardowych pakietów oprogramowania statystycznego, takich jak SPSS, SAS, STATA i Genstat, a także wykorzystując R.

W ramach analizy dokonuje się podziału zmienności w zbiorze danych na zmienność pomiędzy płciami, zmienność pomiędzy stężeniami oraz na zmienność zależną od interakcji pomiędzy płciami i stężeniami. Każdy z członów porównuje się z szacunkową zmiennością pomiędzy zwierzętami z kontrpróby w ramach grup zwierząt tej samej płci, którym podaje się substancję chemiczną w takim samym stężeniu. Szczegółowe informacje na temat metodyki przeprowadzania tego doświadczenia można znaleźć w wielu standardowych podręcznikach statystycznych (zob. bibliografia) oraz w narzędziach pomocowych dostarczanych razem z pakietami oprogramowania statystycznego.

Analizę rozpoczyna się od sprawdzenia członu interakcji pomiędzy płcią a stężeniem w tabeli ANOVA (¹). W przypadku braku członu istotnej interakcji połączone wartości dla poszczególnych płci lub dla poszczególnych poziomów stężeń mogą posłużyć jako ważne testy statystyczne pomiędzy poziomami na podstawie członu zmienności wewnątrzgrupowej w tabeli ANOVA.

Kolejnym etapem analizy jest podział szacunku zmienności pomiędzy stężeniami na kontrasty do celów przeprowadzenia testu reakcji pod kątem kontrastów liniowych i kwadratowych przy poszczególnych poziomach stężeń. W przypadku wystąpienia istotnej interakcji pomiędzy płcią a stężeniem człon ten można również podzielić na kontrasty interakcji pomiędzy efektem liniowym a płcią oraz pomiędzy efektem kwadratowym a płcią. Człon ten umożliwia zbadanie, czy zależność stężenie-odpowiedź przebiega równoległe dla obydwu płci, czy też otrzymuje się różne odpowiedzi dla obu płci.

Szacunek zmienności wewnątrzgrupowej można wykorzystać do przeprowadzenia testów parami w odniesieniu do różnicy między średnimi. Tego rodzaju porównania można przeprowadzać pomiędzy średnimi dla obydwu płci oraz pomiędzy średnimi dla poszczególnych poziomów stężeń, np. w celu porównania z poziomami odnotowanymi w kontrolach ujemnych. W przypadkach, w których występuje istotna interakcja, można dokonać porównań pomiędzy średnimi dla poszczególnych stężeń w ramach danej płci lub pomiędzy średnimi dla poszczególnych płci w ramach danego stężenia.

Bibliografia

Istnieje wiele podręczników statystycznych poświęconych teorii, planowaniu, metodyce, analizie i interpretacji planów czynnikowych – począwszy od najprostszych analiz dwuczynnikowych po bardziej złożone formy wykorzystywane w metodyce planowania doświadczeń. Poniższa lista nie jest wyczerpująca. Niektóre publikacje zawierają praktyczne przykłady porównywalnych planów, niekiedy razem z kodem niezbędnym do przeprowadzenia analiz przy wykorzystaniu różnych pakietów oprogramowania.

Box, G.E.P, Hunter, W.G. i Hunter, J.S. (1978). *Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*. Nowy Jork: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. i Draper, N.R. (1987). *Empirical model-building and response surfaces*. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. i Davey, A.J.H. (2007). *Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences*. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). *The Design of Experiments. Statistical principles for practical application*. Cambridge University Press.

(¹) Statystycy stosujący podejście modelowe, np. ogólne modele liniowe, mogą przeprowadzić analizę w inny, choć porównywalny, sposób, ale niekoniecznie muszą korzystać z tradycyjnej tabeli ANOVA, która wywodzi się z algorytmicznych podejść do obliczania danych statystycznych opracowanych przed pojawieniem się komputerów.

Montgomery, D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J i Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.”;”;

5) w części B rozdział B.12 otrzymuje brzmienie:

„B.12 Test mikrojądrowy na erytrocytach ssaków

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 474 (2016). Stanowi ona część cyklu metod badawczych dotyczących toksykologii genetycznej. Opracowany został dokument OECD, który zawiera zwięzłe informacje na temat badań w zakresie toksykologii genetycznej oraz przegląd ostatnich zmian, jakie wprowadzono do wytycznych dotyczących badań (1).

Test mikrojądrowy na komórkach ssaków *in vivo* ma szczególne znaczenie dla oceny genotoksyczności, ponieważ czynniki związane z metabolizmem, farmakokinetyką oraz procesami naprawy DNA *in vivo* – choć mogą różnić się w zależności od gatunku – są aktywne i wywierają wpływ na reakcje. Przeprowadzenie testu *in vivo* jest również przydatne do celów dalszego badania genotoksyczności stwierdzonej w układzie *in vitro*.

Test mikrojądrowy na erytrocytach ssaków *in vivo* przeprowadza się w celu wykrycia indukowanych działaniem badanej substancji chemicznej uszkodzeń chromosomów lub aparatu mitotycznego erytroblastów. W teście ocenia się proces formowania mikrojądra w erytrocytach pobranych ze szpiku kostnego albo z komórek krwi obwodowej zwierząt, zazwyczaj gryzoni.

Celem testu mikrojądrowego jest zidentyfikowanie substancji chemicznych wywołujących uszkodzenia cytogenetyczne, które prowadzą do powstania mikrojąder zawierających opóźnione fragmenty chromosomów opóźnionych albo całe chromosomy.

Jeżeli erytroblast szpiku kostnego przekształci się w niedojrzały erytrocyt (określany również niekiedy jako erytrocyt polichromatyczny lub retikulocyt), główne jądro komórkowe zostaje usunięte; w takim przypadku jakiegokolwiek mikrojądro, które powstało w trakcie tego procesu, może pozostać w cytoplazmie. W takich komórkach łatwiej jest wizualizować lub wykrywać mikrojądra, ponieważ nie występuje w nich główne jądro komórkowe. Wzrost częstości występowania erytrocytów polichromatycznych zawierających mikrojądra u zwierząt poddanych działaniu substancji chemicznej świadczy o tym, że substancja ta przyczyniła się do powstania strukturalnych aberracji chromosomowych lub aberracji liczby.

Nowo powstałe erytrocyty zawierające mikrojądra wykrywa się i ustala się ich liczbę poprzez barwienie, a następnie zlicza się je metodą wzrokową przy wykorzystaniu mikroskopu albo przeprowadza się zautomatyzowaną analizę. Zliczanie dostatecznej liczby niedojrzałych erytrocytów w krwi obwodowej lub szpiku kostnym dorosłych zwierząt znacznie ułatwia zautomatyzowana platforma zliczająca. Tego rodzaju platformy stanowią dopuszczalne rozwiązanie alternatywne wobec ręcznego przeprowadzania oceny (2). Wyniki badań porównawczych wskazują, że metody takie – przy wykorzystaniu odpowiednich wzorców kalibracyjnych – może doprowadzić do uzyskania lepszej odtwarzalności i czułości między- i wewnątrzlaboratoryjnej niż w przypadku ręcznego zliczania pod mikroskopem (3) (4). Wśród zautomatyzowanych systemów, które mogą być wykorzystywane do pomiaru częstości występowania erytrocytów zawierających mikrojądra, należy wymienić m.in. cytometry przepływowe (5), platformy analizy obrazowej (6) (7) oraz cytometry wykorzystujące technologie skaningu laserowego (8).

Fragmenty chromosomów można odróżnić od całych chromosomów, stosując szereg kryteriów, choć zazwyczaj nie dokonuje się tego w trakcie testu. Wśród wspomnianych kryteriów należy wymienić stwierdzenie występowania lub braku kinetochoru lub DNA centromerowego, które stanowią charakterystyczne elementy nienaruszonych chromosomów. Brak kinetochoru lub DNA centromerowego świadczy o tym, że mikrojądro zawiera wyłącznie fragmenty chromosomów, natomiast obecność tych elementów wskazuje na utratę chromosomu.

Definicje stosowanych terminów zamieszczono w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

W ramach tego testu tkanką docelową do badania uszkodzeń genetycznych jest szpik kostny młodych dorosłych gryzoni, ponieważ w tej tkance wytwarzane są erytrocyty. Dopuszczalny jest pomiar mikrojąder w niedojrzałych erytrocytach w krwi obwodowej u innych gatunków ssaków, jeżeli wykazano czułość wystarczającą do wykrycia substancji chemicznych, które powodują strukturalne aberracje chromosomowe lub aberracje liczby w tych komórkach (przez indukcję mikrojąder w niedojrzałych erytrocytach) i jeżeli przedstawiono stosowne uzasadnienie naukowe. Głównym punktem końcowym jest częstość występowania erytrocytów polichromatycznych zawierających mikrojądra. Częstość występowania w krwi obwodowej dojrzałych erytrocytów zawierających mikrojądra może również stanowić punkt końcowy w przypadku gatunku, który nie wykazuje ostrej selekcji komórek z mikrojądrami w śledzienie oraz w przypadku gdy zwierzęta są stale poddawane działaniu substancji chemicznej przez okres dłuższy niż cykl życia erytrocytu u danego gatunku (np. przez co najmniej 4 tygodnie w przypadku myszy).

Jeżeli istnieją dowody świadczące o tym, że badana(-e) substancja(-e) chemiczna(-e) lub jej (ich) metabolit(y) nie dotrą do tkanki docelowej, przeprowadzenie tego badania może nie być właściwe.

Przed zastosowaniem niniejszej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się, czy zastosowanie niniejszej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak – dlaczego. Taka analiza nie jest konieczna, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny.

ZASADA METODY BADAWCZEJ

Zwierzęta poddaje się działaniu badanej substancji chemicznej z zastosowaniem odpowiedniej drogi narażenia. W przypadku wykorzystania szpiku kostnego zwierzęta uśmierca się w humanitarny sposób po upływie odpowiedniego czasu od podania substancji chemicznej, po czym pobiera się szpik kostny, sporządza się preparaty i barwi się je (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). W przypadku wykorzystania krwi obwodowej krew pobiera się po upływie odpowiedniego czasu od podania substancji chemicznej, po czym sporządza się preparaty i barwi się je (12) (16) (17) (18). Jeżeli substancję chemiczną podaje się w dawce ostrej, istotne jest, aby wybrać taki czas pobrania szpiku kostnego lub krwi, w którym będzie możliwe wykrycie indukcji erytrocytów polichromatycznych zawierających mikrojądra spowodowanej podaniem substancji chemicznej. W przypadku pobierania próbek krwi obwodowej musi również upłynąć dostateczny czas, aby takie erytrocyty pojawiły się we krwi. Preparaty analizuje się pod kątem obecności mikrojąder, stosując metody wizualizacji mikroskopowej, analizy obrazowej, cytometrii przepływowej albo laserowej cytometrii skaningowej.

WERYFIKACJA BIEGŁOŚCI LABORATORIUM

Badanie biegłości

Aby ustalić wystarczające doświadczenie laboratorium w zakresie omawianego testu przed zastosowaniem go w rutynowych badaniach, laboratorium powinno wykazać zdolność do odtworzenia oczekiwanych wyników na podstawie opublikowanych danych (17) (19) (20) (21) (22) w odniesieniu do częstości występowania mikrojąder z zastosowaniem co najmniej dwóch substancji służących do kontroli dodatniej (uwzględniając słabe reakcje wywołane niskimi dawkami substancji chemicznych służących do kontroli dodatniej), takich jak substancje wymienione w tabeli 1, oraz z zastosowaniem kontroli ze zgodnym nośnikiem/rozpuszczalnikiem (zob. pkt 26). W tego rodzaju doświadczeniach należy stosować dawki, które prowadzą do powstania możliwych do odtworzenia i powiązanych z wielkością dawki przyrostów i które umożliwiają wykazanie czułości i zakresu oznaczania układu badawczego w odniesieniu do tkanki będącej przedmiotem zainteresowania (szpik kostny lub krew obwodowa) przy wykorzystaniu metody zliczania, która ma być stosowana w laboratorium. Wymóg ten nie dotyczy laboratoriów, które dysponują odpowiednim doświadczeniem, tj. laboratoriów prowadzących bazę danych historycznych, o której mowa w pkt 14–18.

Dane historyczne dotyczące kontroli

W toku badań biegłości laboratorium powinno ustalić:

- zakres i rozkład historycznych wyników kontroli dodatniej oraz
- zakres i rozkład historycznych wyników kontroli ujemnej.

Przy pierwszym gromadzeniu danych dotyczących rozkładu historycznych wyników kontroli ujemnej wyniki jednoczesnej kontroli ujemnej powinny być zgodne z opublikowanymi danymi dotyczącymi kontroli, o ile takie dane istnieją. W miarę dodawania kolejnych danych doświadczalnych do rozkładu danych historycznych dotyczących kontroli jednoczesne kontrole ujemne powinny w idealnych warunkach mieścić się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % dla tego rozkładu. Prowadzona przez dane laboratorium baza danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej powinna być statystycznie istotna, aby zapewnić zdolność laboratorium do oceny rozkładu własnych danych dotyczących kontroli ujemnej. Z literatury przedmiotu wynika, że baza danych powinna zawierać wyniki co najmniej 10 doświadczeń, ale najlepiej co najmniej 20 doświadczeń przeprowadzonych w porównywalnych warunkach doświadczalnych. Laboratoria powinny stosować metody kontroli jakości, takie jak karty kontrolne (np. karty C lub karty X-średnie (23)) w celu określania stopnia zmienności gromadzonych przez nie danych oraz w celu wykazania, że stosowana przez nie metodologia jest „pod kontrolą”. Dalsze zalecenia dotyczące sposobu gromadzenia i wykorzystywania danych historycznych (tj. kryteria włączania danych do zbioru danych historycznych i wykluczania danych z tego zbioru oraz kryteria dopuszczalności dla danego doświadczenia) można znaleźć w literaturze (24).

Jeżeli laboratorium nie przeprowadziło dostatecznie dużej liczby doświadczeń, aby ustalić istotny statystycznie rozkład danych z kontroli ujemnej (zob. pkt 15) w trakcie badań biegłości (opisanych w pkt 13), dopuszcza się możliwość ustalenia rozkładu w trakcie pierwszych rutynowych badań. Takie podejście powinno być zgodne z zaleceniami przedstawionymi w literaturze (24), a wyniki kontroli ujemnej uzyskane w ramach tych doświadczeń powinny pozostać zgodne z opublikowanymi danymi dotyczącymi kontroli ujemnej.

Wszelkie zmiany w protokole doświadczalnym należy rozpatrywać pod kątem tego, czy ich wpływ na otrzymywane dane pozostaje spójny z dotychczas prowadzonymi przez laboratorium bazami danych historycznych dotyczących kontroli. Wyłącznie poważne niespójności powinny skutkować utworzeniem nowej bazy danych historycznych dotyczących kontroli, w przypadku gdy z ekspertyzy wynika, że dane odbiegają od poprzedniego rozkładu (zob. pkt 15). Podczas tworzenia nowej bazy danych utworzenie kompletnej bazy danych dotyczących kontroli ujemnej może nie być konieczne do przeprowadzenia samego badania, o ile laboratorium może wykazać, że wartości uzyskiwane przez nie w ramach jednoczesnej kontroli ujemnej pozostają zgodne z wynikami zawartymi w jego poprzedniej bazie danych albo z odpowiednimi opublikowanymi danymi.

Dane dotyczące kontroli ujemnej powinny obejmować częstość występowania erytrocytów polichromatycznych zawierających mikrojądra u każdego zwierzęcia. Jednoczesne kontrole ujemne powinny w idealnych warunkach mieścić się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % dla rozkładu danych zawartych w prowadzonej przez laboratorium bazie danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej. W przypadku gdy dane dotyczące jednoczesnej kontroli ujemnej nie mieszczą się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 %, włączenie ich do rozkładu kontroli historycznej może być dopuszczalne, pod warunkiem że dane te nie stanowią skrajnych obserwacji nietypowych oraz że istnieją dowody świadczące o tym, iż dany układ badawczy znajduje się „pod kontrolą” (zob. pkt 15), a także nie ma dowodów wskazujących na błąd techniczny lub ludzki.

OPIS METODY

Przygotowania

Wybór gatunku zwierząt

Należy prowadzić badania na zdrowych, młodych, dorosłych zwierzętach pochodzących ze szczepów na ogół wykorzystywanych w badaniach laboratoryjnych. Można wykorzystać myszy, szczury lub inny odpowiedni gatunek ssaków. W przypadku wykorzystywania krwi obwodowej należy zapewnić, aby usuwanie komórek z mikrojądrami z krwiobiegu przez śledzoną nie zakłócało wykrywania indukowanych mikrojąder u wybranego gatunku. Zostało to wyraźnie wykazane w przypadku krwi obwodowej myszy i szczurów (2). W sprawozdaniu powinno się przedstawić naukowe uzasadnienie wykorzystania gatunków innych niż szczury i myszy. W przypadku wykorzystywania zwierząt innych niż gryzonie zaleca się włączenie pomiaru indukowanych mikrojąder do innego stosowanego badania toksyczności.

Warunki utrzymywania i karmienia

W przypadku gryzoni temperatura w pomieszczeniu dla zwierząt powinna wynosić 22 °C (\pm 3 °C). Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 40 % i pożądaną jest, żeby nie przekraczała 70 % poza okresami czyszczenia pomieszczenia, celem powinno być utrzymywanie jej na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne z zachowaniem cyklu 12 godzin światła i 12 godzin ciemności. Do karmienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne oraz należy zapewnić zwierzętom nieograniczony dostęp do wody do picia. Wybór paszy może zależeć od potrzeby zapewnienia odpowiedniej domieszki badanej substancji chemicznej, jeżeli jest ona podawana tą drogą. Gryzoni należy trzymać w małych grupach (nie więcej niż pięć sztuk) składających się ze zwierząt tej samej płci i należących do tej samej grupy badanej, jeżeli nie przewiduje się, że mogłoby dojść do agresywnego zachowania, najlepiej w klatkach z pełną podłogą, oraz zapewnić im odpowiednie urozmaicenie warunków bytowania. Zwierzęta można utrzymywać pojedynczo tylko wtedy, gdy ma to uzasadnienie naukowe.

Przygotowanie zwierząt

Zazwyczaj wykorzystuje się zdrowe, młode, dorosłe zwierzęta (w przypadku gryzoni najlepiej w wieku 6–10 tygodni na początku poddawania działaniu substancji chemicznej, chociaż dopuszcza się również używanie nieco starszych zwierząt), które losowo przydziela się do grup kontrolnych i grup poddawanych działaniu substancji chemicznej. Zwierzęta zostają indywidualnie oznakowane przy użyciu humanitarnej, mało inwazyjnej metody (np. poprzez obrączkowanie, kolczykowanie, wszczepianie mikroukładów i identyfikację biometryczną, ale nie przycinanie uszu lub palców) i aklimatyzowane do warunków laboratoryjnych przez co najmniej pięć dni. Klatki należy rozmieścić w taki sposób, aby zminimalizować potencjalny wpływ ich układu. Należy unikać zanieczyszczenia krzyżowego kontrolą dodatnią i badaną substancją chemiczną. W momencie rozpoczęcia badania różnice w masie ciała zwierząt powinny być minimalne i nie powinny przekraczać \pm 20 % średniej masy dla każdej płci.

Przygotowanie dawek

Badane substancje chemiczne w stanie stałym należy rozpuszczać lub przygotowywać w postaci zawiesiny w odpowiednich rozpuszczalnikach lub nośnikach lub dodawać do paszy lub wody do picia przed podaniem dawki zwierzętom. Badane substancje chemiczne w stanie ciekłym mogą być dawkowane bezpośrednio lub można je rozcieńczać przed dawkowaniem. W przypadku narażenia inhalacyjnego badane substancje chemiczne można podawać w postaci gazu, pary lub stałych/ciekłych aerozoli, w zależności od ich właściwości fizykochemicznych. Należy stosować świeże preparaty badanej substancji chemicznej, chyba że z danych dotyczących stabilności wynika, iż przechowywanie tych preparatów jest dopuszczalne, i chyba że w danych tych określono warunki prawidłowego przechowywania takich preparatów.

Warunki badania

Kontrola z rozpuszczalnikiem/nośnikiem

Rozpuszczalnik/nośnik nie powinien wywoływać efektów toksycznych przy stosowanych poziomach dawek oraz nie powinien być w stanie wchodzić w reakcję chemiczną z badanymi substancjami chemicznymi. Jeśli wykorzystywane są inne niż dobrze znane rozpuszczalniki/nośniki, ich włączenie do doświadczenia powinno być poparte danymi wskazującymi ich zgodność. Zaleca się, aby w miarę możliwości w pierwszej kolejności rozważyć zastosowanie wodnego rozpuszczalnika/nośnika. Wśród przykładów powszechnie wykorzystywanych zgodnych rozpuszczalników/nośników można wymienić wodę, sól fizjologiczną, roztwór metylocelulozy, roztwór soli sodowej karboksymetylocelulozy, oliwę z oliwek i olej kukurydziany. W przypadku braku historycznych lub opublikowanych danych dotyczących kontroli wskazujących, że wybrany nietypowy rozpuszczalnik/nośnik nie indukuje mikrojąder ani nie powoduje żadnego innego szkodliwego efektu, należy wykonać badanie wstępne w celu ustalenia dopuszczalności stosowania kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem.

Kontrole

Kontrole dodatnie

W każdym badaniu należy co do zasady uwzględnić grupę zwierząt otrzymującą substancję chemiczną służącą do kontroli dodatniej. Od tego obowiązku można odstąpić, jeżeli laboratorium badawcze wykaże biegłość w przeprowadzaniu takiego badania i ustanowi zakres historycznych wyników kontroli dodatniej. W przypadku nieuwzględnienia jednoczesnej kontroli dodatniej do każdego doświadczenia należy włączyć kontrolę na potrzeby oceny ilościowej (utrwalone i niebarwione preparaty lub próbki zawiesiny komórek – stosownie do metody oceny ilościowej). Tego rodzaju kontrole można przeprowadzić, włączając do oceny ilościowej wyników badania odpowiednie próbki referencyjne, które zostały pozyskane w trakcie odrębnego przeprowadzanego okresowo (np. co 6–18 miesięcy) doświadczenia z wykorzystaniem kontroli dodatniej i które są przechowywane; na przykład w trakcie badania biegłości i – w stosownych przypadkach – w regularnych odstępach czasu w późniejszym okresie.

Substancje chemiczne służące do kontroli dodatniej powinny w przewidywalny sposób generować zauważalny wzrost częstości występowania mikrojąder w porównaniu z częstością samorzutną. W przypadku ręcznego zliczania pod mikroskopem dawki stosowane do celów kontroli dodatniej należy dobierać w taki sposób, aby efekty były jasne, lecz aby osoba zliczająca nie była w stanie natychmiast zidentyfikować zakodowanych próbek. Dopuszcza się, aby substancja chemiczna służąca do kontroli dodatniej była podawana inną drogą niż badana substancja chemiczna i zgodnie z innym harmonogramem podawania substancji chemicznej, a także aby próbki były pobierane wyłącznie w określonym czasie. Ponadto w stosownych przypadkach można rozważyć możliwość zastosowania substancji chemicznych służących do kontroli dodatniej powiązanych z określoną klasą chemiczną. W tabeli 1 przedstawiono przykładowe substancje chemiczne służące do kontroli dodatniej.

Tabela 1

Przykładowe substancje chemiczne służące do kontroli dodatniej

Substancje chemiczne i nr CAS
Metanosulfonian etylu [nr CAS 62-50-0]
Metanosulfonian metylu [nr CAS 66-27-3]
Etylonitrozomocznik [nr CAS 759-73-9]
Mitomycyna C [nr CAS 50-07-7]
Cyklofosfamid (monohydrat) [nr CAS 50-18-0 (nr CAS 6055-19-2)]
Trietylenomelamina [nr CAS 51-18-3]
Kolchicyna [nr CAS 64-86-8] lub winblastyna [nr CAS 865-21-4] – jako aneugeny

Kontrole ujemne

Od zwierząt z grupy kontrolnej ujemnej należy pobierać próbki w każdym okresie pobierania próbek i należy postępować z nimi w taki sam sposób, jak ze zwierzętami należącymi do grupy badanej, z tym że nie poddaje się ich działaniu badanej substancji chemicznej. Jeżeli do podania badanej substancji chemicznej wykorzystuje się rozpuszczalnik/nośnik, zwierzętom należącym do grupy kontrolnej również należy podać ten rozpuszczalnik/nośnik. Jeżeli jednak dane historyczne dotyczące kontroli ujemnej gromadzone przez laboratorium badawcze przy każdorazowym pobieraniu próbek będą wskazywały na stały poziom zmienności pomiędzy zwierzętami i stałą częstość występowania komórek z mikrojądrami, konieczne może być tylko jedno pobranie próbek na potrzeby kontroli ujemnej. Jeżeli w ramach kontroli ujemnej przeprowadza się tylko jedno pobranie próbek, próbki należy pobrać w pierwszym okresie pobierania próbek w ramach badania.

Jeżeli wykorzystywana jest krew obwodowa, w przypadku badań krótkoterminowych dopuszczalna może być również próbka przed podaniem substancji chemicznej zamiast jednoczesnej kontroli ujemnej, jeżeli dane wynikające z badania są spójne z bazą danych historycznych dotyczących kontroli prowadzoną przez dane laboratorium badawcze. W odniesieniu do szczurów wykazano, że pobieranie niewielkich próbek (np. poniżej 100 µl/dzień) przed podaniem substancji chemicznej ma minimalny wpływ na podstawową częstość występowania mikrojąder (25).

PROCEDURA

Liczba i płeć zwierząt

Na ogół reakcja mikrojądrowa jest podobna u samców i samic, w związku z czym większość badań można prowadzić na zwierzętach dowolnej płci (26). Dane wskazujące na występowanie istotnych różnic między samcami i samicami (np. różnice w toksyczności ogólnoustrojowej, metabolizmie, biodostępności, toksyczności w szpiku kostnym itd., w tym np. w badaniu ustalającym zakres dawkowania) stanowią przesłankę przemawiającą za przeprowadzaniem badań na zwierzętach obu płci. W takim przypadku właściwe może być przeprowadzenie badania na zwierzętach obu płci, np. w ramach badania toksyczności dawki powtórzonej. Zastosowanie planu czynnikowego może być wskazane, jeżeli do badania używa się zwierząt obu płci. Szczegółowe informacje dotyczące sposobu analizy danych z wykorzystaniem tego planu można znaleźć w dodatku 2.

Na początku badania należy ustalić liczebność grup w celu zapewnienia w każdej grupie co najmniej 5 nadających się do poddania analizie zwierząt jednej płci lub każdej płci, jeżeli wykorzystuje się zwierzęta obu płci. Jeżeli narażenie człowieka na działanie substancji chemicznych może mieć charakter uzależniony od płci, jak to na przykład ma miejsce w przypadku niektórych produktów leczniczych, badanie należy przeprowadzić na zwierzętach odpowiedniej płci. Wskazówka odnośnie do maksymalnych typowych wymagań w zakresie liczby zwierząt – w przypadku badania szpiku kostnego prowadzonego zgodnie z parametrami ustalonymi w pkt 37 z trzema grupami otrzymującymi dawki i jednoczesną kontrolą ujemną i dodatnią (każda grupa złożona z pięciu zwierząt jednej płci) wymagane byłoby użycie 25–35 zwierząt.

Poziomy dawek

W przypadku przeprowadzenia wstępnego badania ustalającego zakres dawkowania ze względu na brak dostępnych odpowiednich danych umożliwiających dobranie dawki, badanie takie należy wykonać w tym samym laboratorium z wykorzystaniem tego samego gatunku, szczepu, płci i schematu podawania substancji chemicznej, jakie mają być stosowane w badaniu głównym (27). Celem badania powinno być określenie maksymalnej tolerowanej dawki (MTD) zdefiniowanej jako najwyższa dawka tolerowana bez wywoływania objawów toksyczności ograniczającej badanie w stosunku do czasu trwania badania (na przykład dawka wywołująca spadek masy ciała lub cytotoksyczność układu krwiotwórczego, ale niepowodująca śmierci lub objawów bólu, cierpienia lub stresu, które wiązałyby się z koniecznością uśmiercenia zwierzęcia w humanitarny sposób (28)).

Najwyższą dawkę można również zdefiniować jako dawkę, która wywołuje toksyczność w szpiku kostnym (np. redukcję odsetka niedojrzałych erytrocytów wśród erytrocytów ogółem w szpiku kostnym lub krwi obwodowej o ponad 50 %, ale do poziomu nie niższego niż 20 % wartości kontrolnej). Niemniej podczas analizowania komórek CD71-pozytywnych w krążeniu obwodowym (tj. za pomocą cytometrii przepływowej) ta bardzo młoda frakcja niedojrzałych erytrocytów szybciej reaguje na narażenie na substancję toksyczną niż większa RNA-pozytywna kohorta niedojrzałych erytrocytów. Wyższa toksyczność pozorna może być zatem widoczna w planach narażenia ostrego, w których bada się frakcję CD71-pozytywnych niedojrzałych erytrocytów, w porównaniu z planami, w których identyfikuje się niedojrzałe erytrocyty na podstawie zawartości RNA. Dlatego jeżeli w doświadczeniach podaje się substancję chemiczną przez pięć lub mniej dni, najwyższy poziom dawki badanej substancji chemicznej powodujący toksyczność można określić jako dawkę, która wywołuje statystycznie istotny spadek odsetka CD71-pozytywnych niedojrzałych erytrocytów wśród erytrocytów ogółem, ale do poziomu nie niższego niż 5 % wartości kontrolnej (29).

Substancje chemiczne wykazujące intensywne parametry toksykokinetyczne lub wywołujące procesy detoksykacji, które mogą prowadzić do zmniejszenia narażenia po długim okresie podawania substancji chemicznej, mogą stanowić wyjątki w odniesieniu do kryteriów ustalania dawki i powinny być oceniane na zasadzie jednostkowych przypadków.

Aby uzyskać informacje na temat zależności dawka-odpowiedź, w kompletnym badaniu należy uwzględnić grupę kontrolną ujemną oraz co najmniej trzy poziomy dawek, przy czym każda kolejna dawka jest większa od poprzedniej na ogół dwukrotnie, ale nie więcej niż czterokrotnie. Jeżeli wyniki badania ustalającego zakres dawkowania lub istniejące dane będą wskazywały, że badana substancja chemiczna nie wywołuje toksyczności, najwyższa dawka w przypadku okresu podawania wynoszącego 14 dni lub więcej powinna wynosić 1 000 mg/kg masy ciała na dobę, a w przypadku okresów podawania wynoszących mniej niż 14 dni powinna wynosić 2 000 mg/kg masy ciała na dobę. Jeżeli jednak badana substancja chemiczna będzie miała działanie toksyczne, maksymalną tolerowaną dawkę należy ustalić na poziomie odpowiadającym najwyższej podanej dawce, przy czym najlepiej byłoby, gdyby zastosowane poziomy dawek obejmowały zakres od dawki maksymalnej do dawki wywołującej toksyczność w niewielkim stopniu lub dawki niewywołującej toksyczności. W przypadku zaobserwowania toksyczności w tkance docelowej (szpiku kostnym) przy wszystkich badanych poziomach dawek zaleca się dalsze badania z wykorzystaniem dawek nietoksycznych. W przypadku badań przeprowadzanych w celu uzyskania bardziej szczegółowych ilościowych informacji na temat zależności dawka-odpowiedź konieczne może okazać się utworzenie dodatkowych grup otrzymujących dawki. Wspomniane wartości graniczne mogą różnić się w przypadku niektórych rodzajów badanych substancji chemicznych (np. produktów leczniczych przeznaczonych dla ludzi), które podlegają szczególnym wymogom.

Badanie graniczne

Jeżeli wyniki badania ustalającego zakres dawkowania lub dostępne dane na temat powiązanych szczepów zwierząt będą wskazywały, że poddanie zwierząt działaniu substancji chemicznej w stężeniu odpowiadającym co najmniej dawce granicznej (o której mowa poniżej) nie wywołuje żadnych możliwych do zaobserwowania efektów toksycznych (uwzględniając brak spadku tempa dzielenia się komórek szpiku kostnego lub brak innych dowodów świadczących o cytotoxyczności tkanki docelowej), i jeżeli wyniki badań genotoksyczności *in vitro* lub dane dotyczące strukturalnie powiązanych substancji chemicznych nie będą wskazywały na możliwość wystąpienia genotoksyczności, przeprowadzenie pełnego badania z trzema poziomami dawek może nie być konieczne, o ile wykazano, że badane substancje chemiczne docierają do tkanki docelowej (szpiku kostnego). W takich przypadkach pojedynczy poziom dawki, odpowiadający dawce granicznej, może być wystarczający. Jeżeli okres podawania wynosi co najmniej 14 dni, dawka graniczna wynosi 1 000 mg/kg masy ciała na dobę. W przypadku okresów podawania poniżej 14 dni dawka graniczna wynosi 2 000 mg/kg masy ciała na dobę.

Podawanie dawek

Planując badanie, należy wziąć pod uwagę przewidywaną drogę narażenia ludzi. W związku z tym można wybrać jako uzasadnione takie drogi podawania jak: w pokarmie, z wodą do picia, miejscowe, podskórne, dożylnie, ustne (przez sondę), przez wdychanie, dotchawicze lub przez implantację. W każdym razie drogę narażenia należy dobrać w taki sposób, aby zapewnić odpowiednie narażenie tkanek docelowych. Nie zaleca się na ogół dokonywania wstrzyknięć dootrzewnowych, ponieważ nie jest to typowa droga narażenia ludzi – taką drogę należy stosować wyłącznie w przypadku wystąpienia konkretnego uzasadnienia naukowego. Jeżeli badaną substancję chemiczną dodaje się do paszy lub wody do picia, w szczególności w przypadku pojedynczej dawki substancji, należy upewnić się, że okres między spożyciem paszy i wody a pobraniem próbki jest wystarczający do tego, aby zapewnić możliwość wykrycia skutków podania substancji (zob. pkt 37). Maksymalna objętość płynu, jaką można podać przez sondę lub wstrzyknąć jednorazowo, zależy od wielkości zwierzęcia doświadczalnego. Objętość ta nie powinna co do zasady przekraczać 1 ml/100 g masy ciała, oprócz roztworów wodnych, w przypadku których można zastosować maksymalnie 2 ml/100 g masy ciała. Wykorzystanie objętości wyższych niż podane musi być uzasadnione. Należy ograniczyć zmienność objętości stosowanej w badaniu, dostosowując stężenie w taki sposób, by zapewnić podawanie substancji chemicznej w takiej samej objętości w stosunku do masy ciała przy wszystkich poziomach dawek – nie dotyczy to jednak badanych substancji chemicznych o podrażniającym lub żrącym działaniu, które w normalnych warunkach wywołują poważniejsze skutki w przypadku ich podania w wyższych stężeniach.

Harmonogram podawania substancji chemicznej

Najlepiej podawać co najmniej dwie dawki w odstępach 24-godzinnych, szczególnie w przypadku włączenia tego badania do innych badań toksyczności. W innym przypadku można stosować pojedynczą dawkę, jeżeli ma to uzasadnienie naukowe (np. jeżeli wiadomo, że badane substancje chemiczne blokują cykl komórkowy). Badane substancje chemiczne mogą być również podawane jako dawka dzielona, tj. co najmniej dwa podania substancji tego samego dnia w odstępie czasu nie większym niż 2–3 godziny, aby łatwiej było podawać substancję w dużej objętości. W takim przypadku lub przy podawaniu badanej substancji chemicznej drogą wziewną okres pobierania próbek należy zaplanować w oparciu o czas podania ostatniej dawki lub czas ustania narażenia na działanie substancji.

Badanie można przeprowadzić na myszach lub szczurach na jeden z trzech sposobów:

- a. zwierzęta są jednorazowo poddawane działaniu badanej substancji chemicznej. Próbki szpiku kostnego pobiera się przynajmniej dwukrotnie (z odrębnych grup zwierząt), rozpoczynając nie wcześniej niż 24 godziny po podaniu substancji chemicznej, ale nie później niż 48 godzin po podaniu, z zachowaniem odpowiednich odstępów czasu między pobieraniem próbek, chyba że wiadomo, iż badana substancja chemiczna ma wyjątkowo długi okres półtrwania. Pobranie próbek przed upływem 24 godzin po podaniu substancji chemicznej wymaga uzasadnienia. Próbki krwi obwodowej pobiera się przynajmniej dwukrotnie (z tej samej grupy zwierząt), rozpoczynając nie wcześniej niż 36 godzin po podaniu substancji chemicznej, ale nie później niż 72 godziny po podaniu, z zachowaniem odpowiedniego(-ch) odstępu(-ów) po pobraniu pierwszej próbki. Przy pierwszym pobraniu próbek wszystkie grupy otrzymujące dawki powinny zostać poddane działaniu substancji chemicznej, po czym należy pobrać próbki do analizy; w kolejnych okresach pobierania próbek należy jednak podawać wyłącznie najwyższą dawkę. Jeżeli po jednym pobraniu próbek zostanie rozpoznana reakcja dodatnia, dodatkowe pobieranie próbek nie jest wymagane, chyba że potrzebne są ilościowe informacje o zależności dawka-odpowiedź. Opisane czasy pobrania wynikają z kinetyki pojawiania się i zanikania mikrojąder w tych dwóch przedziałach tkanek;
- b. jeżeli substancja chemiczna jest podawana dwa razy dziennie (np. dwie dawki w 24-godzinnych odstępach czasu), próbki należy pobrać jednorazowo między 18 a 24 godziną po ostatnim podaniu substancji chemicznej w przypadku szpiku kostnego lub między 36 a 48 godziną po ostatnim podaniu substancji chemicznej w przypadku krwi obwodowej (30). Opisane czasy pobrania wynikają z kinetyki pojawiania się i zanikania mikrojąder w tych dwóch przedziałach tkanek;
- c. jeżeli substancja chemiczna jest podawana co najmniej trzy razy dziennie (np. co najmniej trzy dawki w około 24-godzinnych odstępach), próbki szpiku kostnego należy pobrać nie później niż 24 godziny po ostatnim podaniu substancji chemicznej, a próbki krwi obwodowej należy pobrać nie później niż 40 godzin po ostatnim podaniu substancji chemicznej (31). Ten wariant podawania substancji chemicznej uwzględnia połączenie testu kometowego (np. pobieranie próbek po 2–6 godzinach od podania ostatniej dawki) z testem mikrojądrowym oraz włączenie testu mikrojądrowego do badania toksyczności dawki powtórzonej. Zgromadzone dane wykazywały, że indukcję mikrojąder można zaobserwować w takich szerszych ramach czasowych, jeżeli substancję podano co najmniej 3-krotnie (15).

Inne schematy dawkowania lub pobierania próbek można wykorzystywać w stosownych przypadkach i jeżeli jest to naukowo uzasadnione, jak również w celu ułatwienia włączenia tego badania do innych badań toksyczności.

Obserwacje

Ogólne obserwacje kliniczne zwierząt doświadczalnych wraz z rejestrowaniem objawów klinicznych powinny odbywać się co najmniej raz dziennie, najlepiej każdego dnia o tej samej porze oraz z uwzględnieniem szczytowego okresu przewidywanych skutków po dawkowaniu. Co najmniej dwa razy dziennie w trakcie okresu dawkowania wszystkie zwierzęta powinny być obserwowane pod kątem zachorowalności i upadkowości. Wszystkie zwierzęta powinny być ważone na początku badania, co najmniej raz w tygodniu w trakcie badań dawki powtórzonej oraz po uśmierceniu. W przypadku badań trwających co najmniej tydzień co najmniej raz w tygodniu należy dokonywać pomiaru ilości spożytego pokarmu. Jeżeli badana substancja chemiczna jest podawana w wodzie do picia, należy mierzyć spożycie wody przy każdej zmianie wody i co najmniej raz w tygodniu. Zwierzęta, u których stwierdzono oznaki podwyższonej toksyczności nieprowadzące do śmierci, należy uśmiercić w humanitarny sposób przed zakończeniem okresu badania (28). W pewnych okolicznościach można monitorować temperaturę ciała zwierząt, ponieważ hipertermia i hipotermia wywołane podaniem substancji chemicznej przyczyniły się do otrzymania błędnych wyników (32) (33) (34).

Narażenie tkanki docelowej

W odpowiednim momencie badania należy pobrać próbkę krwi, aby zbadać poziomy osocza po zastosowaniu badanych substancji chemicznych celem wykazania, że doszło do narażenia szpiku kostnego, jeżeli będzie to zasadne i jeżeli nie istnieją żadne inne dane dotyczące narażenia (zob. pkt 48).

Przygotowanie szpiku kostnego/krwi

Komórki szpiku kostnego pobiera się zazwyczaj z kości udowych lub piszczelowych natychmiast po uśmierceniu zwierząt w humanitarny sposób. Na ogół komórki są usuwane z kości, preparowane i barwione z zastosowaniem uznanych metod. Niewielkie objętości krwi obwodowej można uzyskać, zgodnie z właściwymi standardami w zakresie dobrostanu zwierząt, przy użyciu metody umożliwiającej przeżycie zwierzęcia doświadczalnego, takiej jak spowodowanie krwawienia z żyły ogonowej lub innego odpowiedniego naczynia krwionośnego, albo poprzez nakłucie serca lub pobranie próbek z dużego naczynia krwionośnego podczas uśmiercania zwierzęcia. W przypadku erytrocytów pozyskiwanych zarówno ze szpiku kostnego, jak i z krwi obwodowej, w zależności od metody analizy, komórki można niezwłocznie poddać natychmiastowemu barwieniu (16) (17) (18), można z nich sporządzać preparaty wymazowe, a następnie barwić je do celów analizy mikroskopowej, lub można utrwalać je i barwić odpowiednio do celów analizy opartej na cytometrii przepływowej. Wykorzystanie barwnika specyficznego dla DNA [np. oranżu akrydyny (35) lub Hoechst 33258 plus pyroniny-Y (36)] może wyeliminować niektóre spośród artefaktów związanych ze stosowaniem barwnika niebędącego barwnikiem specyficznym dla DNA. Zaleta ta nie uniemożliwia zastosowania zwykłych barwników (np. metody Giemsa na potrzeby analizy mikroskopowej). Można wykorzystać również dodatkowe systemy [np. kolumny celulozowe mające na celu usunięcie komórek jądrowych (37) (38)], pod warunkiem że wykazano zgodność tych systemów z przygotowaniem próbek w laboratorium.

Na potrzeby określenia charakteru mikrojąder (chromosom/fragment chromosomu) w celu ustalenia, czy mechanizm indukcji mikrojąder jest spowodowany aktywnością klastogenną czy aneugenną, można zastosować przeciwciała antykinetochorowe (39), FISH z sondami molekularnymi specyficznymi dla panceromerów (40) lub syntezę *in situ* przy udziale startera ze starterami specyficznymi dla panceromerów, wraz z odpowiednim barwieniem kontrastowym DNA (41), w przypadku gdy metody te mają zastosowanie. Inne metody rozróżnienia klastogonów i aneugenów można stosować, o ile okazały się skuteczne.

Analiza (ręczna i automatyczna)

Wszystkie preparaty lub próbki do analizy, w tym te stanowiące kontrolę dodatnią i ujemną, należy indywidualnie zakodować przed rozpoczęciem jakiegokolwiek analizy i zrandomizować, tak aby osoba ręcznie zliczająca nie znała warunków podawania substancji chemicznej; takie kodowanie nie jest konieczne w przypadku stosowania automatycznych systemów zliczania, które nie opierają się na kontroli wizualnej i nie są podatne na stronniczość osoby przeprowadzającej analizę. Odsetek niedojrzałych erytrocytów wśród ogółu (dojrzałych i niedojrzałych) erytrocytów jest oznaczany w odniesieniu do każdego zwierzęcia poprzez zliczenie ogółem co najmniej 500 erytrocytów w przypadku szpiku kostnego oraz 2 000 erytrocytów w przypadku krwi obwodowej (42). Aby ustalić częstość występowania erytrocytów polichromatycznych zawierających mikrojądra, należy zliczyć co najmniej 4 000 niedojrzałych erytrocytów na zwierzę (43). Jeżeli informacje przechowywane w bazie danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej wskazują, że średnia podstawowa częstość występowania erytrocytów polichromatycznych zawierających mikrojądra w danym laboratorium badawczym jest niższa niż 0,1 %, należy rozważyć możliwość oceny ilościowej dodatkowych komórek. W trakcie analizy próbek odsetek niedojrzałych erytrocytów wśród erytrocytów ogółem u zwierząt poddawanych działaniu substancji chemicznej nie powinien być niższy niż 20 % odsetka odnotowanego w kontroli z nośnikiem/rozpuszczalnikiem, w przypadku gdy stosowane jest zliczanie pod mikroskopem, oraz nie powinien być niższy niż około 5 % odsetka odnotowanego w kontroli z nośnikiem/rozpuszczalnikiem, w przypadku gdy stosowane jest zliczanie CD71-pozytywnych niedojrzałych erytrocytów metodami cytometrycznymi (zob. pkt 31) (29). Na przykład jeżeli w przypadku oznaczania erytrocytów w szpiku kostnym pod mikroskopem odsetek niedojrzałych erytrocytów w szpiku kostnym w grupie kontrolnej wynosi 50 %, górna granica toksyczności będzie wynosiła 10 % niedojrzałych erytrocytów.

Ze względu na fakt, że śledziona szczura wchłania i niszczy erytrocyty zawierające mikrojądra, w celu utrzymania wysokiego poziomu czułości badania podczas analizy krwi obwodowej szczura preferowane jest ograniczenie analizy erytrocytów polichromatycznych zawierających mikrojądra do najmłodszej frakcji. Przy stosowaniu automatycznych metod analizy te najbardziej niedojrzałe erytrocyty można zidentyfikować w oparciu o ich wysoką zawartość RNA, czyli wysoki poziom receptorów transferyny (CD71-pozytywnych) obecnych na ich powierzchni (31). Bezpośrednie porównanie różnych metod barwienia wykazało jednak, że zadowalające wyniki można uzyskać przy użyciu różnych metod, w tym konwencjonalnego barwienia oranżem akrydyny (3) (4).

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ**Opracowanie wyników**

Dane dotyczące poszczególnych zwierząt należy przedstawić w postaci tabeli. Liczbę zliczonych niedojrzałych erytrocytów, liczbę erytrocytów polichromatycznych zawierających mikrojądra oraz odsetek niedojrzałych erytrocytów wśród erytrocytów ogółem należy wymienić oddzielnie w odniesieniu do każdego zwierzęcia poddanego analizie. Jeżeli myszy są poddawane działaniu substancji chemicznej nieprzerwanie przez co najmniej cztery tygodnie, należy również podać dane dotyczące liczby i odsetka dojrzałych erytrocytów zawierających mikrojądra, jeżeli zgromadzono takie dane. Należy również zgłosić dane dotyczące toksyczności u zwierząt i objawów klinicznych.

Kryteria dopuszczalności

Dopuszczalność badania ocenia się na podstawie następujących kryteriów:

- a. Uznaje się, że dopuszczalne jest włączenie danych dotyczących jednoczesnej kontroli ujemnej do prowadzonej przez laboratorium bazy danych historycznych dotyczących kontroli (zob. pkt 15–18).
- b. jednoczesne kontrole dodatnie lub kontrole na potrzeby oceny ilościowej powinny wywoływać reakcje zgodne z reakcjami odnotowanymi w bazie danych historycznych dotyczących kontroli dodatniej i wykazywać statystycznie istotny wzrost w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną (zob. pkt 24–25);
- c. objęto analizą odpowiednią liczbę dawek i komórek.
- d. kryteria wyboru najwyższej dawki są spójne z kryteriami opisanymi w pkt 30–33.

Ocena i interpretacja wyników

O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie dodatni, jeżeli:

- a. co najmniej jedna z grup badanych wykazuje statystycznie istotny wzrost częstości występowania erytrocytów polichromatycznych zawierających mikrojądra w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną,
- b. ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu tendencji pokazuje, że wzrost jest powiązany z dawką w co najmniej jednym okresie pobierania próbek, oraz
- c. którykolwiek z otrzymanych wyników znajduje się poza rozkładem danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (np. poza granicami kontrolnymi wyznaczającymi przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona);

Jeżeli w danym okresie pobierania próbek bada się wyłącznie najwyższą dawkę, badaną substancję chemiczną uznaje się za dającą wynik wyraźnie dodatni, jeżeli odnotowano statystycznie istotny wzrost w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną, a wyniki znajdują się poza rozkładem danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (np. poza granicami kontrolnymi wyznaczającymi przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona). Zalecenia dotyczące najodpowiedniejszych metod statystycznych można znaleźć w literaturze (44) (45) (46) (47). Przy przeprowadzaniu analizy dawka-odpowiedź należy zbadać co najmniej trzy grupy otrzymujące dawkę, które poddano działaniu substancji chemicznej. W badaniach statystycznych należy przyjąć, że jednostką doświadczalną jest zwierzę. Wyniki dodatnie testu mikrojądrowego wskazują, że badana substancja chemiczna indukuje mikrojądra, które są wynikiem aberracji chromosomowej lub uszkodzenia aparatu mitotycznego erytroblastów gatunku doświadczalnego. W przypadku gdy badanie przeprowadzono w celu wykrycia centromerów w mikrojądrach, jeżeli badana substancja chemiczna powoduje tworzenie się mikrojąder zawierających centromery (DNA centromerowe lub kinetochor, co wskazuje na utratę całego chromosomu), stanowi to dowód, że badana substancja chemiczna jest aneugenem.

O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie ujemny, jeżeli we wszystkich zbadanych warunkach doświadczalnych:

- a. w żadnej grupie badanej nie odnotowano statystycznie istotnego wzrostu częstości występowania erytrocytów polichromatycznych zawierających mikrojądra w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną,

- b. ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu tendencji pokazuje, że wzrost nie jest powiązany z dawką w żadnym okresie pobierania próbek,
- c. wszystkie wyniki mieszczą się w rozkładzie danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (np. w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona), oraz
- d. doszło do narażenia szpiku kostnego na działanie badanej substancji chemicznej lub badanych substancji chemicznych.

Zalecenia dotyczące najodpowiedniejszych metod statystycznych można znaleźć w literaturze (44) (45) (46) (47). Za dowody świadczące o narażeniu szpiku kostnego na działanie badanej substancji chemicznej można uznać spadek stosunku erytrocytów niedojrzałych do dojrzałych lub wyniki pomiaru stężenia badanej substancji chemicznej w osoczu lub we krwi. Jeżeli substancję chemiczną podano drogą dożylną, przedstawienie dowodów narażenia na działanie substancji chemicznej nie jest konieczne. Ewentualnie narażenie szpiku kostnego na działanie substancji chemicznej można wykazać w oparciu o dane dotyczące wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i wydalania pozyskane w ramach niezależnego badania przeprowadzonego z zastosowaniem tej samej drogi i na tych samych gatunkach. Wyniki ujemne świadczą o tym, że w warunkach badania badana substancja chemiczna nie indukuje mikrojąder w niedojrzałych erytrocytach gatunków doświadczalnych.

Weryfikacja wyraźnie dodatniej lub ujemnej reakcji nie jest wymagana.

Jeżeli reakcja nie jest ani wyraźnie ujemna, ani wyraźnie dodatnia oraz aby ułatwić ustalenie biologicznego znaczenia wyniku (np. niewielki lub graniczny wzrost), dane powinny zostać ocenione w oparciu o opinię eksperta lub wyniki dalszych badań przeprowadzonych w ramach już zakończonych doświadczeń. W niektórych przypadkach warto rozważyć możliwość zbadania większej liczby komórek lub powtórzenia doświadczenia w zmienionych warunkach doświadczalnych.

W rzadkich przypadkach nawet po przeprowadzeniu dalszych badań uzyskane dane uniemożliwią wyciągnięcie wniosku, iż badana substancja chemiczna daje wyniki dodatnie albo ujemne i w takiej sytuacji badanie zostanie uznane za niejednoznaczne.

Sprawozdanie z badania

Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Podsumowanie

Badana substancja chemiczna:

- źródło, numer partii, data graniczna do użytku, jeżeli jest dostępna;
- stabilność badanej substancji chemicznej, jeżeli jest znana;

Substancja jednoskładnikowa:

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

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:

- opisane w miarę możliwości poprzez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

Przygotowanie badanej substancji chemicznej:

- uzasadnienie wyboru nośnika;
- rozpuszczalność oraz stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku/nośniku, jeżeli są znane;

- przygotowanie postaci użytkowych przeznaczonych do spożycia w paszy i z wodą do picia lub w formie wziewnej;
- oznaczenie analityczne postaci użytkowych (np. stabilność, jednorodność, stężenia nominalne), jeżeli jest przeprowadzane.

Zwierzęta doświadczalne:

- gatunek/szczep wykorzystywany w badaniu wraz z uzasadnieniem jego wyboru;
- liczba, wiek i płeć zwierząt;
- źródło, warunki utrzymywania, pasza itp.;
- metoda indywidualnego znakowania zwierząt;
- w przypadku badań krótkoterminowych: masa ciała poszczególnych zwierząt na początku i na końcu badania; w przypadku badań trwających dłużej niż jeden tydzień: masa ciała poszczególnych zwierząt w trakcie badania oraz informacje o spożyciu pokarmu. W odniesieniu do każdej grupy należy uwzględnić informacje o zakresie masy ciała oraz o średniej i odchyleniu standardowym.

Warunki badania:

- dane dotyczące kontroli dodatnich i ujemnych (z rozpuszczalnikiem/nośnikiem);
- dane zgromadzone w ramach badania ustalającego zakres dawkowania, jeżeli zostało przeprowadzone;
- uzasadnienie wyboru poziomu dawkowania;
- szczegółowe informacje dotyczące przygotowania badanej substancji chemicznej;
- szczegółowe informacje dotyczące podawania badanej substancji chemicznej;
- uzasadnienie drogi podawania i długości okresu podawania;
- metody stosowane w celu sprawdzenia, czy badane substancje chemiczne dostały się do krwiobiegu lub dotarły do tkanki docelowej;
- dawka faktyczna (mg/kg masy ciała na dobę) obliczona w oparciu o stężenie badanej substancji chemicznej w paszy / wodzie do picia (ppm) i spożycie, w stosownych przypadkach;
- szczegółowe informacje dotyczące jakości pokarmu i wody;
- metoda uśmiercenia;
- metoda analgezji (jeżeli jest stosowana);
- szczegółowy opis harmonogramów podawania substancji chemicznej i pobierania próbek oraz ich uzasadnienie;
- metody przygotowywania preparatów;
- procedury izolowania i konserwacji próbek;
- metody pomiaru toksyczności;
- kryteria zliczania erytrocytów polichromatycznych zawierających mikrojądra;
- liczba zbadanych komórek na zwierzę w celu ustalenia częstości występowania erytrocytów polichromatycznych zawierających mikrojądra oraz odsetka niedojrzałych erytrocytów w stosunku do dojrzałych;
- kryteria dopuszczalności badania;
- metody, takie jak stosowanie przeciwciał antykinetochorowych lub sond molekularnych specyficznych dla centromerów w celu określenia, w stosownych przypadkach, czy mikrojądra zawierają całe chromosomy czy fragmenty chromosomów.

Wyniki:

- stan zwierząt przed badaniem i podczas całego okresu badania, w tym oznaki toksyczności;
- odsetek niedojrzałych erytrocytów wśród erytrocytów ogółem;
- liczba erytrocytów polichromatycznych zawierających mikrojądra podawana osobno dla każdego zwierzęcia;
- średnia \pm odchylenie standardowe erytrocytów polichromatycznych zawierających mikrojądra na grupę;
- w stosownych przypadkach zależność dawka-odpowiedź;
- zastosowane analizy i metody statystyczne;
- dane dotyczące jednoczesnej kontroli ujemnej i jednoczesnej kontroli dodatniej wraz z zakresami, średnimi oraz odchyleniami standardowymi;
- dane historyczne dotyczące kontroli ujemnej i dodatniej wraz z zakresami, średnimi i odchyleniami standardowymi oraz granice kontrolne wyznaczające przedział 95 % dla rozkładu, w tym czas objęty obserwacją oraz liczba punktów danych;
- dane potwierdzające, że doszło do narażenia szpiku kostnego na działanie substancji chemicznej;
- dane dotyczące cech charakterystycznych wskazujące, czy mikrojądra zawierają całe chromosomy czy fragmenty chromosomów, jeżeli ma to zastosowanie;
- spełnione kryteria pozwalające uznać reakcję za dodatnią lub ujemną.

Omówienie wyników.**Wniosek.****Bibliografia.****BIBLIOGRAFIA**

- (1) OECD, Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015, Publikacje OECD na temat środowiska, seria dotycząca badań i oceny, nr 234, OECD, Paryż.
- (2) Hayashi, M. *et al.* (2007), *in vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, t. 627/1, s. 10–30.
- (3) MacGregor, J.T. *et al.* (2006), Flow cytometric analysis of micronucleated peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat, *Toxicology Sciences*, t. 94/1, s. 92–107.
- (4) Dertinger, S.D. *et al.* (2006), Flow cytometric analysis of micronucleated peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring, *Toxicological Sciences*, t. 94/1, s. 83–91.
- (5) Dertinger, S.D. *et al.* (2011), Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing *in vivo* cytogenetic damage, *Mutagenesis*, t. 26/1, s. 139–145.
- (6) Parton, J.W., W.P. Hoffman, M.L. Garriott (1996), Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system, *Mutation Research*, t. 370/1, s. 65–73.
- (7) Asano, N. *et al.* (1998), An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravitaly stained peripheral blood cells, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, t. 404/1–2, s. 149–154.

- (8) Styles, J.A.*et al.*(2001), Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, *Cytometry*, t. 44/2, s. 153–155.
- (9) Heddle, J.A.(1973), A rapid *in vivo* test for chromosomal damage, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, t. 18/2, s. 187–190.
- (10) Schmid, W. (1975), The micronucleus test, *Mutation Research*, t. 31/1, s. 9–15.
- (11) Heddle, J.A.*et al.* (1983), The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. Sprawozdanie amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska dotyczące programu Gene-Tox, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, t. 123/1, s. 61–118.
- (12) Mavournin, K.H.*et al.*(1990), The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. Sprawozdanie amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska dotyczące programu Gene-Tox, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, t. 239/1, s. 29–80.
- (13) MacGregor, J.T.*et al.* (1983), Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, *Developments in Toxicology Environmental Science*, t. 11, s. 555–558.
- (14) MacGregor, J.T.*et al.*(1987), Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, t. 189/2, s. 103–112.
- (15) MacGregor, J.T.*et al.*(1990), The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, *Fundamental and Applied Toxicology*, t. 14/3, s. 513–522.
- (16) Hayashi, M. *et al.*(1990), The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, t. 245/4, s. 245–249.
- (17) CSGMT/JEMS.MMS – The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992), Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, t. 278/2–3, s. 83–98.
- (18) CSGMT/JEMS.MMS – The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995), Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), *Mutagenesis*, t. 10/3, s. 153–159.
- (19) Salamone, M.F., K.H.Mavournin (1994), Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 23/4, s. 239–273.
- (20) Krishna, G., G. Urda, J. Paulissen (2000), Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, t. 453/1, s. 45–50.
- (21) Hayes, J. *et al.*(2009), The rat bone marrow micronucleus test – study design and statistical power, *Mutagenesis*, t. 24/5, s. 419–424.
- (22) Wakata, A. *et al.* (1998), Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 32/1, s. 84–100.
- (23) Ryan, T.P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, wyd. II, John Wiley and Sons, Nowy Jork.

- (24) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, t. 723/2, s. 87–90.
- (25) Rothfuss, A. *et al.* (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, t. 723/2, s. 108–120.
- (26) Hayashi, M. *et al.* (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, t. 312/3, s. 293–304.
- (27) Fielder, R.J. *et al.* (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, *Mutagenesis*, t. 7/5, s. 313–319.
- (28) OECD (2000), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation”, Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria OECD dotycząca badań i oceny nr 19, OECD Publishing, Paryż.
- (29) LeBaron, M.J. *et al.* (2013), Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 54/3, s. 222–228.
- (30) Higashikuni, N., S. Sutou (1995), An optimal, generalized sampling time of 30 +/- 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, tom 10/4, s. 313–319.
- (31) Hayashi, M. *et al.* (2000), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 35/3, s. 234–252.
- (32) Asanami, S., K. Shimono (1997), High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, t. 390/1–2, s. 79–83.
- (33) Asanami, S., K. Shimono, S. Kaneda (1998), Transient hypothermia induces micronuclei in mice, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, t. 413/1, s. 7–14.
- (34) Spencer, P.J. *et al.* (2007), Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, *Toxicological Sciences*, t. 97/1, s. 120–127.
- (35) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Research Letters*, t. 120/4, s. 241–247.
- (36) MacGregor, J.T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y, *Mutation Research*, t. 120/4, s. 269–275.
- (37) Romagna, F., C.D. Staniforth (1989), The automated bone marrow micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, t. 213/1, s. 91–104.
- (38) Sun, J.T., M.J. Armstrong, S.M. Galloway (1999), Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure, *Mutation Research*, t. 439/1, s. 121–126.
- (39) Miller, B.M., I.D. Adler (1990), Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*, *Mutagenesis*, t. 5/4, s. 411–415.
- (40) Miller, B.M. *et al.* (1991), Classification of micronucleated murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis*, t. 6/4, s. 297–302.

- (41) Russo, A. (2002), PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage, *American Journal of Medical Genetics*, t. 107/2, s. 99–104.
 - (42) Gollapudi, B.B., L.G. McFadden (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Research*, t. 347/2, s. 97–99.
 - (43) OECD (2014), „Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines”, Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria OECD dotycząca badań i oceny nr 198, OECD Publishing, Paryż.
 - (44) Richold, M. *et al.* (1990), „In Vivo Cytogenetics Assays”, w: Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Sprawozdanie. Część I zmieniona, Kirkland, D.J. (red.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 115–141.
 - (45) Lovell, D.P. *et al.* (1989), „Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays”, w: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (red.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 184–232.
 - (46) Hayashi, M. *et al.* (1994), Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, *Environmental Health Perspectives*, t. 102/suplement 1, s. 49–52.
 - (47) Kim, B.S., M. Cho, H.J. Kim (2000), Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay, *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, t. 469/2, s. 233–241.
-

Dodatek 1

DEFINICJE

Centromer: region(y) chromosomu, w którym(-ch) mikrotubule wrzeciona podziałowego są asocjowane w trakcie podziału komórki, co umożliwia przemieszczenie się chromosomów potomnych do biegunów komórek potomnych.

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

Erytroblast: wczesny etap rozwoju erycyty, bezpośrednio poprzedzający niedojrzały erycyt, na którym komórka nadal posiada jądro komórkowe.

Kinetochor: struktura białkowa tworząca się na centromerze komórek eukariotycznych, która łączy chromosom z polimerami mikrotubul z wrzeciona mitotycznego w trakcie mitozy i mejozy i która podczas podziału komórkowego rozdziela chromatydy siostrzane.

Mikrojądra: małe jądra, oddzielone oraz występujące dodatkowo w stosunku do jądra głównego komórek, wytwarzane w trakcie telofazy mitozy (mejozy) przez fragmenty chromosomów opóźnionych lub całe chromosomy.

Erycyt normochromatyczny lub dojrzały: w pełni dojrzały erycyt, który utracił pozostałość RNA pozostałą po enukleacji lub utracił inne krótkotrwałe markery komórki, które zwykle znikają po enukleacji w wyniku ostatecznego podziału erytroblastu.

Erycyt polichromatyczny lub niedojrzały: nowo powstały erycyt na pośrednim etapie rozwoju, barwiący się zarówno niebieskimi, jak i czerwonymi składnikami klasycznych barwników, takich jak barwnik Giemsa w metodzie Wrighta, ze względu na obecność pozostałości RNA w nowo powstałej komórce. Takie nowo powstałe komórki są niemal identyczne z retikulocytami, które wizualizuje się przy użyciu barwnika przyżyciowego, który powoduje zbijanie się pozostałości RNA w siateczkę. Do identyfikacji nowo powstałych czerwonych krwinek obecnie często wykorzystuje się inne metody, w tym monochromatyczne barwienie RNA za pomocą barwników fluorescencyjnych lub znakowanie krótkotrwałych markerów powierzchniowych takich jak CD71 przy użyciu przeciwciał fluorescencyjnych. Erycyty polichromatyczne, retikulocyty oraz erycyty CD71-pozytywne są erycytami niedojrzałymi, chociaż każda z tych grup ma nieco inny rozkład wieku.

Retikulocyt: nowo powstały erycyt barwiony barwnikiem przyżyciowym, który powoduje zbijanie się pozostałości RNA komórkowego w charakterystyczną siateczkę. Retikulocyty i erycyty polichromatyczne mają podobny rozkład wieku komórkowego.

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

Dodatek 2

**PLAN CZYNNIKOWY MAJĄCY NA CELU USTALENIE RÓŻNIC PŁCIOWYCH W TEŚCIE KOMETOWYM
IN VIVO****Plan czynnikowy i jego analiza**

W ramach takiego planu poddaje się badaniu co najmniej 5 samców i 5 samic przy każdym poziomie stężenia, co oznacza wykorzystanie co najmniej 40 zwierząt (20 samców i 20 samic oraz odpowiednie kontrole dodatnie).

Plan ten, będący jednym z prostszych planów czynnikowych, jest równoważny dwukierunkowej analizie wariancji, w której płęć i poziom stężenia stanowią efekty główne. Dane te można analizować, stosując wiele standardowych pakietów oprogramowania statystycznego, takich jak SPSS, SAS, STATA i Genstat, a także wykorzystując R.

W ramach analizy dokonuje się podziału zmienności w zbiorze danych na zmienność pomiędzy płciami, zmienność pomiędzy stężeniami oraz na zmienność zależną od interakcji pomiędzy płciami i stężeniami. Każdy z członów porównuje się z szacunkową zmiennością pomiędzy zwierzętami z kontrpróby w ramach grup zwierząt tej samej płci, którym podaje się substancję chemiczną w takim samym stężeniu. Szczegółowe informacje na temat metodyki przeprowadzania tego doświadczenia można znaleźć w wielu standardowych podręcznikach statystycznych (zob. bibliografia) oraz w narzędziach pomocowych dostarczanych razem z pakietami oprogramowania statystycznego.

Analizę rozpoczyna się od sprawdzenia członu interakcji płci ze stężeniem w tabeli ANOVA (¹). W przypadku braku członu istotnej interakcji połączone wartości dla poszczególnych płci lub dla poszczególnych poziomów stężeń mogą posłużyć jako ważne testy statystyczne pomiędzy poziomami na podstawie członu zmienności wewnątrzgrupowej w tabeli ANOVA.

Kolejnym etapem analizy jest podział szacunku zmienności pomiędzy stężeniami na kontrasty do celów przeprowadzenia testu reakcji pod kątem kontrastów liniowych i kwadratowych przy poszczególnych poziomach stężeń. W przypadku wystąpienia istotnej interakcji pomiędzy płcią a stężeniem człon ten można również podzielić na kontrasty interakcji pomiędzy efektem liniowym a płcią oraz pomiędzy efektem kwadratowym a płcią. Człon ten umożliwia zbadanie, czy zależność stężenie-odpowiedź przebiega równolegle dla obydwu płci, czy też otrzymuje się różne odpowiedzi dla obu płci.

Szacunek zmienności wewnątrzgrupowej można wykorzystać do przeprowadzenia testów parami w odniesieniu do różnicy między średnimi. Tego rodzaju porównania można przeprowadzać pomiędzy średnimi dla obydwu płci oraz pomiędzy średnimi dla poszczególnych poziomów stężeń, np. w celu porównania z poziomami odnotowanymi w kontrolach ujemnych. W przypadkach, w których występuje istotna interakcja, można dokonać porównań pomiędzy średnimi dla poszczególnych stężeń w ramach danej płci lub pomiędzy średnimi dla poszczególnych płci w ramach danego stężenia.

Bibliografia

Istnieje wiele podręczników statystycznych poświęconych teorii, planowaniu, metodyce, analizie i interpretacji planów czynnikowych – począwszy od najprostszych analiz dwuczynnikowych po bardziej złożone formy wykorzystywane w metodyce planowania doświadczeń. Poniższa lista nie jest wyczerpująca. Niektóre publikacje zawierają praktyczne przykłady porównywalnych planów, niekiedy razem z kodem niezbędnym do przeprowadzenia analiz przy wykorzystaniu różnych pakietów oprogramowania.

Box, G.E.P, Hunter, W.G. i Hunter, J.S. (1978). *Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*. Nowy Jork: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. i Draper, N.R. (1987). *Empirical model-building and response surfaces*. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. i Davey, A.J.H. (2007). *Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences*. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). *The Design of Experiments. Statistical principles for practical application*. Cambridge University Press.

(¹) Statystycy stosujący podejście modelowe, np. ogólne modele liniowe, mogą przeprowadzić analizę w inny, choć porównywalny, sposób, ale niekoniecznie muszą wyprowadzać tradycyjną tabelę ANOVA, która wywodzi się z algorytmicznych podejść do obliczania danych statystycznych opracowanych przed pojawieniem się komputerów.

Montgomery, D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J i Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.”;”;

- 6) w części B skreśla się rozdział B.15;
- 7) w części B skreśla się rozdział B.16;
- 8) w części B skreśla się rozdział B.18;
- 9) w części B skreśla się rozdział B.19;
- 10) w części B skreśla się rozdział B.20;
- 11) w części B skreśla się rozdział B.24;
- 12) w części B rozdział B.47 otrzymuje brzmienie:

„B.47 Metoda badania zmętnienia i przepuszczalności rogówki u bydła do celów identyfikacji (i) substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu oraz (ii) substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania jako substancje drażniące oczy lub powodujące poważne uszkodzenie oczu

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 437 (2013). Metoda badania zmętnienia i przepuszczalności rogówki u bydła (BCOP) została oceniona przez Międzynarodowy Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych (ICCVAM) przy udziale Europejskiego Centrum Uznawania Metod Alternatywnych (ECVAM) i Japońskiego Centrum Uznawania Metod Alternatywnych (JaCVAM) w latach 2006 i 2010 (1)(2). W ramach pierwszej oceny metodę badawczą BCOP oceniono pod kątem użyteczności do celów identyfikowania substancji chemicznych (substancji i mieszanin) powodujących poważne uszkodzenie oczu (1). W ramach drugiej oceny metodę badawczą BCOP oceniono pod kątem użyteczności do celów identyfikowania substancji chemicznych (substancji i mieszanin) niesklasyfikowanych jako powodujące podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu (2). Baza danych służących do walidacji BCOP zawierała łącznie 113 substancji i 100 mieszanin (2) (3). Na podstawie tych ocen oraz ich wzajemnej oceny stwierdzono, że ta metoda badawcza może prawidłowo identyfikować substancje chemiczne (zarówno substancje, jak i mieszaniny) powodujące poważne uszkodzenie oczu (kategoria 1), jak również substancje chemiczne, które nie wymagają zaklasyfikowania jako substancje powodujące podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu, określone przez Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (GHS ONZ) (4) oraz rozporządzenie (WE) nr 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin (CLP) (1), w związku z czym została zatwierdzona jako potwierdzona naukowo do obu celów. Poważne uszkodzenie oczu to uszkodzenie tkanki oka lub poważne fizyczne pogorszenie widzenia spowodowane zaaplikowaniem badanej substancji chemicznej na przednią powierzchnię oka, które nie jest w pełni odwracalne w ciągu 21 dni po zaaplikowaniu. Badane substancje chemiczne powodujące poważne uszkodzenie oczu są zaklasyfikowane do kategorii 1 wg GHS ONZ. Substancje chemiczne niesklasyfikowane jako powodujące podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu, definiuje się jako te substancje, które nie spełniają wymogów zaklasyfikowania jako należące do kategorii 1 lub 2 (2A lub 2B) wg GHS ONZ, tj. określa się je jako nienależące do żadnej kategorii – brak kategorii wg GHS ONZ. Niniejsza metoda badawcza obejmuje zalecane stosowanie i ograniczenia metody badawczej BCOP oparte na jej ocenach. Główne różnice między pierwotną wersją wytycznych OECD dotyczących badań z 2009 r. a zaktualizowaną wersją z 2013 r. odnoszą się m.in. do: stosowania metody badawczej BCOP w celu identyfikowania substancji chemicznych, które nie wymagają sklasyfikowania według GHS ONZ (pkt 2 i 7); wyjaśnień dotyczących stosowania metody badawczej BCOP do badania alkoholi, ketonów i substancji stałych (pkt 6 i 7) oraz substancji i mieszanin (pkt 8); wyjaśnień dotyczących zalecanego sposobu badania środków powierzchniowo czynnych i mieszanin zawierających takie środki (pkt 28); aktualizacji i wyjaśnień dotyczących kontroli dodatniej (pkt 39 i 40); aktualizacji kryteriów podejmowania decyzji w metodzie badawczej BCOP (pkt 47); aktualizacji kryteriów dopuszczalności badania (pkt 48); aktualizacji elementów sprawozdania z badania (pkt 49); aktualizacji dodatku 1 zawierającego definicje; dodania dodatku 2 dotyczącego zdolności predykcyjnej metody badawczej BCOP w różnych systemach klasyfikacji; aktualizacji dodatku 3 zawierającego wykaz substancji chemicznych przeznaczonych do oceny biegłości; oraz aktualizacji dodatku 4 dotyczącego pojemnika na rogówkę w badaniu BCOP (pkt 1) oraz przyrządu do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki (pkt 2 i 3).

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

Obecnie powszechnie uznaje się, że w dającej się przewidzieć przyszłości żaden pojedynczy test działania drażniącego na oko *in vitro* nie będzie w stanie zastąpić testu działania drażniącego na oko *in vivo* wg Draize'a na potrzeby prognozowania pełnego zakresu działania drażniącego różnych klas chemicznych. Strategiczne połączenia kilku alternatywnych metod badawczych w ramach (zintegrowanej) strategii badań mogą jednak być w stanie zastąpić test działania drażniącego na oko wg Draize'a (5). Podejście odgórne (5) ma w założeniu być stosowane wówczas, gdy na podstawie istniejących informacji oczekuje się, że substancja chemiczna będzie miała wysoki potencjał działania drażniącego, podejście oddolne (5) ma być natomiast stosowane wówczas, gdy na podstawie istniejących informacji oczekuje się, że substancja chemiczna nie spowoduje podrażnienia oczu w stopniu wymagającym zaklasyfikowania jej jako substancji drażniącej dla oczu. Metoda badawcza BCOP jest metodą badawczą *in vitro*, którą można stosować w niektórych okolicznościach i przy określonych ograniczeniach do celów klasyfikacji i oznakowania substancji chemicznych pod względem zagrożeń dla oczu. Chociaż uważa się, że metoda badawcza BCOP nie może samodzielnie zastąpić badania na oku królika *in vivo*, jest ona zalecana jako pierwszy etap w strategii badań, takiej jak podejście odgórne zaproponowane przez Scotta *et al.* (5) na potrzeby identyfikacji substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu, tj. substancji chemicznych, które należy zaklasyfikować do kategorii 1 wg GHS ONZ bez dalszych badań (4). Metoda badawcza BCOP jest również zalecana do celów identyfikowania substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania do substancji powodujących podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu zgodnie z GHS ONZ (brak kategorii wg GHS ONZ) (4), w ramach strategii badań takiej jak podejście oddolne (5). Konieczne będzie jednak przeprowadzenie dodatkowego badania (*in vitro* lub *in vivo*) w odniesieniu do substancji chemicznej, w przypadku której nie przewiduje się, żeby powodowała poważne uszkodzenie oczu, ani której nie zaklasyfikowano do substancji powodujących podrażnienie/poważne uszkodzenie oczu w ramach metody badawczej BCOP w celu ustanowienia ostatecznej klasyfikacji.

Niniejsza metoda badawcza ma na celu opisanie procedur stosowanych do oceny potencjalnego działania szkodliwego dla oczu badanej substancji chemicznej, określanego na podstawie potencjału wywoływania przez tę substancję zmętnienia i zwiększonej przepuszczalności w izolowanej rogówce bydłowej. Efekty toksyczne dla rogówki są oceniane na podstawie: (i) zmniejszonej przepuszczalności światła (zmętnienie) oraz (ii) zwiększonej przepuszczalności barwnika na bazie soli sodowej fluoresceiny (przepuszczalność). Oceny zmętnienia i przepuszczalności rogówki w następstwie narażenia rogówki na badaną substancję są łączone w celu wyprowadzenia oceny punktowej działania drażniącego *in vitro*, którą wykorzystuje się do klasyfikowania stopnia działania drażniącego badanej substancji.

Definicje znajdują się w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

Niniejsza metoda badawcza opiera się na protokole metody badawczej BCOP ICCVAM (6)(7), który pierwotnie opracowano na podstawie informacji uzyskanych z instytutu badań *in vitro* (Institute for In Vitro Sciences, IIVS) oraz na protokole 124 INVITTOX (8), który został zastosowany w sponsorowanym przez Wspólnotę Europejską badaniu prewalidacyjnym przeprowadzonym w latach 1997–1998. Podstawą dla obydwu powyższych protokołów była metoda badawcza BCOP, o której po raz pierwszy wspomina Gautheron *et al.* 9).

Metodę badawczą BCOP można wykorzystać do identyfikowania substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu zgodnie z GHS ONZ, tj. substancji chemicznych zaklasyfikowanych do kategorii 1 wg GHS ONZ (4). W przypadku wykorzystywania metody badawczej BCOP do tego celu metoda ta wykazuje ogólną dokładność na poziomie 79 % (150/191), odsetek wyników fałszywie dodatnich na poziomie 25 % (32/126) oraz odsetek wyników fałszywie ujemnych na poziomie 14 % (9/65) w porównaniu do danych uzyskanych w wyniku metody badawczej na oku królika *in vivo*, sklasyfikowanych zgodnie z systemem klasyfikacji GHS ONZ (3) (zob. dodatek 2, tabela 1). W przypadku wykluczenia z bazy danych badanych substancji chemicznych należących do określonych

klas chemicznych (tj. alkohole, ketony) lub fizycznych (tj. substancje stałe) ogólna dokładność metody badawczej BCOP wynosi 85 % (111/131), odsetek wyników fałszywie dodatnich wynosi 20 % (16/81), a odsetek wyników fałszywie ujemnych wynosi 8 % (4/50) zgodnie z systemem klasyfikacji GHS ONZ (3). Potencjalne wady metody badawczej BCOP w przypadku stosowania tej metody do identyfikowania substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu (substancji zaklasyfikowanych do kategorii 1 wg GHS ONZ) opierają się na wysokich odsetkach wyników fałszywie dodatnich w przypadku alkoholi i ketonów oraz na wysokim odsetku wyników fałszywie ujemnych w przypadku substancji stałych, które to wyniki obserwuje się w bazie danych służących do walidacji (1)(2)(3). Ponieważ jednak metoda badawcza BCOP nie prowadzi do zawyżania wyników w odniesieniu do wszystkich alkoholi i ketonów, a niektóre z tych substancji są prawidłowo klasyfikowane na podstawie prognoz jako należące do kategorii 1 wg GHS ONZ, tych dwóch organicznych grup funkcyjnych nie wyklucza się z dziedziny zastosowania tej metody badawczej. To użytkownik niniejszej metody badawczej powinien zdecydować, czy można zaakceptować możliwe zawyżenie wyników dotyczących alkoholu lub ketonu lub czy należy przeprowadzić dalsze badania zgodnie z podejściem opartym na analizie wagi dowodów. Jeżeli chodzi o odsetek wyników fałszywie ujemnych w przypadku substancji stałych, należy zauważyć, że substancje stałe mogą prowadzić do zmiennych i ekstremalnych warunków narażenia w teście działania drażniącego na oko *in vivo* wg Draize'a, co z kolei może skutkować nietrafnymi prognozami ich rzeczywistego potencjału działania drażniącego (10). Należy również zauważyć, że żaden z wyników fałszywie ujemnych wskazanych w bazie danych służących do walidacji ICCVAM (2)(3) w kontekście identyfikacji substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu (kategoria 1 wg GHS ONZ) nie dał oceny punktowej działania drażniącego *in vitro* mniejszej niż 3 lub równej 3, co jest kryterium zidentyfikowania badanej substancji chemicznej jako nienależącej do żadnej kategorii wg GHS ONZ. Ponadto w tym kontekście odsetek wyników fałszywie ujemnych w badaniu BCOP nie ma decydującego znaczenia, ponieważ wszystkie badane substancje chemiczne, w przypadku których ocena punktowa działania drażniącego *in vitro* ma wartość większą niż 3, ale nie większą niż 55, zostaną następnie zbadane za pomocą innych odpowiednio zweryfikowanych badań *in vitro* lub w ostateczności na królikach, w zależności od wymogów regulacyjnych, przy zastosowaniu testów sekwencyjnych zgodnie z podejściem opartym na analizie wagi dowodów. Ze względu na fakt, że niektóre ze stałych substancji chemicznych są prawidłowo klasyfikowane na podstawie prognoz w ramach metody badawczej BCOP jako należące do kategorii 1 wg GHS ONZ, tego stanu skupienia również nie wyklucza się z dziedziny zastosowania niniejszej metody badawczej. Osoby przeprowadzające badanie mogą rozważyć zastosowanie niniejszej metody badawczej w odniesieniu do wszystkich rodzajów substancji chemicznych, wskutek czego ocenę punktową działania drażniącego *in vitro* o wartości powyżej 55 należy zaakceptować jako wskazującą na reakcję wywołującą poważne uszkodzenie oczu, w którym to przypadku należy daną substancję zaklasyfikować do kategorii 1 wg GHS ONZ bez dalszych badań. Jak już wspomniano, wyniki dodatnie uzyskane w przypadku alkoholi lub ketonów należy jednak interpretować z ostrożnością ze względu na potencjalne zawyżenie.

Metodę badawczą BCOP można wykorzystać również do identyfikowania substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania do substancji powodujących podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu według systemu klasyfikacji GHS ONZ (4). W przypadku wykorzystywania metody badawczej BCOP do tego celu metoda ta wykazuje ogólną dokładność na poziomie 69 % (135/196), odsetek wyników fałszywie dodatnich na poziomie 69 % (61/89) oraz odsetek wyników fałszywie ujemnych na poziomie 0 % (0/107) w porównaniu do danych uzyskanych w wyniku metody badawczej na oku królika *in vivo*, sklasyfikowanych zgodnie z systemem klasyfikacji GHS ONZ (3) (zob. dodatek 2, tabela 2). Uzyskany odsetek wyników fałszywie ujemnych (substancji chemicznych nieprzypisanych do żadnej kategorii wg GHS ONZ, które to substancje *in vivo* dają ocenę punktową działania drażniącego *in vitro* o wartości większej niż 3, zob. pkt 47) jest wysoki, ale nie ma decydującego znaczenia w tym kontekście, ponieważ wszystkie badane substancje chemiczne, w przypadku których ocena punktowa działania drażniącego *in vitro* ma wartość większą niż 3, ale mniejszą niż 55 lub równą 55, zostaną następnie zbadane za pomocą innych odpowiednio zweryfikowanych badań *in vitro* lub w ostateczności na królikach, w zależności od wymogów regulacyjnych, przy zastosowaniu testów sekwencyjnych zgodnie z podejściem opartym na analizie wagi dowodów. Metoda badawcza BCOP nie wykazuje żadnych szczególnych wad w kontekście badania alkoholi, ketonów i substancji stałych, w przypadku gdy jej celem jest identyfikacja substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania do substancji powodujących podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu (brak kategorii wg GHS ONZ) (3). Osoby przeprowadzające badanie mogą rozważyć zastosowanie niniejszej metody badawczej w odniesieniu do wszystkich rodzajów substancji chemicznych, wskutek czego wynik ujemny (ocena punktowa działania drażniącego *in vitro* ≤ 3) należy zaakceptować jako wskazujący na brak konieczności zaklasyfikowania danej substancji (brak kategorii GHS ONZ). Ponieważ metoda badawcza BCOP umożliwia prawidłową identyfikację jedynie 31 % substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania do substancji powodujących podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu, niniejszej metody badawczej nie należy wybierać w pierwszej kolejności na potrzeby inicjowania podejścia oddolnego (5), jeżeli dostępne są inne zweryfikowane i zaakceptowane metody *in vitro* o podobnie wysokiej czułości, ale większej swoistości.

Baza danych służących do walidacji BCOP zawierała łącznie 113 substancji i 100 mieszanin (2) (3). Metoda badawcza BCOP uznawana jest zatem za mającą zastosowanie do badania zarówno substancji, jak i mieszanin.

Nie zaleca się stosowania metody badawczej BCOP do identyfikacji badanych substancji chemicznych, które należy uznać za powodujące podrażnienie oczu (kategoria 2 lub 2A wg GHS ONZ), lub badanych substancji chemicznych, które należy uznać za lekko drażniące dla oczu (kategoria 2B wg GHS ONZ), ze względu na zaniżoną klasyfikację znacznej liczby substancji chemicznych należących do kategorii 1 i uznanie ich za należące do kategorii 2, 2A lub 2B wg GHS ONZ oraz ze względu na zawyżoną klasyfikację i uznanie substancji chemicznych nieprzypisanych do żadnej kategorii wg GHS ONZ za substancje z kategorii 2, 2A lub 2B wg GHS ONZ (2) (3). W tym celu konieczne może być przeprowadzenie dodatkowego badania, z wykorzystaniem innej odpowiedniej metody.

Wszystkie procedury przeprowadzane z wykorzystaniem oczu bydłowych i rogówki bydłowej powinny przebiegać zgodnie z przepisami i procedurami dotyczącymi postępowania z materiałem pozyskanym od zwierząt, który obejmuje m.in. tkanki i płyny tkankowe, obowiązującymi w placówce przeprowadzającej badanie. Zaleca się przestrzeżenie ogólnych środków ostrożności dla laboratoriów (11).

Chociaż w metodzie badawczej BCOP nie uwzględnia się uszkodzeń spojówki i tęczęwki, metoda ta odnosi się do oddziaływania na rogówkę, co stanowi główne kryterium klasyfikacji *in vivo*, w przypadku rozważania klasyfikacji GHS ONZ. W metodzie badawczej BCOP nie można ocenić odwracalności zmian w rogówce jako takich. Na podstawie badań oczu królika zaproponowano możliwość zastosowania oceny początkowego stadium uszkodzenia rogówki w celu określenia niektórych rodzajów nieodwracalnych skutków (12). Konieczna jest jednak dodatkowa wiedza naukowa, pozwalająca zrozumieć sposób powstawania nieodwracalnych skutków niezwiązanych z pierwszym wystąpieniem poważnego uszkodzenia. Metoda badawcza BCOP nie pozwala też na ocenę potencjalnej toksyczności ogólnoustrojowej związanej z narażeniem oczu.

Niniejsza metoda badawcza będzie aktualizowana okresowo w miarę uwzględniania nowych informacji i danych. Na przykład histopatologia może być przydatna, gdy potrzebna jest bardziej szczegółowa charakterystyka uszkodzenia rogówki. Jak określono w wytycznych OECD nr 160 (13), zachęca się użytkowników do zachowywania rogówek i przygotowywania wycinków histopatologicznych, które można wykorzystać do opracowania bazy danych i kryteriów podejmowania decyzji w celu dalszego poprawienia dokładności niniejszej metody badawczej.

Każde laboratorium, które zaczyna stosować niniejszą metodę badawczą, powinno stosować substancje chemiczne przeznaczone do oceny biegłości wymienione w dodatku 3. Laboratorium może stosować te substancje chemiczne w celu wykazania swojej biegłości technicznej w zakresie przeprowadzania metody badawczej BCOP przed przedstawieniem danych z metody badawczej BCOP do celów regulacyjnej klasyfikacji zagrożeń.

ZASADA BADANIA

Metoda badawcza BCOP jest modelem organotypowym, który zapewnia krótkotrwałe zachowanie normalnych funkcji fizjologicznych i biochemicznych rogówki bydłowej *in vitro*. Uszkodzenia spowodowane badaną substancją chemiczną ocenia się w ramach niniejszej metody badawczej na podstawie ilościowych pomiarów zmian w zmętnieniu i przepuszczalności rogówki za pomocą odpowiednio przyrządu do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki oraz spektrofotometru światła widzialnego. Obydwa pomiary stosuje się do obliczenia oceny punktowej działania drażniącego *in vitro*, na podstawie której przypisuje się kategorii klasyfikacji zagrożenia podrażnieniem *in vitro* w celu przewidzenia potencjału działania drażniącego badanej substancji chemicznej na oczy *in vivo* (zob. kryteria podejmowania decyzji w pkt 48).

W metodzie badawczej BCOP stosuje się izolowaną rogówkę z oczu bydła pozyskaną bezpośrednio po uboju. Zmętnienie rogówki mierzy się ilościowo jako ilość światła przepuszczanego przez rogówkę. Przepuszczalność mierzy się ilościowo jako ilość barwnika na bazie soli sodowej fluoresceiny, jaka przenika przez całą grubość rogówki i jest wykrywana w środku komory tylnej oka. Badane substancje chemiczne aplikuje się na nabłonek rogówki poprzez dodanie ich do komory przedniej pojemnika na rogówkę. Dodatek 4 zawiera opis i rysunek pojemnika na rogówkę stosowanego w metodzie badawczej BCOP. Pojemniki na rogówkę można nabyć z różnych źródeł komercyjnych lub sporządzić samodzielnie.

Pochodzenie i wiek oczu bydłych oraz wybór gatunku zwierząt

Bydło wysyłane do rzeźni jest zazwyczaj poddawane ubojowi albo dla celów spożycia przez ludzi, albo dla innych celów komercyjnych. Rogówki stosowane w metodzie badawczej BCOP pochodzą wyłącznie od zdrowych zwierząt, które uznano za odpowiednie do wprowadzenia do łańcucha żywnościowego człowieka. W związku z tym, że masa bydła jest znacznie zróżnicowana w zależności od rasy, wieku i płci, nie ma zalecanej masy zwierzęcia podczas uboju.

Różnice w wymiarach rogówki mogą pojawić się w przypadku gdy stosuje się oczy pochodzące od zwierząt w różnym wieku. Rogówki o średnicy poziomej $> 30,5$ mm i grubości środkowej części wynoszącej $\geq 1\ 100$ μm uzyskuje się zazwyczaj od bydła w wieku powyżej ośmiu lat, natomiast rogówki o średnicy poziomej $< 28,5$ mm i grubości środkowej części wynoszącej < 900 μm uzyskuje się zazwyczaj od bydła w wieku poniżej pięciu lat (14). W związku z powyższym zazwyczaj nie stosuje się oczu pochodzących od bydła w wieku powyżej 60 miesięcy. Zasadniczo nie stosuje się oczu pochodzących od bydła w wieku poniżej 12 miesięcy, ponieważ są one jeszcze w fazie rozwoju, przez co grubość i średnica rogówki są znacznie mniejsze niż w przypadku oczu dorosłego bydła. Stosowanie rogówek pochodzących od młodych zwierząt (tj. w wieku 6–12 miesięcy) jest jednak dozwolone, ponieważ wiążą się z tym pewne korzyści, na przykład: większa dostępność, wąski przedział wiekowy oraz mniejsze zagrożenie związane z potencjalnym narażeniem pracowników na gąbczastą encefalopatię bydła (15). Ze względu na to, że przydatne byłoby przeprowadzenie dalszej oceny wpływu rozmiaru lub grubości rogówki na stopień reakcji na substancje chemiczne żrące i drażniące, zachęca się użytkowników do zgłaszania szacowanego wieku lub szacowanej masy zwierząt, od których pobrano rogówki stosowane w badaniu.

Pobieranie oczu i ich transport do laboratorium

Oczy pobierają pracownicy rzeźni. Aby zminimalizować uszkodzenia mechaniczne i inne rodzaje uszkodzeń oczu, enukleację oczu należy przeprowadzać jak najszybciej po śmierci zwierzęcia, po czym oczy należy natychmiast schłodzić i utrzymywać w chłodzie podczas transportu. Aby zapobiec narażeniu oczu na potencjalnie drażniące substancje chemiczne, podczas opłukiwania głowy zwierzęcia pracownicy rzeźni nie powinni używać detergentów.

Oczy należy w całości zanurzyć w schłodzonym zbuforowanym roztworze soli Hanksa w pojemniku o odpowiednich rozmiarach i przetransportować do laboratorium w taki sposób, żeby zminimalizować możliwość pogorszenia stanu oczu lub skażenia bakteriami. Ponieważ oczy pobiera się w trakcie procesu uboju, mogą one być narażone na kontakt z krwią i innym materiałem biologicznym, w tym z bakteriami i innymi mikroorganizmami. Ważne jest zatem, aby zminimalizować ryzyko skażenia (np. umieszczając pojemnik zawierający oczy w lodzie podczas pobierania i transportowania oraz dodając antybiotyki do zbuforowanego roztworu soli Hanksa używanego do przechowywania oczu podczas transportu [np. penicyliny w ilości 100 j.m./ml i streptomycyny w ilości 100 $\mu\text{g/ml}$]).

Należy zminimalizować odstęp czasu między pobraniem oczu a użyciem rogówek w metodzie badawczej BCOP (zazwyczaj pobranie i użycie następuje tego samego dnia) oraz wykazać, że nie wpłynie on negatywnie na wyniki badania. Wyniki badania opierają się na kryteriach doboru oczu, jak również na reakcjach w ramach kontroli dodatniej i ujemnej. Wszystkie oczy wykorzystane w badaniu powinny pochodzić z tej samej grupy oczu pobranych danego dnia.

Kryteria doboru oczu wykorzystywanych w metodzie badawczej BCOP

Po dostarczeniu do laboratorium oczy są dokładnie badane pod kątem wad, m.in. zwiększonego zmętnienia, zadrapań i tworzenia nowych naczyń. Wyłącznie rogówki pochodzące z oczu niewykazujących takich wad mogą zostać wykorzystane w badaniu.

Jakość każdej rogówki jest również oceniana na późniejszych etapach badania. Należy odrzucić te rogówki, których zmętnienie po wstępnym, jednogodzinnym okresie wyrównania stężeń przekracza siedem jednostek zmętnienia lub równoważną wartość przy badaniu przyrządem do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki, oraz użyte pojemniki na rogówkę (UWAGA: przyrząd do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki należy poddać wzorcowaniu według norm zmętnienia, które stosuje się do ustalania jednostek zmętnienia, zob. dodatek 4).

Każda grupa badana (otrzymująca badaną substancję chemiczną, stanowiąca jednoczesną kontrolę dodatnią i jednoczesną kontrolę ujemną) składa się z co najmniej trzech gałek ocznych. Trzy rogówki należy wykorzystać do kontroli ujemnej w metodzie badawczej BCOP. Ponieważ wszystkie rogówki są wycinane z całej gałki ocznej i umieszczane w komorach do przechowywania rogówki, istnieje możliwość powstania artefaktów wynikających z obróbki w odniesieniu do wartości zmętnienia i przepuszczalności poszczególnych rogówek (włączając kontrolę ujemną). Ponadto wartości zmętnienia i przepuszczalności uzyskane z rogówek służących do kontroli ujemnej są stosowane w celu skorygowania wartości zmętnienia i przepuszczalności rogówki uzyskanych w wyniku działania badanej substancji chemicznej i kontroli dodatniej w obliczeniach oceny punktowej działania drażniącego *in vitro*.

PROCEDURA

Przygotowanie oczu

Rogówki niewykazujące nieprawidłowości wycina się wraz z obwódką twardówki o szerokości 2–3 mm w celu ułatwienia dalszej obróbki, przy czym dokłada się starań, by uniknąć uszkodzenia nabłonka i śródbłonka rogówki. Izolowane rogówki umieszcza się w specjalnie zaprojektowanych pojemnikach na rogówkę, składających się z komory przedniej i tylnej, które stykają się odpowiednio z nabłonkiem i śródbłonkiem rogówki. Obydwie komory są maksymalnie wypełniane wcześniej podgrzanym podłożem Eagle'a bez czerwieni fenolowej (najpierw komora tylna), przy czym należy zapewnić, aby nie utworzyły się żadne pęcherzyki powietrza. Następnie urządzenie utrzymuje się w temperaturze 32 ± 1 °C przez co najmniej godzinę w celu zrównoważenia rogówek w pożywce i uzyskania ich normalnej aktywności metabolicznej w zakresie, w jakim jest to możliwe (temperatura na powierzchni rogówki *in vivo* wynosi w przybliżeniu 32 °C).

Po okresie wyrównania stężeń do obydwu komór dodaje się świeże, wcześniej podgrzane podłoże Eagle'a bez czerwieni fenolowej oraz pobiera się wyjściowe odczyty zmętnienia dla każdej rogówki. Odrzuca się każdą rogówkę, która wykazuje makroskopowe uszkodzenia tkanki (np. zadrapania, przebarwienia, tworzenie nowych naczyń) lub zmętnienie przekraczające siedem jednostek zmętnienia lub równoważną wartość przy badaniu przyrządem do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki, oraz użyte pojemniki na rogówkę. Co najmniej trzy rogówki wybiera się jako rogówki do kontroli ujemnej (lub kontroli z rozpuszczalnikiem). Pozostałe rogówki trafiają następnie do grupy poddawanej działaniu badanej substancji i do grupy kontrolnej dodatniej.

Ze względu na to, że pojemność cieplna wody jest wyższa od pojemności cieplnej powietrza, woda zapewnia stabilniejsze warunki temperatury dla inkubacji. Zaleca się zatem stosowanie kąpeli wodnej w celu utrzymania pojemnika na rogówkę i jego zawartości w temperaturze 32 ± 1 °C. Można jednak również zastosować inkubatory powietrzne, pod warunkiem że podejmie się środki ostrożności w celu utrzymania stabilnej temperatury (np. poprzez wcześniejsze podgrzewanie pojemników i pożywek).

Podawanie badanej substancji chemicznej

Stosuje się dwa różne protokoły poddawania działaniu substancji – jeden dla cieczy i środków powierzchniowo czynnych (stałych lub ciekłych), a drugi dla substancji stałych niebędących środkami powierzchniowo czynnymi.

Ciecze bada się w stanie nierozcieńczonym. Ciała półstałe, kremy i woski są zazwyczaj badane tak jak ciecze. Czyste środki powierzchniowo czynne bada się w stężeniu 10 % w/v w roztworze chlorku sodu o stężeniu 0,9 %, w wodzie destylowanej lub innym rozpuszczalniku, w odniesieniu do którego wykazano, że nie wpływa negatywnie na układ badawczy. Zastosowanie innych stężeń należy odpowiednio uzasadnić. Mieszanki zawierające środki powierzchniowo czynne mogą być badane w stanie nierozcieńczonym lub po rozcieńczeniu do odpowiedniego stężenia – w zależności od stosownego scenariusza narażenia *in vivo*. Zastosowanie badanych stężeń należy odpowiednio uzasadnić. Narażenie rogówek na działanie cieczy i środków powierzchniowo czynnych trwa 10 minut. Zastosowanie innego czasu narażenia wymaga odpowiedniego uzasadnienia naukowego. Zob. definicja środka powierzchniowo czynnego i mieszaniny zawierającej środek powierzchniowo czynny podana w dodatku 1.

Substancje stałe niebędące środkami powierzchniowo czynnymi bada się zazwyczaj jako roztwory lub zawiesiny w stężeniu 20 % w/v w roztworze chlorku sodu o stężeniu 0,9 %, w wodzie destylowanej lub innym rozpuszczalniku, w odniesieniu do którego wykazano, że nie wpływa negatywnie na układ badawczy. W niektórych okolicznościach i po przedstawieniu odpowiedniego uzasadnienia naukowego substancje stałe również można badać w postaci czystej poprzez bezpośrednią aplikację na powierzchnię rogówki z zastosowaniem metody „otwartej komory” (zob. pkt 32). Narażenie rogówek na działanie substancji stałych trwa cztery godziny, ale podobnie jak w przypadku cieczy i środków powierzchniowo czynnych możliwe jest zastosowanie innego czasu narażenia pod warunkiem przedstawienia odpowiedniego uzasadnienia naukowego.

Można zastosować różne metody podawania badanej substancji chemicznej w zależności od jej stanu skupienia i właściwości chemicznych (np. od tego, czy jest ona substancją stałą, cieczą, cieczą lepłą czy cieczą nielepłą). Decydujące znaczenie ma dopilnowanie, aby nabłonek został pokryty badaną substancją chemiczną w odpowiedni sposób oraz aby odpowiednio ją usunięto w trakcie płukania. Metodę „zamkniętej komory” stosuje się zwykle w przypadku badanych substancji chemicznych będących cieczami nielepkimi i cieczami lekko lepkiemi, natomiast metodę „otwartej komory” stosuje się zwykle w przypadku badanych substancji chemicznych będących cieczami częściowo lepkiemi i lepkiemi oraz czystymi substancjami stałymi.

W przypadku metody „zamkniętej komory” badaną substancję chemiczną w ilości wystarczającej (750 µl) do pokrycia nabłonka rogówki wprowadza się do komory przedniej przez otwory do dawkowania znajdujące się w górnej części komory, które następnie w trakcie narażenia uszczelnia się specjalnymi zatyczkami. Należy zapewnić odpowiedni czas narażenia każdej rogówki na działanie badanej substancji chemicznej.

W przypadku metody „otwartej komory” przed rozpoczęciem badania z komory przedniej usuwa się pierścień zabezpieczający okienko i szklane okienko. Kontrolna lub badana substancja chemiczna (w ilości 750 µl lub w ilości wystarczającej do całkowitego pokrycia rogówki) jest aplikowana bezpośrednio na nabłonek rogówki za pomocą mikropipety. Jeżeli trudno jest zaaplikować badaną substancję chemiczną za pomocą pipety, można tę substancję wprowadzić pod ciśnieniem do pipety wporowej, aby ułatwić dawkowanie. Końcówkę pipety wporowej umieszcza się w końcówce dawkującej strzykawki w celu wprowadzenia substancji do końcówki pipety wporowej pod ciśnieniem. W miarę naciskania tłoka strzykawki tłok pipety podnosi się. Jeżeli w końcówce pipety pojawiają się pęcherzyki powietrza, usuwa się badaną substancję chemiczną i proces jest powtarzany, dopóki końcówka nie zostanie napełniona bez pęcherzyków powietrza. W razie potrzeby można zastosować normalną strzykawkę (bez igły), ponieważ umożliwi ona dokładne zmierzenie ilości badanej substancji chemicznej oraz ułatwi jej aplikację na nabłonek rogówki. Po podaniu substancji szklane okienko z powrotem umieszcza się w komorze przedniej, aby przywrócić układ zamknięty.

Inkubacja po zakończeniu narażenia

Po okresie narażenia usuwa się badaną substancję chemiczną, substancję służącą do kontroli ujemnej lub substancję służącą do kontroli dodatniej z komory przedniej, zaś nabłonek przedni przemywa się co najmniej trzykrotnie (lub dopóki nie znikną wszystkie widoczne ślady badanej substancji chemicznej) przy użyciu podłoża Eagle'a (zawierającego czerwień fenolową). Do spłukiwania stosuje się pożywkę zawierającą czerwień fenolową, ponieważ na podstawie zmiany barwy czerwieni fenolowej można określić skuteczność spłukiwania badanych substancji kwasowych lub zasadowych. Rogówki przemywa się więcej niż trzy razy, jeżeli czerwień fenolowa ma w dalszym ciągu zmienioną barwę (żółtą lub fioletową) lub jeśli badana substancja chemiczna jest w dalszym ciągu widoczna. Po oczyszczeniu pożywki z badanej substancji chemicznej rogówki opłukuje się po raz ostatni podłożem Eagle'a (bez czerwieni fenolowej). Podłoże Eagle'a (bez czerwieni fenolowej) jest używane do ostatniego opłukania, aby zapewnić usunięcie czerwieni fenolowej z przedniej komory oka przed rozpoczęciem pomiaru zmętnienia. Następnie ponownie wypełnia się komorę przednią świeżym podłożem Eagle'a bez czerwieni fenolowej.

W przypadku cieczy lub środków powierzchniowo czynnych rogówki są inkubowane przez kolejne dwie godziny w temperaturze 32 ± 1 °C. W niektórych sytuacjach przydatne może być zastosowanie dłuższego czasu po narażeniu; należy to rozważyć indywidualnie w każdym przypadku. Rogówki wystawione na działanie substancji stałych poddaje się dokładnemu płukaniu po zakończeniu czterogodzinnego narażenia, ale nie wymagają one dodatkowej inkubacji.

Pod koniec okresu dodatkowej inkubacji w przypadku cieczy i środków powierzchniowo czynnych oraz pod koniec czterogodzinnego narażenia w przypadku substancji stałych niebędących środkami powierzchniowo czynnymi dokonuje się pomiaru zmętnienia i przepuszczalności każdej rogówki. Każdą rogówkę obserwuje się również wzrokowo i zapisuje się istotne obserwacje (np. łuszczenie się tkanki, pozostałości badanej substancji chemicznej, niejednolite zmętnienie). Powyższe obserwacje mogą mieć istotne znaczenie, ponieważ mogą znaleźć odzwierciedlenie w zmienności odczytów przyrządu do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki.

Kontrolne substancje chemiczne

Każde doświadczenie obejmuje jednoczesną kontrolę ujemną lub kontrolę z rozpuszczalnikiem/nośnikiem i kontrolę dodatnią.

W przypadku badania substancji ciekłej o stężeniu 100 % w metodzie badawczej BCOP uwzględnia się jednoczesną kontrolę ujemną (np. roztwór chlorku sodu o stężeniu 0,9 % lub woda destylowana) w celu wykrycia niespecyficznego zmian w układzie badawczym i zapewnienia punktu odniesienia dla punktów końcowych badania. Dzięki uwzględnieniu kontroli ujemnej warunki badania nie powodują nieprawidłowej reakcji w postaci działania drażniącego.

W przypadku badania cieczy rozcieńczonej, środka powierzchniowo czynnego lub substancji stałej w metodzie badawczej BCOP uwzględnia się jednoczesną grupę kontrolną z rozpuszczalnikiem/nośnikiem w celu wykrycia niespecyficznego zmian w układzie badawczym i zapewnienia punktu odniesienia dla punktów końcowych badania. Stosować można jedynie rozpuszczalnik/nośnik, w odniesieniu do którego wykazano, że nie wpływa negatywnie na układ badawczy.

W każdym doświadczeniu uwzględnia się substancję chemiczną, o której wiadomo, że wywołuje reakcję dodatnią, jako jednoczesną kontrolę dodatnią w celu zweryfikowania integralności układu badawczego i prawidłowości jego działania. Aby zapewnić jednak możliwość oceny zmienności reakcji w kontroli dodatniej w czasie, siła reakcji w postaci działania drażniącego nie powinna być nadmierna.

Przykładowymi substancjami służącymi do kontroli dodatniej dla badanych substancji chemicznych w stanie ciekłym są etanol w stężeniu 100 % lub dimetyloformamid w stężeniu 100 %. Przykładem substancji służących do kontroli dodatniej dla badanych substancji chemicznych w stanie stałym jest imidazol o stężeniu 20 % w/v w roztworze chlorku sodu o stężeniu 0,9 %.

Wzorcowe substancje chemiczne są przydatne do oceny potencjalnego działania drażniącego na oczy nieznanymi substancjami chemicznymi z określonej klasy chemicznej lub produktowej lub do oceny względnego potencjalnego działania drażniącego substancji drażniącej dla oczu w określonym zakresie reakcji w postaci działania drażniącego.

Pomiar punktów końcowych

Zmętnienie określa się na podstawie ilości światła przepuszczanego przez rogówkę. Zmętnienie rogówki mierzy się ilościowo za pomocą przyrządu do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki, w wyniku czego otrzymuje się wartości zmętnienia mierzone na skali ciągłej.

Przepuszczalność określa się na podstawie ilości barwnika na bazie soli sodowej fluoresceiny, jaka przenika przez wszystkie warstwy rogówki (tj. przez nabłonek na zewnętrznej powierzchni rogówki po śródbłonek na wewnętrznej powierzchni rogówki). Do przedniej komory pojemnika na rogówkę, która styka się z nabłonkiem rogówki, dodaje się roztwór 1 ml soli sodowej fluoresceiny (odpowiednio 4 lub 5 mg/ml w przypadku badania cieczy i środków powierzchniowo czynnych lub substancji stałych niebędących środkami powierzchniowo czynnymi), natomiast tylną komorę oka, która styka się ze śródbłonkiem rogówki, wypełnia się świeżym podłożem Eagle'a. Następnie pojemnik inkubuje się w pozycji poziomej przez 90 ± 5 min w temperaturze 32 ± 1 °C. Ilość soli sodowej fluoresceiny, jaka przedostaje się do tylnej komory, jest mierzona ilościowo za pomocą spektrofotometrii UV/VIS. Pomiar spektrofotometryczny przy długości fali 490 nm rejestruje się jako wartości gęstości optycznej (OD_{490}) lub absorbancji mierzone na skali ciągłej. Wartości przepuszczalności fluoresceiny określa się przy użyciu wartości OD_{490} otrzymanych w wyniku zastosowania spektrofotometru światła widzialnego, w którym stosuje się standardową 1-centymetrową drogę optyczną.

Można ewentualnie zastosować czytnik płytek 96-dołkowych, pod warunkiem że: (i) można ustalić zakres liniowy czytnika płytek w celu określenia wartości OD_{490} fluoresceiny oraz (ii) odpowiednia liczba próbek fluoresceiny zostanie użyta w płytce 96-dołkowej, aby otrzymać wartości OD_{490} równoważne standardowej 1-centymetrowej drodze optycznej (konieczne może być całkowite wypełnienie dołków [zwykle 360µl]).

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Ocena danych

Po skorygowaniu wartości zmętnienia i średniej przepuszczalności (OD_{490}) względem wartości zmętnienia i ujemnej kontroli wartości przepuszczalności OD_{490} , średnie wartości zmętnienia i przepuszczalności OD_{490} dla każdej badanej grupy należy połączyć w wyprowadzony empirycznie wzór w celu obliczenia oceny punktowej działania drażniącego *in vitro* (IVIS) w odniesieniu do każdej grupy badanej w następujący sposób:

$$IVIS = \text{średnia wartość zmętnienia} + (15 \times \text{średnia wartość przepuszczalności } OD_{490})$$

Sina *et al.* (16) podaje, że powyższy wzór wyprowadzono w trakcie badań wewnętrznych i międzylaboratoryjnych. Dane otrzymane dla serii 36 związków w badaniu międzylaboratoryjnym poddano analizie wielowymiarowej w celu wyznaczenia równania, które najlepiej opisuje zależność między danymi *in vivo* a danymi *in vitro*. Analizę przeprowadzili naukowcy w dwóch odrębnych przedsięwzięciach i wyprowadzili niemalże identyczne równania.

Wartości zmętnienia i przepuszczalności również należy oceniać niezależnie, aby stwierdzić, czy badana substancja chemiczna wywoływała działanie żrące lub silnie drażniące wyłącznie w jednym z dwóch punktów końcowych (zob. kryteria podejmowania decyzji).

Kryteria podejmowania decyzji

Wartości graniczne oceny punktowej działania drażniącego *in vitro* (IVIS) służące do identyfikowania badanych substancji chemicznych jako powodujące poważne uszkodzenie oczu (kategoria 1 wg GHS ONZ) oraz badanych substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania do substancji powodujących podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu (brak kategorii wg GHS ONZ), podano poniżej:

IVIS	GHS ONZ
≤3	Brak kategorii
>3; ≤55	Nie można przewidzieć działania
>55	Kategoria 1

Kryteria dopuszczalności badania

Badanie uznaje się za dopuszczalne, jeżeli kontrola dodatnia daje wskaźnik IVIS mieszczący się w ramach dwóch odchyłeń standardowych od obecnej historycznej średniej, którą należy aktualizować co najmniej co trzy miesiące lub za każdym razem, gdy dopuszczalne badanie przeprowadza się w laboratoriach, w których rzadko przeprowadza się badania (tj. rzadziej niż raz na miesiąc). Wartości zmętnienia i przepuszczalności otrzymane w wyniku reakcji otrzymanych w kontroli ujemnej lub kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem powinny być niższe do ustalonych górnych limitów wartości zmętnienia i przepuszczalności tła dla rogówek bydłowych poddanych odpowiedniej kontroli ujemnej lub kontroli z rozpuszczalnikiem/nośnikiem. Pojedyncza seria badań, w skład której wchodzi co najmniej trzy rogówki, powinna wystarczyć dla badanej substancji chemicznej, jeśli otrzymana klasyfikacja jest jednoznaczna. W przypadku wyników granicznych otrzymanych podczas pierwszej serii badań należy jednak rozważyć przeprowadzenie drugiej serii badań (nie jest to konieczne) oraz trzeciej w przypadku niezgodnych średnich wyników IVIS między pierwszymi dwiema seriami badań. W związku z tym wynik pierwszej serii badań uznaje się za wynik graniczny, jeżeli prognozy dotyczące trzech rogówek były niezgodne, tj.:

- dwie z trzech rogówek dały niezgodne prognozy odbiegające od średniej dla wszystkich trzech rogówek ALBO
- jedna z trzech rogówek dała niezgodną prognozę odbiegającą od średniej dla wszystkich trzech rogówek ORAZ niezgodny wynik był większy o 10 jednostek IVIS od progno granicznego wynoszącego 55;
- jeżeli powtórzona seria badań potwierdzi prognozy serii badań wstępnych (na podstawie średniej wartości wskaźnika IVIS), wówczas można podjąć ostateczną decyzję bez dalszych badań. Jeżeli powtórzona seria badań będzie skutkowałą prognozą niezgodną z serią badań wstępnych (na podstawie średniej wartości wskaźnika IVIS), wówczas należy przeprowadzić trzecią i ostatnią serię badań w celu przeanalizowania niejednoznacznych prognoz oraz zaklasyfikowania badanej substancji chemicznej. Dopuszczalne może być odstąpienie od dalszych badań na potrzeby klasyfikacji i oznakowania, w przypadku gdy każda seria badań prowadzi do prognozy dotyczącej zaliczenia do kategorii 1 wg GHS ONZ.

Sprawozdanie z badania

Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje, o ile są one istotne dla przebiegu badania:

Badane i kontrolne substancje chemiczne

- nazwa chemiczna (nazwy chemiczne), np. nazwa strukturalna używana przez Chemical Abstracts Service (CAS), po której następują inne nazwy, jeżeli są znane; numer CAS, jeżeli jest znany;

- czystość i skład badanej substancji chemicznej lub kontrolnej substancji chemicznej (jako wartość procentowa masy), w zakresie, w jakim te informacje są dostępne;
- właściwości fizykochemiczne istotne dla przebiegu badania, np. stan skupienia, lotność, pH, stabilność, klasa chemiczna, rozpuszczalność w wodzie;
- postępowanie z badanymi/kontrolnymi substancjami chemicznymi przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);
- stabilność, jeżeli jest znana.

Informacje dotyczące sponsora i placówki przeprowadzającej badanie

- nazwa i adres sponsora i placówki przeprowadzającej badanie oraz dane kierownika badań.

Warunki metody badawczej

- opis stosowanego przyrządu do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki (np. model i specyfikacja) oraz ustawień urządzenia;
- informacje na temat wzorcowania urządzeń zastosowanych do pomiaru zmętnienia i przepuszczalności (np. przyrząd do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki i spektrofotometr) w celu zapewnienia liniowości pomiarów;
- rodzaj zastosowanego pojemnika na rogówkę (np. model i specyfikacja);
- opis innych wykorzystanych urządzeń;
- procedura zastosowana w celu zapewnienia integralności (tj. dokładności i wiarygodności) metody badawczej w czasie (np. okresowe badanie substancji chemicznych przeznaczonych do oceny biegłości).

Kryteria dotyczące badania dopuszczalnego

- dopuszczalne zakresy jednoczesnej kontroli dodatniej i ujemnej na podstawie danych historycznych;
- w stosownych przypadkach dopuszczalny zakres jednoczesnej kontroli odniesienia na podstawie danych historycznych.

Pobieranie oczu i ich przygotowywanie

- identyfikacja źródła oczu (tj. zakład, z którego je pobrano);
- średnica rogówki jako miernik wieku zwierzęcia źródłowego i przydatności do analizy;
- warunki przechowywania i transportu oczu (np. data i czas pobrania oczu, odstęp czasu między pobraniem oczu a rozpoczęciem badania, środek transportu i temperatura, wszelkie podane antybiotyki);
- przygotowanie i umieszczenie rogówek bydła, w tym oświadczenia dotyczące ich jakości, temperatury pojemników na rogówkę oraz kryteria dotyczące wyboru rogówek do badania.

Procedura badawcza

- liczba użytych kontrprób;
- nazwa wykorzystanej kontroli ujemnej i dodatniej (w stosownych przypadkach, także kontrole z zastosowaniem rozpuszczalnika i kontrole odniesienia);
- stężenie badanej substancji chemicznej, zastosowanie, czas narażenia i czas inkubacji po narażeniu na działanie substancji;
- opis zastosowanych kryteriów oceny i podejmowania decyzji;
- opis zastosowanych kryteriów dopuszczalności badania;
- opis wszelkich modyfikacji procedury badawczej;
- opis zastosowanych kryteriów podejmowania decyzji.

Wyniki

- Tabelaiczne zestawienie danych dotyczących pojedynczych badanych próbek (np. wartości zmętnienia i OD490 oraz obliczony wskaźnik IVIS dla badanej substancji chemicznej oraz kontroli dodatniej, ujemnej i odniesienia [jeżeli została uwzględniona], przedstawione w postaci tabeli, w stosownych przypadkach z uwzględnieniem danych z powtórzeń doświadczenia z kontrpróbą oraz średnich \pm odchylenie standardowe dla każdego doświadczenia);
- opis innych zaobserwowanych skutków;
- otrzymana klasyfikacja GHS ONZ *in vitro*, w stosownych przypadkach.

Omówienie wyników

Wnioszek

BIBLIOGRAFIA

- (1) ICCVAM (2006). Test Method Evaluation Report – *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych (ICCVAM) oraz Amerykański Krajowy Program Toksykologiczny (NTP) Międzyagencyjnego Centrum Oceny Alternatywnych Metod Toksykologicznych (NICEATM). Publikacja NIH nr: 07-4517. Dostępne na stronie internetowej: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.
- (2) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Publikacja NIH nr 10-7553. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Dostępne na stronie internetowej: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>.
- (3) OECD (2013). Streamlined Summary Document supporting the Test Guideline 437 for eye irritation/corrosion. Seria OECD dotycząca badań i oceny nr 189, OECD, Paryż.
- (4) ONZ (2011). Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS) ONZ, ST/SG/AC.10/30 Rev 4, Nowy Jork i Genewa: Organizacja Narodów Zjednoczonych. Dostępne na stronie internetowej: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html.
- (5) 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. i 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.
- (6) ICCVAM (2006). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. W: ICCVAM Test Method Evaluation Report – *in vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych (ICCVAM) oraz Amerykański Krajowy Program Toksykologiczny (NTP) Międzyagencyjnego Centrum Oceny Alternatywnych Metod Toksykologicznych (NICEATM). Publikacja NIH nr: 07-4517. Dostępne na stronie internetowej: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.
- (7) ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. W: ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych (ICCVAM) oraz Amerykański Krajowy Program Toksykologiczny (NTP) Międzyagencyjnego Centrum Oceny Alternatywnych Metod Toksykologicznych (NICEATM). Publikacja NIH nr: 10-7553A. Dostępne na stronie internetowej: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>.
- (8) INVITOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Włochy: Europejskie Centrum Uznawania Metod Alternatywnych (ECVAM).
- (9) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. i Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442–449.

- (10) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicol. in Vitro* 20:78–81.
- (11) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L. i Komitet Doradczy ds. Praktyk w zakresie Kontroli Zakażeń w Opiece Zdrowotnej (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Dostępne na stronie internetowej: [<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf>].
- (12) Maurer, J.K., Parker, R.D. i 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.
- (13) OECD (2011). Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants. Seria dotycząca badań i oceny nr 160. Przyjęto w dniu 25 października 2011 r. Paryż: Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju.
- (14) Doughty, M.J., Petrou, S. i Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159–2165.
- (15) Collee, J. i Bradley, R. (1997). BSE: A decade on – Part I. *The Lancet* 349: 636–641.
- (16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D. i Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam. Appl. Toxicol.* 26:20–31.
- (17) Rozdział B.5 niniejszego załącznika, Działanie żrące / silnie drażniące na oczy.
- (18) ICCVAM (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. Publikacja NIH nr: 06-4512. Research Triangle Park: Amerykański Krajowy Program Toksykologiczny. Dostępne na stronie internetowej: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].
- (19) OECD (1998). Seria dotycząca zasad dobrej praktyki laboratoryjnej i monitorowania zgodności. Nr 1: OECD Principles on Good Laboratory Practice (revised in 1997).

Dostępne na stronie: http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html

Dodatek 1

DEFINICJE

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

Wzorcowa substancja chemiczna: substancja chemiczna używana jako wzorec do porównań z badaną substancją chemiczną. Wzorcowa substancja chemiczna powinna mieć następujące cechy: (i) stałe i wiarygodne źródło(-a); (ii) podobieństwo strukturalne i funkcjonalne do badanej klasy substancji chemicznych; (iii) znane właściwości fizyczne i chemiczne; (iv) dane potwierdzające występowanie znanych skutków oraz (v) znany potencjał w zakresie pożądaných reakcji.

Podejście oddolne: stopniowe podejście stosowane w odniesieniu do substancji chemicznej, w przypadku której podejrzewa się, że nie wymaga zaklasyfikowania jako substancja powodująca podrażnienie lub poważne uszkodzenie oka; takie podejście polega na odróżnieniu substancji chemicznych niewymagających zaklasyfikowania (wynik ujemny) od pozostałych substancji chemicznych (wynik dodatni).

Substancja chemiczna: substancja albo mieszanina.

Rogówka: przezroczysta warstwa w przedniej części gałki ocznej, która okrywa tęczówkę i źrenicę oraz wpuszcza światło do wnętrza oka.

Zmętnienie rogówki: pomiar stopnia zmętnienia rogówki wskutek narażenia na badaną substancję chemiczną. Zwiększone zmętnienie rogówki wskazuje na jej uszkodzenie. Zmętnienie można ocenić subiektywnie, jak w przypadku testu Draize'a wykonywanego na oku królika, lub obiektywnie przy użyciu odpowiedniego narzędzia np. „przyrządu do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki”.

Przepuszczalność rogówki: ilościowy pomiar szkody wyrządzonej w nabłonku rogówki poprzez określenie, jaka ilość barwnika na bazie soli sodowej fluoresceiny przenika przez wszystkie warstwy rogówki.

Podrażnienie oka: zmiany w oku spowodowane zaaplikowaniem badanej substancji chemicznej na wierzchnią warstwę oka, które są w pełni odwracalne w ciągu 21 dni po zaaplikowaniu. Określenie używane zamiennie z określeniem „odwracalne skutki działania na oczy” oraz ze sformułowaniem „kategoria 2 GHS ONZ” (4).

Odsetek wyników fałszywie ujemnych: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik dodatni fałszywie zidentyfikowanych po zastosowaniu metody badawczej jako dające wynik ujemny. Jest to jeden ze wskaźników efektywności metody badawczej.

Odsetek wyników fałszywie dodatnich: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik ujemny fałszywie zidentyfikowanych po zastosowaniu metody badawczej jako dające wynik dodatni. Jest to jeden ze wskaźników efektywności metody badawczej.

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

Ocena punktowa działania drażniącego *in vitro* (IVIS): wyprowadzony empirycznie wzór stosowany w metodzie badawczej BCOP, zgodnie z którym średnie wartości zmętnienia i przepuszczalności dla każdej grupy badanej są łączone w jedną ocenę punktową działania drażniącego *in vitro* dla każdej grupy badanej. $IVIS = \text{średnia wartość zmętnienia} + (15 \times \text{średnia wartość przepuszczalności})$.

Nieodwracalne skutki działania na oczy: zob. „Poważne uszkodzenie oczu”.

Mieszanina: mieszanina lub roztwór, które składają się z co najmniej dwóch substancji niewchodzących ze sobą w reakcję (4).

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

Niesklasyfikowane: substancje chemiczne, które nie zostały zaklasyfikowane jako substancje podrażniające oczy (kategoria 2 2A lub 2B wg GHS ONZ) ani substancje powodujące poważne uszkodzenie oczu (kategoria 1 wg GHS ONZ). Określenie używane zamiennie ze sformułowaniem „brak kategorii GHS ONZ”.

Przyrząd do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki: narzędzie stosowane do pomiaru stopnia „zmętnienia rogówki” poprzez ilościową ocenę przepuszczalności światła przez rogówkę. Typowe urządzenie posiada dwie komory, z których każda ma własne źródło światła i fotokomórkę. W jednej z komór znajduje się badana rogówka, natomiast druga jest używana do wzorcowania i zerowania urządzenia. Światło z lampy halogenowej jest kierowane na fotokomórkę przez komorę kontrolną (pustą komorę bez okien i płynu), a następnie porównywane ze światłem kierowanym na fotokomórkę przez komorę doświadczalną, w której znajduje się komora zawierająca rogówkę. Porównuje się różnicę w przepuszczalności światła między fotokomórkami i na wyświetlaczu cyfrowym przedstawiana jest wartość liczbową zmętnienia.

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

Odwracalne skutki działania na oczy: zob. „Działanie drażniące na oczy”.

Wiarygodność: miary zakresu, w jakim metoda badawcza może być przeprowadzana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jej przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją, obliczając odtwarzalność wewnątrz- i międzylaboratoryjną oraz powtarzalność wewnątrzlaboratoryjną.

Poważne uszkodzenie oczu: uszkodzenie tkanki oka lub poważne fizyczne pogorszenie widzenia spowodowane zaaplikowaniem badanej substancji chemicznej na przednią powierzchnię oka, które nie jest w pełni odwracalne w ciągu 21 dni po zaaplikowaniu. Określenie używane zamiennie z określeniem „nieodwracalne skutki działania na oczy” oraz ze sformułowaniem „kategoria 1 wg GHS ONZ” (4).

Kontrola z rozpuszczalnikiem/nośnikiem: próbka niepoddana działaniu badanej substancji, zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, w tym rozpuszczalnik lub nośnik, która jest przetwarzana razem z próbkami poddanymi działaniu badanej substancji oraz z innymi próbkami kontrolnymi w celu określenia wyjściowej reakcji dla próbek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w tym samym rozpuszczalniku lub nośniku. W przypadku badania z jednoczesną kontrolą ujemną próbka ta wykazuje również, czy rozpuszczalnik lub nośnik wchodzi w reakcję z układem badawczym.

Substancja: pierwiastki chemiczne i ich związki w stanie naturalnym lub uzyskane w wyniku dowolnego procesu produkcyjnego, w tym wszelkie dodatki konieczne do zachowania trwałości produktu i wszelkie zanieczyszczenia powstałe w wyniku zastosowanego procesu, z wyłączeniem wszelkich rozpuszczalników, które można oddzielić bez wpływu na stabilność substancji i bez zmiany jej składu (4).

Środek powierzchniowo czynny: zwany także surfaktantem, jest to substancja, np. detergent, która może zmniejszać napięcie powierzchniowe cieczy, umożliwiając tym samym jej pienienie lub przenikanie w ciała stałe; substancja ta jest także zwana środkiem zwilżającym.

Mieszanina zawierająca środek powierzchniowo czynny: w kontekście niniejszej metody badawczej jest to mieszanina zawierająca jeden lub większą ilość środków powierzchniowo czynnych w stężeniu końcowym >5 %.

Podejście odgórne: stopniowe podejście stosowane w odniesieniu do substancji chemicznej, w przypadku której podejrzewa się, że powoduje poważne uszkodzenie oczu; takie podejście polega na odróżnieniu substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu (wynik dodatni) od pozostałych substancji chemicznych (wynik ujemny).

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

Wielopoziomowa strategia badań: strategia badań sekwencyjnych, w ramach której wszystkie istniejące informacje na temat badanej substancji chemicznej są analizowane na każdym poziomie w określonym porządku z zastosowaniem procesu uwzględniającego wagę dowodów w celu określenia, czy dostępna jest wystarczająca ilość informacji do podjęcia decyzji o klasyfikacji zagrożenia przed przejściem do następnego poziomu. Jeżeli na podstawie dostępnych informacji można przypisać badanej substancji chemicznej potencjał w zakresie wywołania podrażnienia, dodatkowe badania nie są wymagane. Jeżeli na podstawie dostępnych informacji nie można przypisać badanej substancji chemicznej potencjału wywołania podrażnień, przeprowadza się procedurę badań sekwencyjnych na zwierzętach do momentu, w którym będzie można dokonać jednoznacznej klasyfikacji.

Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (GHS ONZ): system, w ramach którego proponuje się klasyfikację substancji chemicznych (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz omawia się odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak: piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki substancji i produktów niebezpiecznych, aby przekazać informacje na temat ich szkodliwego działania w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) i środowiska (4).

Kategoria 1 wg GHS ONZ: zob. „Poważne uszkodzenie oczu”.

Kategoria 2 wg GHS ONZ: zob. „Działanie drażniące na oczy”.

Brak kategorii wg GHS ONZ: substancje chemiczne, które nie spełniają wymogów w zakresie zaklasyfikowania jako należące do kategorii 1 lub 2 (2A lub 2B) wg GHS ONZ. Określenie używane zamiennie ze sformułowaniem „niesklasyfikowane”.

Zweryfikowana metoda badawcza: metoda badawcza, w odniesieniu do której zakończono badania walidacyjne w celu określenia jej istotności (w tym dokładności) i wiarygodności w odniesieniu do konkretnego celu. Należy zauważyć, że zweryfikowana metoda badawcza może nie wykazywać dostatecznej efektywności z punktu widzenia dokładności i wiarygodności, aby można było ją uznać za dopuszczalną w odniesieniu do danego celu.

Waga dowodów: proces analizowania mocnych i słabych stron różnych informacji podczas formułowania wniosku dotyczącego potencjalnego zagrożenia stwarzanego przez badaną substancję chemiczną oraz uzasadnienia takiego wniosku.

Dodatek 2

ZDOLNOŚĆ PREDYKCYJNA METODY BADAWCZEJ BCOP

Tabela 1

Zdolność predykcyjna BCOP w zakresie identyfikowania substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu [kategoria 1 wg GHS ONZ / unijnego rozporządzenia CLP a brak kategorii 1 (kategoria 2 + brak kategorii)]; kategoria I Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych a brak kategorii I (kategoria II + kategoria III + kategoria IV)]

System klasyfikacyjny	Liczba	Dokładność		Czułość		Wyniki fałszywie ujemne		Swoistość		Wyniki fałszywie dodatnie	
		%	Liczba	%	Liczba	%	Liczba	%	Liczba	%	Liczba
GHS ONZ unijne rozporządzenie CLP	191	78,53	150/191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/126	25,40	32/126
Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych	190	78,95	150/190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/127	24,41	31/127

Tabela 2

Zdolność predykcyjna BCOP w zakresie identyfikowania substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania jako substancje powodujące podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu („substancje niewykazujące działania drażniącego”) [brak kategorii wg GHS ONZ / unijnego rozporządzenia CLP a brak kategorii (kategoria 1 + kategoria 2)]; kategoria IV Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych a brak kategorii IV (kategoria I + kategoria II + kategoria III)]

System klasyfikacyjny	Liczba	Dokładność		Czułość		Wyniki fałszywie ujemne		Swoistość		Wyniki fałszywie dodatnie	
		%	Liczba	%	Liczba	%	Liczba	%	Liczba	%	Liczba
GHS ONZ unijne rozporządzenie CLP	196	68,88	135/196	100	107/107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych	190	82,11	156/190	93,15	136/146	6,85	10/146	45,45	20/44	54,55	24/44

Dodatek 3

**SUBSTANCJE CHEMICZNE PRZEZNACZONE DO OCENY BIEGŁOŚCI W ODNIESIENIU DO METODY
BADAWCZEJ BCOP**

Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania niniejszej metody badawczej laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną, prawidłowo ustalając klasyfikację 13 substancji chemicznych wskazanych w tabeli 1 pod względem działania niebezpiecznego dla oczu. Wspomniane substancje chemiczne zostały dobrane w taki sposób, by reprezentowały zakres reakcji na działanie niebezpieczne dla oczu oparty na wynikach badania na oku królika *in vivo* (wytyczna TG 405) (17) oraz na systemie klasyfikacji GHS ONZ (tj. kategorie 1, 2A, 2B lub niesklasyfikowane) (4). Przy wyborze substancji kierowano się również następującymi kryteriami: dostępnością handlową tych substancji, dostępnością wysokiej jakości danych referencyjnych z badań *in vivo* oraz istnieniem wysokiej jakości danych uzyskanych dzięki zastosowaniu metody BCOP *in vitro*. Dane referencyjne można znaleźć w poprawionym dokumencie zbiorczym (3) oraz w dokumentach przeglądowych ICCVAM dla metody badawczej BCOP (2) (18).

Tabela 1

**Substancje chemiczne zalecane do wykazania biegłości technicznej w odniesieniu do metody badawczej
BCOP**

Substancja chemiczna	Numer CAS	Klasa chemiczna (1)	Stan skupienia	Klasyfikacja <i>in vivo</i> (2)	Klasyfikacja BCOP
Chlorek benzalkoniowy (5 %)	8001-54-5	Związek oniowy	Ciecz	Kategoria 1	Kategoria 1
Chloroheksydyna	55-56-1	Amina, amidyna	Substancja stała	Kategoria 1	Kategoria 1
Kwas dibenzoilo-L-winowy	2743-38-6	Kwas karboksylowy, ester	Substancja stała	Kategoria 1	Kategoria 1
Imidazol	288-32-4	Związek heterocykliczny	Substancja stała	Kategoria 1	Kategoria 1
Kwas trichloroocetowy (30 %)	76-03-9	Kwas karboksylowy	Ciecz	Kategoria 1	Kategoria 1
Chlorek 2,6-dichlorobenzoiolu	4659-45-4	Halogenek acylu	Ciecz	Kategoria 2A	Nie można przewidzieć w sposób dokładny / wiarygodny
2-metyloacetylooctan etylu	609-14-3	Keton, ester	Ciecz	Kategoria 2B	Nie można przewidzieć w sposób dokładny / wiarygodny
Azotan amonu	6484-52-2	Sól nieorganiczna	Substancja stała	Kategoria 2 (3)	Nie można przewidzieć w sposób dokładny / wiarygodny
EDTA, sól dipotasowa	25102-12-9	Amina, kwas karboksylowy (sól)	Substancja stała	Niesklasyfikowany	Niesklasyfikowany
Tween 20	9005-64-5	Ester, polieter	Ciecz	Niesklasyfikowany	Niesklasyfikowany

Substancja chemiczna	Numer CAS	Klasa chemiczna ⁽¹⁾	Stan skupienia	Klasyfikacja <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Klasyfikacja BCOP
2-Mercaptopyrimidine	1450-85-7	Halogenek acylu	Substancja stała	Niesklasyfikowany	Niesklasyfikowany
Fenylobutazon	50-33-9	Związek heterocykliczny	Substancja stała	Niesklasyfikowany	Niesklasyfikowany
Polioksyetylenowany eter laurylu 23 (BRIJ-35) (10 %)	9002-92-0	Alkohol	Ciecz	Niesklasyfikowany	Niesklasyfikowany

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

⁽¹⁾ Klasy chemiczne przypisano do każdej badanej substancji chemicznej, wykorzystując standardowy schemat klasyfikacji oparty o system klasyfikacji Medical Subject Headings (MeSH), opracowany przez National Library of Medicine (dostępny pod adresem <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽²⁾ Na podstawie wyników badania *in vivo* na oku królika (wytyczna OECD TG 405) (17) i z zastosowaniem GHS ONZ (4).

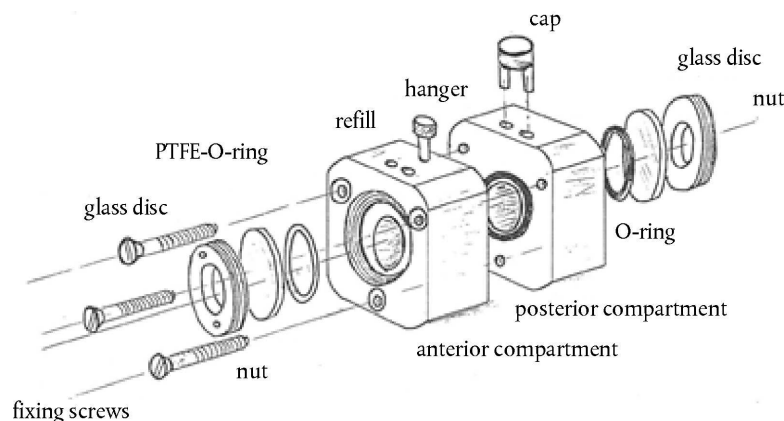
⁽³⁾ Zaklasyfikowanie do kategorii 2A lub 2B zależy od interpretacji kryterium GHS ONZ dotyczącego rozróżnienia tych dwóch kategorii, tj. 1 spośród 3 zwierząt lub 2 spośród 3 zwierząt, u których w dniu 7. odnotowano skutki niezbędne do zakwalifikowania substancji chemicznej do kategorii 2A. W badaniu *in vivo* brały udział 3 zwierzęta. Wszystkie punkty końcowe poza zaczerwienieniem spojówki u jednego zwierzęcia zupełnie ustały do dnia 7. lub wcześniej. Jedno ze zwierząt, u którego skutki działania substancji nie ustały do dnia 7., miało zaczerwienienie spojówki na poziomie 1 (w dniu 7.), które ustało w pełni w dniu 10.

Dodatek 4

POJEMNIK NA ROGÓWKĘ W BADANIU BCOP

Pojemniki na rogówkę stosowane w badaniu BCOP wykonane są z obojętnego materiału (np. polipropylenu). Pojemniki składają się z dwóch połówek (komory przedniej i tylnej) i mają dwie podobne do siebie komory wewnętrzne o cylindrycznym kształcie. Każdą komorę skonstruowano tak, aby pomieściła 5 ml cieczy i kończyła się szklanym okienkiem, poprzez które można dokonać pomiaru zmętnienia. Każda z komór wewnętrznych ma 1,7 cm średnicy i 2,2 cm głębokości⁽¹⁾. Pierścień uszczelniający typu „O” umieszczony na komorze tylnej ma zapobiegać wyciekom. Rogówki umieszcza się stroną ze śródbłonkiem do dołu na pierścieniu tylnych komór, zaś komory przednie umieszcza się na stronie z nabłonkiem. Komory utrzymywane są w miejscu przez trzy śruby ze stali nierdzewnej umieszczone na zewnętrznych krawędziach komory. Na końcu każdej komory znajduje się szklane okienko, które można zdemontować w celu uzyskania łatwego dostępu do rogówki. Pomędzy szklanym okienkiem a komorą umieszczony jest również pierścień uszczelniający typu „O” zapobiegający wyciekom. Dwa otwory na szczycie każdej komory umożliwiają wprowadzanie i usuwanie podłoża i badanych substancji. Otwory te są zamknięte gumowymi korkami w czasie podawania substancji chemicznej i w okresie inkubacji. Przepuszczalność światła przez pojemniki na rogówkę może potencjalnie ulec zmianie, ponieważ skutki zużycia lub nagromadzenia określonych pozostałości substancji chemicznej w otworach komory wewnętrznej oraz na szklanych okienkach może wpłynąć na rozpraszanie światła lub odbicie. W rezultacie może dojść do zwiększenia lub zmniejszenia podstawowej przepuszczalności światła (i odwrotnie, odczytów zmętnienia podstawowego) przez pojemniki na rogówkę oraz może być widoczne jako znaczące zmiany oczekiwanych podstawowych pomiarów początkowego zmętnienia rogówki w pojedynczych komorach (tj. wartości początkowego zmętnienia rogówki w określonych pojedynczych pojemnikach na rogówkę mogą rutynowo różnić się o ponad dwie lub trzy jednostki zmętnienia od oczekiwanych wartości podstawowych). Każde laboratorium powinno rozważyć ustanowienie programu oceny zmian w przepuszczalności światła przez pojemniki na rogówkę, w zależności od rodzaju badanych substancji chemicznych i częstotliwości wykorzystania komór. Aby ustawić wartości podstawowe, pojemniki na rogówkę można sprawdzać przed rutynowym wykorzystaniem przez zmierzenie podstawowych wartości zmętnienia (lub przepuszczalności światła) komór wypełnionych w całości substancją biogenną, bez rogówek. Pojemniki na rogówkę są następnie okresowo kontrolowane pod kątem zmian w przepuszczalności światła w okresach użytkowania. Każde laboratorium może ustalić częstotliwość kontroli pojemników na rogówkę na podstawie badanych substancji chemicznych, częstotliwości stosowania i zaobserwowanych zmian w podstawowych wartościach zmętnienia rogówki. W przypadku zaobserwowania zmian w przepuszczalności światła przez pojemniki na rogówkę należy wziąć pod uwagę odpowiednie procedury czyszczenia lub polerowania wewnętrznej powierzchni pojemników na rogówkę lub ich wymianę.

Pojemnik na rogówkę: widok zespołu rozebranego



⁽¹⁾ Podane wymiary oparte są na wymiarach pojemników na rogówkę stosowanych w przypadku krów w wieku od 12 do 60 miesięcy. W przypadku zwierząt w wieku od 6 do 12 miesięcy pojemnik powinien być tak zaprojektowany, aby komora miała pojemność 4 ml, zaś każda z komór wewnętrznych miała średnicę 1,5 cm oraz głębokość 2,2 cm. W przypadku projektowania nowego pojemnika na rogówkę należy pamiętać, że stosunek wielkości eksponowanej powierzchni rogówki do pojemności komory tylnej powinien być taki sam jak w tradycyjnym pojemniku na rogówkę. Konieczne jest zapewnienie prawidłowego określenia wartości przepuszczalności na potrzeby obliczenia IVIS przez zastosowanie proponowanego wzoru.

Dodatek 5

PRZYRZĄD DO POMIARU STOPNIA ZMĘTNIENIA ROGÓWKI

Przyrząd do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki jest to urządzenie służące do pomiaru przepuszczalności światła. Na przykład w przypadku sprzętu OP-KIT z Electro Design (Riom, Francja) wykorzystywanego podczas walidacji metody badawczej BCOP światło z lampy halogenowej jest kierowane na fotokomórkę przez komorę kontrolną (pustą komorę bez okien lub płynu), a następnie porównywane ze światłem kierowanym na fotokomórkę przez komorę doświadczalną, w której znajduje się komora zawierająca rogówkę. Porównuje się różnicę w przepuszczalności światła między fotokomórkami i na wyświetlaczu cyfrowym przedstawiana jest wartość liczbową zmętnienia. Ustala się jednostki zmętnienia. Można wykorzystać inne rodzaje przyrządu do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki o różnej konfiguracji (np. niewymagające równoległych pomiarów kontroli i komór doświadczalnych), jeżeli zostanie udowodnione, że dają podobne wyniki co zatwierdzony sprzęt.

Przyrząd do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki powinien dawać linearną odpowiedź złożoną z pojedynczych odczytów zmętnienia obejmujących punkty odcięcia stosowane w różnych klasyfikacjach opisanych w modelu prognozowania (tj. do punktu odcięcia wskazującego na działanie zrażające/silnie drażniące). W celu zapewnienia dokładnych linearnych odczytów do 75–80 jednostek zmętnienia konieczne jest przeprowadzenie kalibracji przyrządu do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki przy użyciu kilku kalibratorów. Kalibratory umieszcza się w komorze kalibracyjnej (komorze na rogówkę przeznaczony do umieszczenia kalibratorów) i odczytuje na przyrządzie do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki. Komora kalibracyjna jest przeznaczona do umieszczenia kalibratorów w przybliżeniu w takiej samej odległości od źródła światła i fotokomórki, w jakiej zlokalizowane będą rogówki podczas pomiaru zmętnienia. Wartości odniesienia i wstępne ustawienia zależą od rodzaju stosowanego sprzętu. Liniowość pomiarów zmętnienia należy zapewnić poprzez odpowiednie procedury (typowe dla konkretnego przyrządu). Na przykład w odniesieniu do sprzętu OP-KIT z Electro Design (Riom, Francja) przyrząd do pomiaru stopnia zmętnienia rogówki wzorcuje się najpierw na 0 jednostek zmętnienia przy użyciu komory wzorcującej bez kalibratora. Następnie w komorze kalibracyjnej umieszcza się pojedynczo trzy różne kalibratory i dokonuje pomiaru zmętnienia. Kalibratory 1, 2 i 3 powinny dawać odczyty zmętnienia równe ich ustalonym wartościom odpowiednio 75, 150 i 225 jednostek zmętnienia, $\pm 5\%$.”;

13) w części B rozdział B.48 otrzymuje brzmienie:

„B.48 Metoda badania na izolowanym oku kurzym do celów identyfikacji (i) substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu oraz (ii) substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania jako substancje drażniące oczy lub powodujące poważne uszkodzenie oczu.

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 438 (2013). Metoda badania na izolowanym oku kurzym (ICE) została oceniona przez Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych (ICCVAM) przy udziale Europejskiego Centrum Uznawania Metod Alternatywnych (ECVAM) i Japońskiego Centrum Uznawania Metod Alternatywnych (JaCVAM) w latach 2006 i 2010 (1) (2) (3). W ramach pierwszej oceny ICE zatwierdzono jako potwierdzoną naukową metodę badawczą do stosowania jako badanie przesiewowe w celu identyfikacji substancji chemicznych (substancji i mieszanin) powodujących poważne uszkodzenie oczu (kategoria 1) określonych przez Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (GHS ONZ) (1) (2) (4) oraz rozporządzenie (WE) nr 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin (rozporządzenie CLP) (1). W ramach drugiej oceny metodę badawczą ICE oceniono pod kątem wykorzystania jako badanie przesiewowe do celów identyfikowania substancji chemicznych niesklasyfikowanych jako powodujące podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu, określonych przez GHS ONZ (3) (4). Wyniki badania walidacyjnego

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

i zalecenia panelu naukowego ds. wzajemnej oceny utrzymały pierwotne zalecenie dotyczące stosowania ICE do celów klasyfikowania substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu (kategoria 1 wg GHS ONZ), ponieważ dostępna baza danych pozostała niezmieniona od czasu pierwotnego zatwierdzenia przez ICCVAM. Na tym etapie nie zasugerowano żadnych dodatkowych zaleceń dotyczących rozszerzenia dziedziny zastosowania ICE w celu uwzględnienia również innych kategorii. Przeprowadzono ponowną ocenę zbioru danych dotyczących *in vitro* i *in vivo* wykorzystywanych w badaniu walidacyjnym ze szczególnym uwzględnieniem oceny przydatności ICE do identyfikowania substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania do substancji powodujących podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu (5). W ramach tej ponownej oceny stwierdzono, że metodę badawczą ICE można wykorzystać również do identyfikowania substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania do substancji powodujących podrażnienie i poważne uszkodzenie oczu zgodnie z GHS ONZ (4) (5). Niniejsza metoda badawcza obejmuje zalecane stosowanie i ograniczenia metody badawczej ICE oparte na tych ocenach. Główne różnice między pierwotną wersją wytycznych OECD dotyczących badań z 2009 r. a zaktualizowaną wersją z 2013 r. odnoszą się m.in. do: wykorzystania metody badawczej ICE do identyfikowania substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania według systemu klasyfikacji GHS ONZ, aktualizacji elementów sprawozdania z badania, aktualizacji dodatku 1 zawierającego definicje oraz aktualizacji dodatku 2 zawierającego substancje chemiczne zalecane do oceny biegłości.

Obecnie powszechnie uznaje się, że w dającej się przewidzieć przyszłości żaden pojedynczy test działania drażniącego na oko *in vitro* nie będzie w stanie zastąpić testu działania drażniącego na oko *in vivo* wg Draize'a na potrzeby prognozowania pełnego zakresu działania drażniącego różnych klas chemicznych. Strategiczne połączenia kilku alternatywnych metod badawczych w ramach (zintegrowanej) strategii badań mogą jednak być w stanie zastąpić test działania drażniącego na oko wg Draize'a (6). Podejście odgórne (7) ma w założeniu być stosowane wówczas, gdy na podstawie istniejących informacji oczekuje się, że substancja chemiczna będzie miała wysoki potencjał działania drażniącego, podejście oddolne (7) ma być natomiast stosowane wówczas, gdy na podstawie istniejących informacji oczekuje się, że substancja chemiczna nie spowoduje podrażnienia oczu w stopniu wymagającym zaklasyfikowania jej jako substancji drażniącej dla oczu. Metoda badawcza ICE jest metodą badawczą *in vitro*, którą można stosować w niektórych okolicznościach i przy określonych ograniczeniach, jak opisano w pkt 8–10 do celów klasyfikacji i oznakowania substancji chemicznych pod względem zagrożeń dla oczu. Chociaż uważa się, że metoda badawcza ICE nie może samodzielnie zastąpić badania na oku królika *in vivo*, jest ona zalecana jako pierwszy etap w strategii badań takiej jak podejście odgórne zaproponowane przez Scotta *et al.* (7) na potrzeby identyfikacji substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu, tj. substancji chemicznych, które należy zaklasyfikować do kategorii 1 wg GHS ONZ bez dalszych badań (4). Metoda badawcza ICE jest również zalecana do celów identyfikowania substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania do substancji powodujących podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu zgodnie z GHS ONZ (brak kategorii) (4), i można ją w związku z tym stosować jako pierwszy etap w strategii badań zakładającej podejście oddolne (7). Konieczne będzie jednak przeprowadzenie dodatkowego badania (*in vitro* lub *in vivo*) w odniesieniu do substancji chemicznej, w przypadku której nie przewidziano, że spowoduje poważne uszkodzenie oczu lub której nie zaklasyfikowano do substancji powodujących podrażnienie/poważne uszkodzenie oczu w ramach metody badawczej ICE, w celu ustanowienia ostatecznej klasyfikacji. Ponadto przed zastosowaniem metody badawczej ICE w ramach podejścia oddolnego należy skonsultować się z odpowiednimi organami regulacyjnymi zgodnie z systemami klasyfikacji innymi niż GHS ONZ.

Niniejsza metoda badawcza ma na celu opisanie procedur stosowanych do oceny potencjalnego działania szkodliwego dla oczu badanej substancji chemicznej, określanego na podstawie jej potencjału oddziaływania toksycznego na oko kurze poddane enukleacji. Toksyczne oddziaływanie na rogówkę mierzy się przy zastosowaniu (i) jakościowej oceny zmętnienia, (ii) jakościowej oceny uszkodzenia nabłonka poprzez zaaplikowanie fluoresceiny na oko (zatrzymanie fluoresceiny), (iii) ilościowego pomiaru zwiększonej grubości (obrzęku) oraz (iv) jakościowej oceny makroskopowych uszkodzeń morfologicznych powierzchni. Oceny zmętnienia rogówki, obrzęku i uszkodzeń po narażeniu na działanie badanej substancji chemicznej dokonuje się indywidualnie, a następnie łączy się je w celu otrzymania klasyfikacji działania drażniącego dla oczu.

Definicje znajdują się w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

Niniejsza metoda badawcza opiera się na protokole zaproponowanym w wytycznych OECD 160 (8), który opracowano po przeprowadzeniu przez ICCVAM międzynarodowego badania walidacyjnego (1) (3) (9), przy udziale Europejskiego Centrum Uznawania Metod Alternatywnych, Japońskiego Centrum Uznawania Metod Alternatywnych oraz Departamentu Jakości Życia Działu Toksykologii i Farmakologii Stosowanej TNO (Niderlandy). Protokół opiera się na informacjach uzyskanych z opublikowanych protokołów oraz bieżących protokołów stosowanych przez TNO (10) (11) (12) (13) (14).

Zbadano szeroki zakres substancji chemicznych w ramach walidacji leżącej u podstaw niniejszej metody badawczej, a empiryczna baza danych z badania walidacyjnego objęła 152 substancje chemiczne, w tym 72 substancje i 80 mieszanin (5). Metoda badawcza ma zastosowanie do ciał stałych, cieczy, emulsji i żeli. Płyny mogą być wodne lub niewodne; substancje stałe mogą być rozpuszczalne lub nierozpuszczalne w wodzie. Gazów i aerozoli nie oceniano jeszcze w badaniu walidacyjnym.

Metodę badawczą ICE można wykorzystać do identyfikacji substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu, tj. substancji chemicznych zaklasyfikowanych do kategorii 1 wg GHS ONZ (4). W przypadku wykorzystywania jej do tego celu zidentyfikowane ograniczenia metody badawczej ICE opierają się na wysokich odsetkach wyników fałszywie dodatnich w przypadku alkoholi i wysokim odsetku wyników fałszywie ujemnych w przypadku ciał stałych i środków powierzchniowo czynnych (1) (3) (9). W tym kontekście odsetek wyników fałszywie ujemnych (substancje chemiczne należące do kategorii 1 wg GHS ONZ, lecz niezidentyfikowane jako takie) nie ma decydującego znaczenia, ponieważ wszystkie badane substancje chemiczne, które okazały się ujemne zostaną następnie zbadane za pomocą innych odpowiednio zweryfikowanych badań *in vitro* lub jako ostatni wariant na królikach, w zależności od wymogów regulacyjnych, przy zastosowaniu strategii badań sekwencyjnych zgodnie z podejściem opartym na analizie wagi dowodów. Należy zauważyć, że substancje stałe mogą prowadzić do zmiennych i ekstremalnych warunków narażenia w teście działania drażniącego na oko *in vivo* wg Draize'a, co z kolei może skutkować nietrafnymi prognozami ich rzeczywistego potencjału działania drażniącego (15). Osoby przeprowadzające badanie mogą rozważyć zastosowanie niniejszej metody badawczej w odniesieniu do wszystkich rodzajów substancji chemicznych, wskutek czego wynik dodatni należy zaakceptować jako wskazujący na poważne uszkodzenie oczu, tj. zaklasyfikować go do kategorii 1 wg GHS ONZ bez dalszych badań. Wyniki dodatnie uzyskane w przypadku alkoholi należy jednak interpretować z ostrożnością ze względu na ryzyko ich zawyżenia.

W przypadku wykorzystania metody badawczej ICE do identyfikacji substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu (kategoria 1 wg GHS ONZ) metoda ta wykazuje ogólną dokładność na poziomie 86 % (120/140), odsetek wyników fałszywie dodatnich na poziomie 6 % (7/113) oraz odsetek wyników fałszywie ujemnych na poziomie 48 % (13/27) w porównaniu do danych uzyskanych w wyniku metody badań na oku królika *in vivo*, sklasyfikowanych zgodnie z systemem klasyfikacji GHS ONZ (4) (5).

Metodę badawczą ICE można wykorzystać również do identyfikowania substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania do substancji powodujących podrażnienie lub poważne uszkodzenie oczu według systemu klasyfikacji GHS ONZ (4). Przed zastosowaniem metody badawczej ICE w ramach podejścia oddolnego należy skonsultować się z odpowiednimi organami regulacyjnymi zgodnie z innymi systemami klasyfikacji. Niniejszą metodę badawczą można zastosować w odniesieniu do wszystkich rodzajów substancji chemicznych, wskutek czego wynik ujemny należy zaakceptować, aby nie uznawać substancji chemicznej za powodującą podrażnienie i poważne uszkodzenie oczu. Bazowanie na jednym wyniku z bazy danych z badania walidacyjnego może jednak doprowadzić do zaniżenia prognoz dotyczących farb przeciwporostowych zawierających rozpuszczalnik organiczny (5).

W przypadku wykorzystania metody badawczej ICE do identyfikowania substancji chemicznych, które nie wymagają zaklasyfikowania do substancji powodujących podrażnienie i poważne uszkodzenie oczu metoda ta wykazuje ogólną dokładność na poziomie 82 % (125/152), odsetek wyników fałszywie dodatnich na poziomie 33 % (26/79) oraz odsetek wyników fałszywie ujemnych na poziomie 1 % (1/73) w porównaniu do danych uzyskanych w wyniku metody badań na oku królika *in vivo*, sklasyfikowanych zgodnie z GHS ONZ (4) (5). W przypadku wykluczenia z bazy danych badanych substancji chemicznych należących do określonych klas (tj. farb przeciwporostowych zawierających rozpuszczalnik organiczny), dokładność metody badawczej ICE wynosi 83 % (123/149), odsetek wyników fałszywie dodatnich wynosi 33 % (26/78) a odsetek wyników fałszywie ujemnych 0 % (0/71) zgodnie z systemem klasyfikacji GHS ONZ (4) (5).

Nie zaleca się stosowania metody badawczej ICE do identyfikacji badanych substancji chemicznych, które należy uznać za powodujące podrażnienie oczu (tj. zaklasyfikować do kategorii 2 lub 2A wg GHS ONZ) lub badanych substancji chemicznych, które należy uznać za lekko drażniące dla oczu (kategoria 2B wg GHS ONZ), ze względu na zaniżoną klasyfikację znacznej liczby substancji chemicznych należących do kategorii 1 i uznanie ich za należące do kategorii 2, 2A lub 2B wg GHS ONZ oraz ze względu na zawyżoną klasyfikację i uznanie substancji chemicznych nieprzypisanych do żadnej kategorii wg GHS ONZ za substancje z kategorii 2, 2A lub 2B wg GHS ONZ. W tym celu konieczne może być przeprowadzenie dodatkowego badania, z wykorzystaniem innej odpowiedniej metody.

Wszystkie procedury przeprowadzane z wykorzystaniem oczu kurzych powinny przebiegać zgodnie z przepisami i procedurami dotyczącymi postępowania z materiałem pozyskanym od ludzi lub zwierząt, który obejmuje m.in. tkanki i płyny tkankowe, obowiązującymi w placówce przeprowadzającej badanie. Zaleca się przestrzeganie ogólnych środków ostrożności dla laboratoriów (16).

Chociaż w metodzie badawczej ICE nie uwzględnia się uszkodzeń spojówki i tęczówki ocenionych w ramach metody badawczej dotyczącej podrażnienia oczu królika, metoda ta odnosi się do oddziaływania na rogówkę, co stanowi główne kryterium klasyfikacji *in vivo*, w przypadku rozważania klasyfikacji GHS ONZ. Ponadto, chociaż w metodzie badawczej ICE nie można ocenić odwracalności zmian w rogówce jako takich, zaproponowano, na podstawie badań oczu królika, możliwość zastosowania oceny początkowego stadium uszkodzenia rogówki w celu określenia niektórych rodzajów nieodwracalnych skutków (17). W szczególności konieczna jest dodatkowa wiedza naukowa, aby zrozumieć sposób powstawania nieodwracalnych skutków niezwiązanych z pierwszym wystąpieniem poważnego uszkodzenia. Metoda badawcza ICE nie pozwala też na ocenę potencjalnej toksyczności ogólnoustrojowej związanej z narażeniem oczu.

Niniejsza metoda badawcza będzie aktualizowana okresowo w miarę uwzględniania nowych informacji i danych. Na przykład histopatologia może być potencjalnie przydatna, gdy potrzebna będzie bardziej szczegółowa charakterystyka uszkodzenia rogówki. Aby ocenić tę możliwość, użytkowników zachęca się do zachowywania oczu i przygotowywania wycinków histopatologicznych, które można wykorzystać do opracowania bazy danych i kryteriów podejmowania decyzji w celu dalszego poprawienia dokładności niniejszej metody badawczej. OECD opracowała wytyczne dotyczące stosowania metod badawczych *in vitro* toksyczności dla oczu, które zawierają szczegółowe procedury gromadzenia wycinków histopatologicznych i informacje na temat miejsca dostarczenia wycinków lub danych histopatologicznych (8).

W każdym laboratorium zaczynającym przeprowadzanie tego badania należy zastosować substancje chemiczne przeznaczone do oceny biegłości wymienione w dodatku 2. Laboratorium może stosować te substancje chemiczne w celu wykazania swojej biegłości technicznej w zakresie przeprowadzania metody badawczej ICE przed przedstawieniem danych z badania ICE do celów regulacyjnej klasyfikacji zagrożeń.

ZASADA BADANIA

Metoda badawcza ICE jest modelem organotypowym, który zapewni krótkotrwałe zachowanie oka kurzego *in vitro*. Uszkodzenia spowodowane badaną substancją chemiczną ocenia się w ramach niniejszej metody badawczej na podstawie obrzęku i zmętnienia rogówki oraz zatrzymania fluoresceiny. Podczas gdy dwa ostatnie parametry wymagają oceny jakościowej, analiza obrzęku rogówki stanowi ocenę ilościową. Każdy pomiar przelicza się na wynik ilościowy stosowany do obliczania ogólnego wskaźnika podrażnienia albo przypisuje się mu kategorię jakościową stosowaną do przypisania kategorii w klasyfikacji *in vitro* pod względem zagrożeń dla oczu – kategoria 1 wg GHS ONZ albo niesklasyfikowana wg GHS ONZ. Każdy z tych wyników można następnie zastosować do przewidzenia potencjalnego poważnego uszkodzenia oczu *in vivo* lub braku wymogu zaklasyfikowania badanej substancji chemicznej do substancji powodujących uszkodzenie oczu (zob. kryteria podejmowania decyzji). Nie opracowano jednak żadnego systemu klasyfikacji substancji chemicznych, w przypadku których nie przewidziano, że spowodują poważne uszkodzenie oczu lub których nie zaklasyfikowano w ramach metody badawczej ICE (zob. pkt 11).

Pochodzenie i wiek oczu kurzych

Dotychczas oczu do niniejszej analizy pobierano od kurcząt uzyskiwanych z rzeźni, w której poddawano je ubojowi na potrzeby spożycia przez ludzi, co eliminowało konieczność wykorzystywania zwierząt laboratoryjnych. Stosuje się wyłącznie oczu zwierząt zdrowych, które uznano za odpowiednie do wprowadzenia do łańcucha żywnościowego człowieka.

Chociaż nie przeprowadzono badania z grupą kontrolną w celu oceny optymalnego wieku kurcząt, wiek i masa kurcząt wykorzystywanych dotychczas w niniejszej metodzie badawczej odpowiadają młodym kurczętom tradycyjnie przetwarzanym przez rzeźnię drobiu (tzn. ok. 7 tygodni, 1,5–2,5 kg).

Pobieranie oczu i ich transport do laboratorium

Głowy należy usunąć natychmiast po sedacji kurcząt (najczęściej przy użyciu wstrząsu elektrycznego) i nacięciu szyi w celu wywołania krwawienia. Należy zapewnić lokalne źródło kurcząt, zlokalizowane blisko laboratorium, tak by głowy zwierząt mogły zostać przetransportowane z rzeźni do laboratorium na tyle szybko, żeby zminimalizować możliwość pogorszenia stanu oczu lub skażenia bakteriami. Należy zminimalizować odstęp czasu między pobraniem głów kurcząt a umieszczeniem oczu w komorze do przepłukiwania po enukleacji oczu (zwykle do dwóch godzin) w celu zapewnienia spełnienia kryteriów dopuszczalności analizy. Wszystkie oczu wykorzystane w badaniu powinny pochodzić z tej samej grupy oczu pobranych danego dnia.

Ponieważ oczy wycina się w laboratorium, głowy w stanie nienaruszonym są transportowane z rzeźni w temperaturze otoczenia (zwykle w temp. od 18 °C do 25 °C), w plastikowych pojemnikach nawilżanych chusteczkami zmoczonymi w soli fizjologicznej.

Kryteria doboru oczu i liczba oczu zastosowanych w badaniu ICE

Odrzuca się oczy wykazujące po enukleacji wysoki poziom wybarwienia fluoresceiną (tzn. > 0,5) lub zmętnienia rogówki (tzn. > 0,5).

Każda grupa badana oraz grupa jednoczesnej kontroli dodatniej składa się z co najmniej trzech gałek ocznych. Grupa kontrolna ujemna lub grupa kontrolna z rozpuszczalnikiem (w przypadku stosowania rozpuszczalnika innego niż roztwór soli) składa się z co najmniej jednego oka.

W przypadku substancji stałych prowadzących do uzyskania wyniku w postaci braku kategorii wg GHS zaleca się przeprowadzenie drugiej serii badań na trzech gałkach ocznych w celu potwierdzenia lub odrzucenia wyniku ujemnego.

PROCEDURA

Przygotowanie oczu

Powieki wycina się ostrożnie, tak aby nie uszkodzić rogówki. Szybkiej oceny, czy rogówka jest nienaruszona, dokonuje się poprzez wkroplenie soli sodowej fluoresceiny o stężeniu 2 % (w/v) na powierzchnię rogówki na kilka sekund, a następnie przemycie rogówki solą fizjologiczną. Oczy poddane działaniu fluoresceiny bada się następnie przy użyciu biomikroskopu w celu zagwarantowania, że rogówka nie jest uszkodzona (tzn. że wyniki zatrzymania fluoresceiny oraz zmętnienia rogówki wynoszą $\leq 0,5$).

Jeżeli oko nie jest uszkodzone, wycina się je całkowicie z czaszki, starając się nie uszkodzić rogówki. Gałkę oczną wyciąga się z oczodołu, przytrzymując mocno fałd półksiężycowaty spojówki szczypczykami chirurgicznymi, zaś mięśnie oka odcina się przy użyciu zagiętych tępo zakończonych nożyczek. Nie można dopuścić do powstania uszkodzeń rogówki poprzez wywieranie na nią nadmiernej nacisku (tj. stosowania urządzeń kompresyjnych).

Po wyjęciu gałki ocznej z oczodołu należy pozostawić przyczepioną widoczną część nerwu wzrokowego. Po wyjęciu z oczodołu oko umieszcza się na podkładce chłonnej i odcina się fałd półksiężycowaty spojówki i inne tkanki łączne.

Poddane enukleacji oko umieszcza się w uchwycie ze stali nierdzewnej, przy rogówce ustawionej pionowo. Uchwyt przenosi się następnie do komory urządzenia do przepłukiwania (18). Uchwyty należy umieścić w urządzeniu do przepłukiwania w taki sposób, by na całą rogówkę kapała sól fizjologiczna (3–4 krople na minutę lub 0,1–0,15 ml/min). Komory urządzenia do przepłukiwania powinny utrzymywać temperaturę $32 \pm 1,5$ °C. Dodatek 3 zawiera schemat budowy typowego urządzenia do przepłukiwania i uchwytów na oczy, które można nabyć na rynku lub zbudować samodzielnie. Urządzenie można zmodyfikować, tak by spełniało potrzeby konkretnego laboratorium (np. poprzez dostosowanie liczby oczu).

Po umieszczeniu w urządzeniu do przepłukiwania oczu bada się ponownie przy użyciu biomikroskopu w celu sprawdzenia, czy nie zostały one uszkodzone podczas procedury wycinania. W tym momencie należy również zmierzyć grubość rogówki na jej wierzchołku przy zastosowaniu urządzenia do pomiaru głębokości połączonego z biomikroskopem. Należy wymienić oczy (i) o wyniku zatrzymania fluoresceiny $>0,5$; (ii) o zmętnieniu rogówki $> 0,5$; lub (iii) posiadające jakiegokolwiek ślady uszkodzenia. Oczy, których nie odrzucono ze względu na jedno z powyższych kryteriów, należy odrzucić, jeżeli grubość ich rogówki różni się o ponad 10 % od średniej wartości dla wszystkich oczu. Użytkownicy powinni być świadomi, że biomikroskopy mogą dawać różne wyniki pomiaru grubości rogówki, jeżeli stosuje się różne ustawienia szerokości szczeliny. Szerokość szczeliny powinna wynosić 0,095 mm.

Po zbadaniu i dopuszczeniu wszystkich oczu inkubuje się je przez ok. 45 do 60 minut w celu zrównoważenia ich z układem badawczym przed dawkowaniem substancji. Po okresie wyrównania stężeń rejestruje się zerowy pomiar referencyjny grubości rogówki i jej zmętnienia, który służy jako punkt odniesienia (tj. czas = 0). Wynik pomiaru fluoresceiny określony w momencie wycinania stosuje się jako pomiar odniesienia dla tego punktu końcowego.

Podawanie badanej substancji chemicznej

Natychmiast po dokonaniu zerowych pomiarów referencyjnych oko (w pojemniku) wyjmuje się z urządzenia do przepłukiwania i ustawia w pozycji poziomej, a na rogówkę aplikuje się badaną substancję chemiczną.

Badane substancje chemiczne w stanie ciekłym bada się zwykle w stanie nierozcieńczonym, można je jednak w razie potrzeby rozcieńczyć (np. w ramach schematu badania). Preferowanym rozpuszczalnikiem do rozcieńczania badanych substancji chemicznych jest sól fizjologiczna. Można stosować również alternatywne rozpuszczalniki w kontrolowanych warunkach badania, należy jednak udowodnić zasadność zastosowania rozpuszczalników innych niż sól fizjologiczna.

Badane substancje chemiczne w stanie ciekłym aplikuje się na rogówkę w taki sposób, by cała powierzchnia rogówki była równomiernie pokryta badaną substancją chemiczną; standardowa ilość wynosi 0,03 ml.

Badane substancje chemiczne w stanie stałym należy w miarę możliwości jak najdokładniej rozdrobnić za pomocą moździerza i tłuczka lub podobnego urządzenia rozdrabniającego. Proszek należy zaaplikować na rogówkę w taki sposób, by jej powierzchnia była równomiernie pokryta badaną substancją chemiczną; standardowa ilość wynosi 0,03 g.

Badaną substancję chemiczną (ciecz lub substancja stała) nakłada się na 10 sekund, a następnie zmywa z oka solą fizjologiczną (ok. 20 ml) w temperaturze otoczenia. Następnie oko (w pojemniku) umieszcza się ponownie w urządzeniu do przepłukiwania w pierwotnej pozycji pionowej. W razie potrzeby można ponownie przemyć oko po pozostawieniu substancji przez 10 sekund i w kolejnych punktach czasowych (np. po odkryciu pozostałości badanej substancji chemicznej na rogówce). Na ogół ilość soli fizjologicznej dodatkowo zastosowanej do przemycia oka nie jest krytyczna, jednak istotne jest obserwowanie przyczepności substancji chemicznej do rogówki.

Kontrolne substancje chemiczne

Każde doświadczenie powinno obejmować jednoczesną kontrolę ujemną lub kontrolę z rozpuszczalnikiem/nośnikiem i kontrolę dodatnią.

W przypadku badania cieczy o stężeniu 100 % lub substancji stałych w ramach metody badawczej ICE jako jednoczesną kontrolę ujemną stosuje się sól fizjologiczną w celu wykrycia niespecyficznych zmian w układzie badawczym i zapewnienia, aby warunki badania nie prowadziły nieprawidłowo do reakcji w postaci działania drażniącego.

W przypadku badania cieczy rozcieńczonych w metodzie badawczej uwzględnia się jednoczesną grupę kontrolną z rozpuszczalnikiem/nośnikiem w celu wykrycia niespecyficznych zmian w układzie badawczym i zapewnienia, aby warunki badania nie prowadziły nieprawidłowo do reakcji w postaci działania drażniącego. Jak stwierdzono w pkt. 31 można stosować jedynie rozpuszczalnik/nośnik, w odniesieniu do którego wykazano, że nie wpływa niekorzystnie na układ badawczy.

W każdym doświadczeniu uwzględnia się substancję o znanym działaniu drażniącym dla oczu jako jednoczesną kontrolę dodatnią w celu zweryfikowania, czy wywołana została właściwa reakcja. Ponieważ w niniejszej metodzie badawczej stosuje się badanie ICE w celu zidentyfikowania substancji żrących lub silnie drażniących, do kontroli dodatniej należy użyć substancji chemicznej odniesienia, która wywołuje silną reakcję w niniejszej metodzie badawczej. Aby zapewnić możliwość oceny zmienności reakcji w kontroli dodatniej w czasie, siła reakcji w postaci silnego działania drażniącego nie może być zbyt duża. Należy wyprodukować wystarczające dane *in vitro* do kontroli dodatniej, aby można było obliczyć określony statystycznie dopuszczalny zakres kontroli dodatniej. Jeżeli dla konkretnej kontroli dodatniej nie istnieją odpowiednie dane historyczne z metody badawczej ICE, może zająć konieczność przeprowadzenia badań w celu dostarczenia tych informacji.

Przykładowymi substancjami służącymi do kontroli dodatniej dla badanych substancji chemicznych w stanie ciekłym są 10-procentowy roztwór kwasu octowego lub 5-procentowy roztwór chlorku bezalkalnego, zaś przykładowymi substancjami służącymi do kontroli dodatniej dla badanych substancji chemicznych w stanie stałym są wodorotlenek sodu lub imidazol.

Wzorcowe substancje chemiczne są przydatne do oceny potencjalnego działania drażniącego na oczy nieznanymi substancjami chemicznymi z określonej klasy chemicznej lub produktowej lub do oceny względnego potencjalnego działania drażniącego substancji drażniącej dla oczu w określonym zakresie reakcji w postaci działania drażniącego.

Pomiar punktów końcowych

Rogówki poddane działaniu substancji chemicznej ocenia się przed podaniem tej substancji, a następnie po 30, 75, 120, 180 i 240 minutach (± 5 minut) od płukania po podaniu substancji chemicznej. Te punkty czasowe zapewniają odpowiednią liczbę pomiarów w trakcie czterogodzinnego okresu od podania substancji chemicznej, pozostawiając jednocześnie odpowiednią ilość czasu pomiędzy pomiarami na dokonanie koniecznych obserwacji wszystkich oczu.

Oceniane punkty końcowe to zmętnienie rogówki, obrzęk, zatrzymanie fluoresceiny i zmiany morfologiczne (np. wżery lub rozluźnienie nabłonka). Wszystkie punkty końcowe, z wyjątkiem zatrzymania fluoresceiny (które określa się wyłącznie przed podaniem materiału działaniu badanej substancji chemicznej oraz 30 minut po nim) ustalane są we wszystkich powyższych punktach czasowych.

Zaleca się wykonanie fotografii celem udokumentowania zmętnienia rogówki, zatrzymania fluoresceiny, zmian morfologicznych oraz histopatologii, jeśli jest przeprowadzana.

Zachęca się użytkowników, aby po ostatniej ocenie po czterech godzinach utrwaliли oczy w odpowiednim środku utrwalającym (np. obojętnej buforowanej formalinie) na potrzeby ewentualnego badania histopatologicznego (szczegółowe informacje można znaleźć w pkt 14 i pozycji (8) bibliografii).

Obrzęk rogówki określa się na podstawie pomiaru grubości rogówki dokonywanego przy użyciu grubościomierza optycznego w biomikroskopie. Wartość tę wyraża się procentowo i oblicza na podstawie pomiarów grubości rogówki według poniższego wzoru:

$$\left(\frac{\text{grubość rogówki w punkcie czasowym } t - \text{grubość rogówki w pkt czasowym} = 0}{\text{grubość rogówki w punkcie czasowym} = 0} \right) \times 100$$

Średnią wartość procentową obrzęku rogówki we wszystkich oczach poddanych badaniu oblicza się w oparciu o wszystkie punkty czasowe obserwacji. W oparciu o najwyższy średni wynik obrzęku rogówki zaobserwowany w dowolnym punkcie czasowym podaje się ogólny wynik dla kategorii w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej (zob. pkt 51).

Zmętnienie rogówki oblicza się przy zastosowaniu powierzchni rogówki, która jest najbardziej zmętniała, jak przedstawiono na tabeli 1. Średnią wartość procentową zmętnienia rogówki we wszystkich oczach poddanych badaniu oblicza się w oparciu o wszystkie punkty czasowe obserwacji. W oparciu o najwyższy średni wynik obrzęku rogówki zaobserwowany w dowolnym punkcie czasowym podaje się ogólny wynik dla kategorii w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej (zob. pkt 51).

Tabela 1

Wyniki oceny zmętnienia rogówki

Wynik oceny	Obserwacja
0	Brak zmętnienia
0,5	Nieznaczne zmętnienie
1	Obszary pojedyncze lub rozproszone; wyraźnie widoczne elementy tęczówki
2	Łatwo zauważalny obszar półprzezroczysty; nieco zamazane elementy tęczówki
3	Poważne zmętnienie rogówki; nie są widoczne żadne konkretne elementy tęczówki; bardzo trudno jest określić wielkość źrenicy zwierzęcia
4	Całkowite zmętnienie rogówki; niewidoczna tęczówka

Zatrzymanie fluoresceiny ocenia się w punkcie czasowym obserwacji po 30 minutach, jak przedstawiono w tabeli 2. Średni poziom zatrzymania fluoresceiny we wszystkich badanych oczach oblicza się wyłącznie w punkcie czasowym obserwacji po 30 minutach; wartość tę stosuje się do określenia ogólnego wyniku dla kategorii w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej (zob. pkt 51).

Tabela 2

Wyniki zatrzymania fluoresceiny

Wynik oceny	Obserwacja
0	Brak zatrzymania fluoresceiny
0,5	Nieznaczne wybarwienie pojedynczych komórek
1	Wybarwienie pojedynczych komórek rozproszone na całej powierzchni rogówki poddanej działaniu substancji
2	Ogniskowe lub łączące się zwarte wybarwienie pojedynczych komórek
3	Łączące się duże obszary rogówki zatrzymują fluoresceinę

Zmiany morfologiczne obejmują „wżery” komórek nabłonka, „rozluźnienie” nabłonka, „stwardnienie” powierzchni rogówki oraz „przyleganie” badanej substancji chemicznej do rogówki. Ustalenia te mogą się różnić między sobą stopniem zaawansowania i mogą występować jednocześnie. Klasyfikacja tych ustaleń jest subiektywna i zależna od interpretacji osoby przeprowadzającej badanie.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ**Ocena danych**

Wyniki badania zmętnienia rogówki, obrzęku rogówki i zatrzymania fluoresceiny należy oceniać osobno, tak aby wygenerować klasę ICE dla każdego punktu końcowego. Klasy ICE w odniesieniu do każdego punktu końcowego są następnie łączone w celu uzyskania klasyfikacji działania drażniącego dla oczu dla każdej badanej substancji chemicznej.

Kryteria podejmowania decyzji

Po dokonaniu oceny każdego punktu końcowego można przypisać klasy ICE w oparciu o wcześniej ustalony zakres. Interpretacji wyników dotyczących obrzęku rogówki (tabela 3), zmętnienia (tabela 4) i zatrzymania fluoresceiny (tabela 5) z zastosowaniem czterech klas ICE dokonuje się na podstawie skali przedstawionej poniżej. Należy zauważyć, że wyniki dotyczące obrzęku rogówki przedstawione w tabeli 3 mają zastosowanie wyłącznie w przypadku gdy jej grubość mierzy się przy użyciu biomikroskopu (np. Haag-Streit BP900) z urządzeniem do pomiaru głębokości nr 1, przy ustawieniu szczeliny na szerokość $9\frac{1}{2}$, co odpowiada 0,095 mm. Użytkownicy powinni być świadomi, że biomikroskopy mogą dawać różne wyniki pomiaru grubości rogówki, jeżeli stosuje się różne ustawienia szerokości szczeliny.

Tabela 3

Kryteria klasyfikacji ICE w odniesieniu do obrzęku rogówki

Średni obrzęk rogówki (%) (*)	Klasa ICE
0–5	I
> 5–12	II

Średni obrzęk rogówki (%) (*)	Klasa ICE
> 12–18 (> 75 min po podaniu substancji)	II
> 12–18 (\leq 75 min po podaniu substancji)	III
> 18–26	III
> 26–32 (> 75 min po podaniu substancji)	III
> 26–32 (\leq 75 min po podaniu substancji)	IV
> 32	IV

(*) Najwyższy średni wynik zaobserwowany w dowolnym punkcie czasowym

Tabela 4

Kryteria klasyfikacji ICE w odniesieniu do zmętnienia

Maksymalna średnia wartość zmętnienia (*)	Klasa ICE
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–4,0	IV

(*) Maksymalny średni wynik zaobserwowany w dowolnym punkcie czasowym (na podstawie wyników zmętnienia, jak określono w tabeli 1).

Tabela 5

Kryteria klasyfikacji ICE w odniesieniu do średniego poziomu zatrzymania fluoresceiny

Średni wynik zatrzymania fluoresceiny 30 minut po podaniu substancji (*)	Klasa ICE
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–3,0	IV

(*) Na podstawie wyników określonych w tabeli 2.

Klasyfikację *in vitro* badanej substancji chemicznej ocenia się poprzez odczyt klasyfikacji GHS odpowiadającej połączeniu kategorii otrzymanych w odniesieniu do obrzęku rogówki, zmętnienia rogówki i zatrzymania fluoresceiny, jak opisano w tabeli 6.

Tabela 6

Ogólne klasyfikacje *in vitro*

Klasyfikacja GHS ONZ	Kombinacja 3 punktów końcowych
Brak kategorii	3 × I 2 × I, 1 × II
Nie można przewidzieć działania	Inne kombinacje
Kategoria 1	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Zmętnienie rogowki ≥ 3 po 30 min (w co najmniej 2 oczach) Zmętnienie rogowki = 4 w dowolnym punkcie czasowym (w co najmniej 2 oczach) Znaczne rozluźnienie nabłonka (w co najmniej 1 oku)

(*) Mniej prawdopodobne kombinacje.

Kryteria dopuszczalności badania

Badanie uznaje się za dopuszczalne, jeżeli jednoczesną kontrolę ujemną lub kontrolę z rozpuszczalnikiem/nośnikiem oraz jednoczesną kontrolę dodatnią zidentyfikowano odpowiednio jako niesklasyfikowane zgodnie z GHS i należące do kategorii 1 wg GHS.

Sprawozdanie z badania

Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje, o ile są one istotne dla przebiegu badania:

Badane i kontrolne substancje chemiczne

- nazwa chemiczna (nazwy chemiczne), np. nazwa strukturalna używana przez Chemical Abstracts Service (CAS), po której następują inne nazwy, jeżeli są znane;
- numer CAS, jeżeli jest znany;
- czystość i skład badanych substancji chemicznych lub kontrolnych substancji chemicznych (jako wartość procentowa masy), w zakresie, w jakim te informacje są dostępne;
- właściwości fizykochemiczne istotne dla przebiegu badania, np. stan skupienia, lotność, pH, stabilność, klasa chemiczna, rozpuszczalność w wodzie;
- postępowanie z badaną/kontrolną substancją chemiczną przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);
- stabilność, jeżeli jest znana;

Informacje dotyczące sponsora i placówki przeprowadzającej badanie

- nazwa i adres sponsora i placówki przeprowadzającej badanie oraz dane kierownika badań;
- identyfikacja źródła oczu (np. zakład, w którym je pobrano);

Warunki metody badawczej

- opis zastosowanego układu badawczego;

- zastosowany biomikroskop (np. model) i zastosowane ustawienia biomikroskopu;
- odniesienie do historycznych wyników kontroli ujemnej i dodatniej oraz, w stosownych przypadkach, danych historycznych wykazujących dopuszczalny zakres jednoczesnej kontroli odniesienia;
- procedura zastosowana w celu zapewnienia integralności (tj. dokładności i wiarygodności) metody badawczej w czasie (np. okresowe badanie substancji chemicznych przeznaczonych do oceny biegłości)).

Pobieranie oczu i ich przygotowywanie

- wiek i masa zwierzęcia dawcy oraz, w miarę dostępności, inne szczegółowe dane na temat zwierząt, od których pobrano oczy (np. płeć, szczep);
- warunki przechowywania i transportu oczu (np. data i czas pobrania oczu, odstęp czasu między zebraniem głów kurcząt a umieszczeniem oczu poddanych enukleacji w komorze do przepłukiwania);
- przygotowanie i umieszczenie oczu, w tym oświadczenia dotyczące ich jakości, temperatury komór na oczy oraz kryteria dotyczące wyboru oczu wykorzystywanych do badania.

Procedura badawcza

- liczba użytych kontrprób;
- nazwa wykorzystanej kontroli ujemnej i dodatniej (w stosownych przypadkach, także kontrole z zastosowaniem rozpuszczalnika i kontrole odniesienia);
- dawka badanej substancji chemicznej, zastosowanie i czas narażenia;
- punkty czasowe obserwacji (przed i po podaniu substancji chemicznej);
- opis zastosowanych kryteriów oceny i podejmowania decyzji;
- opis zastosowanych kryteriów dopuszczalności badania;
- opis wszelkich modyfikacji procedury badawczej.

Wyniki

- zestawienie tabelaryczne wyników dotyczących obrzęku i zmętnienia rogówki oraz zatrzymania fluoresceiny otrzymanych dla każdego oka, w każdym punkcie czasowym obserwacji, w tym średnie wyniki podczas każdej obserwacji wszystkich badanych oczu;
- najwyższe zaobserwowane średnie wyniki dotyczące obrzęku i zmętnienia rogówki oraz zatrzymania fluoresceiny (od dowolnego punktu czasowego), a także ich powiązana klasa ICE.
- opis wszelkich, innych zaobserwowanych skutków;
- otrzymana klasyfikacja GHS ONZ *in vitro*;
- w razie potrzeby fotografie oka;

Omówienie wyników

Wniosek

BIBLIOGRAFIA

- (1) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report – *In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives*. Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych (ICCVAM) oraz Amerykański Krajowy Program Toksykologiczny (NTP) Międzyagencyjnego Centrum Oceny Alternatywnych Metod Toksykologicznych (NICEATM). Publikacja NIH nr: 07-4517. Dostępne na stronie internetowej: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm
- (2) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Dostępne na stronie internetowej: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.

- (3) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Status of *in vitro* Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych (ICCVAM) oraz Amerykański Krajowy Program Toksykologiczny (NTP) Międzyagencyjnego Centrum Oceny Alternatywnych Metod Toksykologicznych (NICEATM). Publikacja NIH nr: 10-7553A. Dostępne na stronie internetowej: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>.
 - (4) Organizacja Narodów Zjednoczonych (ONZ) (2011). Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS), wydanie czwarte zmienione, ONZ, Nowy Jork i Genewa, 2011. Dostępne na stronie internetowej: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html
 - (5) Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Seria OECD dotycząca badań i oceny nr 188 (części 1 i 2), OECD, Paryż.
 - (6) Rozdział B.5 niniejszego załącznika, Działanie żrące / silnie drażniące na oczy.
 - (7) Scott L, Eskes C, Hoffman S, Adriaens E, Alepee N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Fallor C, Guest R, Hamernik K, Harbell J, Hartung T, Kamp H, Le Varlet B, Meloni M, Mcnamee P, Osborn R, Pape W, Pfannenbecker U, Prinsen M, Seaman C, Spielmann H, Stokes W, Trouba K, Vassallo M, Van den Berghe C, Van Goethem F, 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. *Toxicology In Vitro* 24, 1–9.
 - (8) Wytyczne OECD (2011): „The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-Severe Irritants”. Seria OECD dotycząca badań i oceny nr 160, OECD, Paryż.
 - (9) ICCVAM. (2006). Background review document: Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. Publikacja NIH nr: 06-4513. Research Triangle Park: Amerykański Krajowy Program Toksykologiczny. Dostępne na stronie internetowej: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm
 - (10) Prinsen, M.K. i Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69–76.
 - (11) DB-ALM (INVIITOX) (2009). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, 13 s. Dostępne na stronie internetowej: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>.
 - (12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. i Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871–929.
 - (13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol.* 34:291–296.
 - (14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. i Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23–37.
 - (15) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicology in Vitro* 20,78–81.
 - (16) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L. i Komitet Doradczy ds. Praktyk w zakresie Kontroli Zakażeń w Opiece Zdrowotnej (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Dostępne na stronie internetowej: <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>.
 - (17) Maurer, J.K., Parker, R.D. i 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.
 - (18) Burton, A.B.G., M. York i R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.* 19, 471–480.
-

Dodatek 1

DEFINICJE

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

Wzorcowa substancja chemiczna: substancja chemiczna używana jako wzorzec do porównań z badaną substancją chemiczną. Wzorcowa substancja chemiczna powinna mieć następujące cechy: (i) stałe i wiarygodne źródło(-a); (ii) podobieństwo strukturalne i funkcjonalne do badanej klasy substancji chemicznych; (iii) znane właściwości fizyczne i chemiczne; (iv) dane potwierdzające znane skutki; oraz (v) znaną siłę działania w zakresie pożądanym reakcji.

Podejście oddolne: stopniowe podejście stosowane w odniesieniu do substancji chemicznej, w przypadku której podejrzewa się, że nie wymaga zaklasyfikowania jako substancja powodująca podrażnienie lub poważne uszkodzenie oka; takie podejście polega na odróżnieniu substancji chemicznych niewymagających zaklasyfikowania (wynik ujemny) od pozostałych substancji chemicznych (wynik dodatni).

Substancja chemiczna: substancja albo mieszanina.

Rogówka: przezroczysta warstwa w przedniej części gałki ocznej, która okrywa tęczówkę i źrenicę oraz wpuszcza światło do wnętrza oka.

Zmętnienie rogówki: pomiar stopnia zmętnienia rogówki wskutek narażenia na badaną substancję chemiczną. Zwiększone zmętnienie rogówki wskazuje na jej uszkodzenie.

Obrzęk rogówki: obiektywny pomiar stopnia rozdęcia rogówki w następstwie narażenia na badaną substancję chemiczną w badaniu ICE. Obrzęk rogówki wyraża się procentowo i oblicza się go na podstawie wyjściowych pomiarów grubości rogówki (sprzed podania dawki) i grubości mierzonej w równych odstępach czasu po narażeniu na badaną substancję chemiczną w badaniu ICE. Stopień obrzęku rogówki wskazuje na jej uszkodzenie.

Podrażnienie oka: zmiany w oku spowodowane zaaplikowaniem badanej substancji chemicznej na wierzchnią warstwę oka, które są w pełni odwracalne w ciągu 21 dni po zaaplikowaniu. Określenie używane zamiennie z określeniem „odwracalne skutki działania na oczy” oraz ze sformułowaniem „kategoria 2 GHS ONZ” (4).

Odsetek wyników fałszywie ujemnych: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik dodatni fałszywie zidentyfikowanych po zastosowaniu metody badawczej jako dające wynik ujemny. Jest to jeden ze wskaźników efektywności metody badawczej.

Odsetek wyników fałszywie dodatnich: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik ujemny fałszywie zidentyfikowanych po zastosowaniu metody badawczej jako dające wynik dodatni. Jest to jeden ze wskaźników efektywności metody badawczej.

Zatrzymanie fluoresceiny: subiektywny pomiar ilości fluoresceiny zatrzymanej w komórkach nabłonka rogówki w następstwie narażenia na substancję badaną w badaniu ICE. Stopień zatrzymania fluoresceiny wskazuje na uszkodzenie nabłonka rogówki.

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

Nieodwracalne skutki działania na oczy: zob. „poważne uszkodzenie oczu” i „kategoria 1 wg GHS ONZ”.

Mieszanina: mieszanina lub roztwór, które składają się z co najmniej dwóch substancji niewchodzących ze sobą w reakcję (4).

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

Niesklasyfikowane: substancje chemiczne, które nie zostały zaklasyfikowane jako substancje podrażniające oczy (kategoria 2 wg GHS ONZ) ani substancje powodujące poważne uszkodzenie oczu (kategoria 1 wg GHS ONZ). Określenie używane zamiennie ze sformułowaniem „brak kategorii wg GHS ONZ”.

Kontrola dodatnia: kontrpróba zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, poddana działaniu substancji chemicznej, o której wiadomo, że wywołuje reakcję dodatnią. Aby zapewnić możliwość oceny zmienności reakcji w kontroli dodatniej w czasie, siła reakcji w postaci silnego działania drażniącego nie może być zbyt duża.

Wiarygodność: miary zakresu, w jakim metoda badawcza może być przeprowadzana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jej przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją, obliczając odtwarzalność wewnątrz- i międzylaboratoryjną oraz powtarzalność wewnątrzlaboratoryjną.

Odwracalne skutki działania na oczy: zob. „podrażnienie oka” i „kategoria 2 wg GHS ONZ”.

Poważne uszkodzenie oczu: uszkodzenie tkanki oka lub poważne fizyczne pogorszenie widzenia spowodowane zaaplikowaniem badanej substancji chemicznej na przednią powierzchnię oka, które nie są w pełni odwracalne w ciągu 21 dni po zaaplikowaniu. Określenie używane zamiennie z określeniem „nieodwracalne skutki działania na oczy” oraz ze sformułowaniem „kategoria 1 wg GHS ONZ” (4).

Biomikroskop: narzędzie używane do bezpośredniego badania oka w powiększeniu pod mikroskopem dwuokularowym poprzez uzyskanie prostego obrazu stereoskopowego. W metodzie badawczej ICE narzędzie to stosuje się do oglądania przednich struktur oka kurzego, jak również do obiektywnego pomiaru grubości rogówki za pomocą urządzenia do pomiaru grubości połączonego z mikroskopem.

Kontrola z rozpuszczalnikiem/nośnikiem: próbka niepoddana działaniu badanej substancji, zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, w tym rozpuszczalnik lub nośnik, która jest przetwarzana razem z próbkami poddanymi działaniu badanej substancji oraz z innymi próbkami kontrolnymi w celu określenia wyjściowej reakcji dla próbek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w tym samym rozpuszczalniku lub nośniku. W przypadku badania z jednoczesną kontrolą ujemną próbka ta wykazuje również, czy rozpuszczalnik lub nośnik wchodzi w reakcję z układem badawczym.

Substancja: pierwiastki chemiczne i ich związki w stanie naturalnym lub uzyskane w wyniku dowolnego procesu produkcyjnego, w tym wszelkie dodatki konieczne do zachowania trwałości produktu i wszelkie zanieczyszczenia powstałe w wyniku zastosowanego procesu, z wyłączeniem wszelkich rozpuszczalników, które można oddzielić bez wpływu na stabilność substancji i bez zmiany jej składu (4).

Środek powierzchniowo czynny: zwany także surfaktantem, jest to substancja, np. detergent, która może zmniejszać napięcie powierzchniowe cieczy, umożliwiając tym samym jej pienienie lub przenikanie w ciała stałe; substancja ta jest także zwana środkiem zwilżającym.

Podejście odgórne: stopniowe podejście stosowane w odniesieniu do substancji chemicznej, w przypadku której podejrzewa się, że powoduje poważne uszkodzenie oczu; takie podejście polega na odróżnieniu substancji chemicznych powodujących poważne uszkodzenie oczu (wynik dodatni) od pozostałych substancji chemicznych (wynik ujemny).

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

Wielopoziomowa strategia badań: strategia badań sekwencyjnych, w ramach której wszystkie istniejące informacje na temat badanej substancji chemicznej są analizowane na każdym poziomie w określonym porządku z zastosowaniem procesu uwzględniającego wagę dowodów w celu określenia, czy dostępna jest wystarczająca ilość informacji do podjęcia decyzji o klasyfikacji zagrożenia, przed przejściem do następnego poziomu. Jeżeli na podstawie dostępnych informacji można przypisać badanej substancji chemicznej potencjał w zakresie wywołania podrażnienia, dodatkowe badania nie są wymagane. Jeżeli na podstawie dostępnych informacji nie można przypisać badanej substancji chemicznej potencjału w zakresie wywołania podrażnień, przeprowadza się procedurę badań sekwencyjnych na zwierzętach do momentu, w którym będzie można dokonać jednoznacznej klasyfikacji.

Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (GHS ONZ): system, w ramach którego proponuje się klasyfikację substancji chemicznych (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz omawia się odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak: piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki substancji i produktów niebezpiecznych, aby przekazać informacje na temat ich szkodliwego działania w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) i środowiska (4).

Kategoria 1 wg GHS ONZ: zob. „poważne uszkodzenie oczu” lub „nieodwracalne skutki działania na oczy”.

Kategoria 2 wg GHS ONZ: zob. „podrażnienie oka” lub „odwracalne skutki działania na oczy”.

Brak kategorii GHS ONZ: substancje, które nie spełniają wymogów w zakresie zaklasyfikowania jako należące do kategorii 1 lub 2 (2A lub 2B) wg GHS ONZ. Określenie używane zamiennie ze sformułowaniem „niesklasyfikowane”.

Zweryfikowana metoda badawcza: metoda badawcza, w odniesieniu do której zakończono badania walidacyjne w celu określenia jej istotności (w tym dokładności) i wiarygodności w odniesieniu do konkretnego celu. Należy zauważyć, że zweryfikowana metoda badawcza może nie wykazywać dostatecznej efektywności z punktu widzenia dokładności i wiarygodności, aby można było ją uznać za dopuszczalną w odniesieniu do danego celu.

Waga dowodów: proces analizowania mocnych i słabych stron różnych informacji podczas formułowania wniosku dotyczącego potencjalnego zagrożenia stwarzanego przez daną substancję chemiczną oraz uzasadnienia takiego wniosku.

Dodatek 2

**SUBSTANCJE CHEMICZNE PRZEZNACZONE DO OCENY BIEGŁOŚCI W ODNIESIENIU DO METODY
BADAWCZEJ ICE**

Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania metody badawczej zgodnej z niniejszą metodą badawczą laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną, prawidłowo ustalając klasyfikację 13 substancji chemicznych wskazanych w tabeli 1 pod względem działania niebezpiecznego dla oczu. Wspomniane substancje chemiczne zostały dobrane w taki sposób, by reprezentowały zakres reakcji na działanie niebezpieczne dla oczu oparty na wynikach badania na oku królika *in vivo* (wytyczna TG 405) oraz na systemie klasyfikacji GHS ONZ (tj. kategorii 1, 2A, 2B lub brak kategorii zgodnie z GHS ONZ) (4) (6). Przy wyborze substancji kierowano się również następującymi kryteriami: dostępnością handlową tych substancji, dostępnością wysokiej jakości danych referencyjnych z badań *in vivo* oraz istnieniem wysokiej jakości danych uzyskanych dzięki zastosowaniu metody ICE *in vitro*. Dane referencyjne można znaleźć w SSD (5) oraz w dokumentach przeglądowych ICCVAM dla metody badawczej ICE (9).

Tabela 1

**Substancje chemiczne zalecane do wykazania biegłości technicznej w odniesieniu do metody badawczej
ICE**

Substancja chemiczna	Numer CAS	Klasa chemiczna ⁽¹⁾	Stan skupienia	Klasyfikacja <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Klasyfikacja <i>in vitro</i> ⁽³⁾
Chlorek benzalkoniowy (5 %)	8001-54-5	Związek oniowy	Ciecz	Kategoria 1	Kategoria 1
Chloroheksydyna	55-56-1	Amina, amidyna	Substancja stała	Kategoria 1	Kategoria 1
Kwas dibenzoilo-L-winowy	2743-38-6	Kwas karboksylowy, ester	Substancja stała	Kategoria 1	Kategoria 1
Imidazol	288-32-4	Związek heterocykliczny	Substancja stała	Kategoria 1	Kategoria 1
Kwas trichloroocetowy (30 %)	76-03-9	Kwas karboksylowy	Ciecz	Kategoria 1	Kategoria 1
Chlorek 2,6-dichlorobenzoilu	4659-45-4	Halogenek acylu	Ciecz	Kategoria 2A	Nie można dokonać żadnych prognoz ⁽⁴⁾
Azotan amonu	6484-52-2	Sól nieorganiczna	Substancja stała	Kategoria 2A ⁽⁵⁾	Nie można dokonać żadnych prognoz ⁽⁴⁾
2-metyloacetylooctan etylu	609-14-3	Keton, ester	Ciecz	Kategoria 2B	Nie można dokonać żadnych prognoz ⁽⁴⁾
Sulfotlenek dimetylu	67-68-5	Organiczny związek siarki	Ciecz	Brak kategorii	Brak kategorii
Glicerol	56-81-5	Alkohol	Ciecz	Brak kategorii	Brak kategorii (wynik graniczny)

Substancja chemiczna	Numer CAS	Klasa chemiczna ⁽¹⁾	Stan skupienia	Klasyfikacja <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Klasyfikacja <i>in vitro</i> ⁽³⁾
Metylocyklopentan	96-37-7	Węglowodór (cykliczny)	Ciecz	Brak kategorii	Brak kategorii
n-heksan	110-54-3	Węglowodór (acykliczny)	Ciecz	Brak kategorii	Brak kategorii
Trójoctan glicerolu	102-76-1	Lipid	Ciecz	Niesklasyfikowany	Brak kategorii

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

⁽¹⁾ Klasy chemiczne przypisano do każdej badanej substancji chemicznej, wykorzystując standardowy schemat klasyfikacji oparty o system klasyfikacji Medical Subject Headings (MeSH), opracowany przez National Library of Medicine (dostępny pod adresem <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽²⁾ Na podstawie wyników badania na oku królika *in vivo* (wytyczna OECD TG 405) i z zastosowaniem GHS ONZ (4)(6).

⁽³⁾ Na podstawie wyników badania ICE opisanych w tabeli 6.

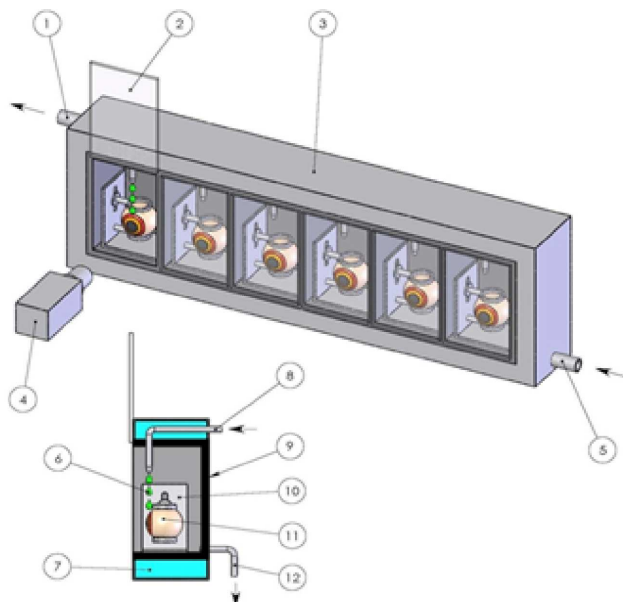
⁽⁴⁾ Połączenie wyników badania ICE innych niż wyniki opisane w tabeli 6 w celu identyfikacji braku kategorii wg GHS i kategorii 1 wg GHS (zob. tabela 6).

⁽⁵⁾ Zaklasyfikowanie do kategorii 2A lub 2B zależy od interpretacji kryterium GHS ONZ dotyczącego rozróżnienia tych dwóch kategorii, tj. 1 spośród 3 zwierząt lub 2 spośród 3 zwierząt, u których w dniu 7. odnotowano skutki niezbędne do zakwalifikowania substancji chemicznej do kategorii 2A. W badaniu *in vivo* brały udział 3 zwierzęta. Wszystkie punkty końcowe poza zaczerwienieniem spojówki u jednego zwierzęcia zupełnie ustały do dnia 7. lub wcześniej. Jedno ze zwierząt, u którego skutki działania substancji nie ustały do dnia 7., miało zaczerwienienie spojówki na poziomie 1 (w dniu 7.), które ustało w pełni w dniu 10.

Dodatek 3

SCHEMATY BUDOWY URZĄDZENIA DO PRZEPŁUKIWANIA I UCHWYTÓW NA OCZY STOSOWANYCH W BADANIU ICE

(dodatkowe, ogólne opisy urządzenia do przepłukiwania i uchwytu na oko – zob. Burton et al. (18))



CROSS SECTION COMPARTMENT

EYE HOLDER

Pozycja nr	Opis	Pozycja nr	Opis
1	Wylot ciepłej wody	9	Komora
2	Przesuwane drzwiczki	10	Uchwyt na oko
3	Urządzenie do przepłukiwania	11	Oko kurczaka
4	Miernik optyczny	12	Wylot roztworu soli
5	Wlot ciepłej wody	13	Śruba dociskowa
6	Roztwór soli	14	Regulowane ramię górne
7	Ciepła woda	15	Nieregulowane ramię dolne
8	Wlot roztworu soli		

14) w części B rozdział B.49 otrzymuje brzmienie:

„B.49 Test mikrojądrowy na komórkach ssaków *in vitro*”

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 487 (2016). Stanowi ona część cyklu metod badawczych dotyczących toksykologii genetycznej. Opracowany został dokument OECD, który zawiera zwięzłe informacje na temat badań w zakresie toksykologii genetycznej oraz przegląd ostatnich zmian, jakie wprowadzono do wytycznych dotyczących badań (1).

Test mikrojądrowy *in vitro* (MNvit) jest badaniem genotoksyczności służącym wykrywaniu mikrojąder (MN) w cytoplazmie komórek w interfazie. Mikrojądra mogą pochodzić odpowiednio z acentrycznych fragmentów chromosomów (tj. niezawierających centromeru) lub z całych chromosomów, które nie są w stanie migrować do biegunów w stadium anafazy podziału komórek. Test MNvit jest zatem metodą *in vitro*, która dostarcza kompleksowych podstaw do badania *in vitro* potencjalnego działania powodującego uszkodzenia chromosomowe, ponieważ w komórkach, w których doszło do podziału komórek podczas narażenia na działanie badanej substancji chemicznej lub po nim, można wykryć zarówno aneugeny, jak i klastogeny (2) (3) (więcej szczegółów podano w pkt 13). Mikrojądra stanowią uszkodzenie, które zostało przekazane do komórek potomnych, podczas gdy aberracje chromosomowe znalezione w komórkach w metafazie nie mogą być przekazywane. W obu przypadkach zmiany mogą nie pokrywać się z przeżywaniem komórek.

Niniejsza metoda badawcza dopuszcza stosowanie protokołów z inhibitorem polimeryzacji aktyny cytochalazyną B i bez niego. Dodatek cytochalazyny B przed mitozą skutkuje powstawaniem komórek dwujądrowych i tym samym umożliwia identyfikację i analizę mikrojąder tylko w tych komórkach, które przeszły jedną mitozę (4) (5). Niniejsza metoda badawcza pozwala również na stosowanie protokołów bez zahamowania cytokinezy, pod warunkiem że istnieją dowody na to, że badana populacja komórek przeszła mitozę.

Oprócz testu MNvit wykorzystywanego do identyfikowania substancji chemicznych, które powodują powstawanie mikrojąder, dodatkowych informacji na temat mechanizmów uszkodzania chromosomów i powstawania mikrojąder może dostarczyć również wykorzystanie immunochemicznego oznakowania kinetochorów lub hybrydyzacji z sondami centromerowymi/telomerowymi (fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH)) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Wspomniane procedury oznaczania i hybrydyzacji mogą być wykorzystywane w przypadku, gdy następuje intensyfikacja procesu powstawania mikrojąder i osoba przeprowadzająca badanie zamierza ustalić, czy intensyfikacja ta jest skutkiem jest skutkiem zdarzeń klastogennych lub aneugennych.

Ponieważ mikrojądra w komórkach w interfazie można ocenić stosunkowo obiektywnie, pracownicy laboratorium muszą jedynie ustalić liczbę komórek dwujądrowych w przypadku użycia cytochalazyny B oraz częstość występowania komórek mikrojądrowych we wszystkich przypadkach. W rezultacie można stosunkowo szybko ocenić szkiełka mikroskopowe i zautomatyzować analizę. Dzięki temu można ocenić nie setki, a tysiące komórek na jedno podanie substancji chemicznej, co zwiększa wydajność testu. Wreszcie, ponieważ mikrojądra mogą tworzyć się z chromosomów opóźnionych, istnieje możliwość wykrycia czynników wywołujących aneuploidię, które trudno badać w konwencjonalnych testach aberracji chromosomowych, np. rozdział B.10 niniejszego załącznika (18). Test MNvit opisany w niniejszej metodzie badawczej nie pozwala jednak na odróżnienie substancji chemicznych wywołujących zmiany w liczbie chromosomów lub ploidalności od substancji wywołujących klastogenną bez zastosowania specjalnych technik, takich jak badanie FISH, o którym mowa w pkt 4.

Test MNvit jest rzetelny i można go przeprowadzić na różnych rodzajach komórek oraz w obecności lub przy braku cytochalazyny B. Istnieją obszerne dane, które potwierdzają wiarygodność testu MNvit z wykorzystaniem różnych rodzajów komórek (kultury linii komórkowych lub pierwotnych hodowli komórek) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). Obejmują one w szczególności międzynarodowe badania walidacyjne koordynowane przez Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (19) (20) (21) (22) (23) i sprawozdania z International Workshop on Genotoxicity Testing (międzynarodowych warsztatów poświęconych badaniu genotoksyczności) (5) (17). Dostępne dane zostały również poddane ponownej ocenie w retrospektywnym badaniu walidacyjnym opartym na analizie wagi dowodów, przeprowadzonym przez Europejskie Centrum Uznawania Metod Alternatywnych (ECVAM) Komisji Europejskiej (KE), zaś niniejsza metoda badawcza została zatwierdzona jako potwierdzona naukowo przez Naukowy Komitet Doradczy ECVAM (ESAC) (37) (38) (39).

W teście MNvit na komórkach ssaków można wykorzystać kultury linii komórkowych lub pierwotne hodowle komórek pochodzących od człowieka lub od gryzoni. Ponieważ podstawowa częstość występowania mikrojąder będzie miała wpływ na czułość badania, zaleca się wykorzystywanie rodzajów komórek o stałej i określonej częstości powstawania mikrojąder. Wykorzystywane komórki dobiera się na podstawie ich zdolności do wzrostu w kulturach, stabilności kariotypu (w tym liczby chromosomów) oraz spontanicznych częstości występowania mikrojąder (40). W chwili obecnej dostępne dane nie pozwalają na opracowanie konkretnych zaleceń, ale wynika z nich, że istotne jest, aby podczas oceny zagrożeń stwarzanych przez substancje chemiczne wziąć pod uwagę status białka p53, stabilność genetyczną (kariotypową), zdolność do naprawy DNA oraz pochodzenie (od gryzoni lub od człowieka) komórek wybranych do badania. Zachęca się zatem użytkowników niniejszej metody badawczej do uwzględniania wpływu tych oraz innych właściwości komórek na zachowanie linii komórkowej przy wykrywaniu indukcji mikrojąder w miarę rozwoju wiedzy w tej dziedzinie.

Stosowane definicje znajdują się w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

Badania przeprowadzane *in vitro* wymagają zazwyczaj wykorzystania egzogennej źródła aktywacji metabolicznej, chyba że komórki są metabolicznie wydolne w odniesieniu do badanych substancji chemicznych. Egzogenne układy metabolizujące nie jest w stanie całkowicie naśladować warunków *in vivo*. Należy zachować ostrożność, aby uniknąć wystąpienia warunków, które mogą doprowadzić do zniekształconych wyników dodatnich, które nie odzwierciedlają genotoksyczności badanych substancji chemicznych. Do takich warunków zalicza się zmiany pH (41) (42) (43) lub osmolalność, interakcje z podłożem do hodowli komórkowych (44) (45) bądź zbyt wysokie poziomy cytotoksyczności (zob. pkt 29).

Dla celów analizy indukcji mikrojąder istotne jest, aby mitozę zachodziła zarówno w kulturach poddanych działaniu badanej substancji, jak i w kulturach niepoddanych takiemu działaniu. Najpełniejsze informacje w zakresie zliczania mikrojąder można uzyskać na podstawie komórek, które przeszły jedną mitozę w trakcie poddawania ich działaniu badanej substancji chemicznej lub po nim. W przypadku wytworzonych nanomateriałów konieczne jest specjalne dostosowanie niniejszej metody badawczej, nie zostało to jednak opisane w niniejszej metodzie badawczej.

Przed zastosowaniem niniejszej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się nad tym, czy zastosowanie niniejszej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak – dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny.

ZASADA BADANIA

Kultury komórkowe pochodzące od ludzi lub od innych ssaków poddaje się działaniu badanej substancji chemicznej zarówno z zastosowaniem egzogennej źródła aktywacji metabolicznej, jak i bez takiego źródła, pod warunkiem że nie wykorzystuje się komórek o odpowiednich zdolnościach metabolicznych (zob. pkt 19).

Komórki są hodowane w trakcie narażenia na działanie badanej substancji chemicznej lub po zakończeniu takiego narażenia przez okres wystarczający do uszkodzenia chromosomów lub wystąpienia innego wpływu na cykl komórkowy lub podział komórek, tak aby doprowadzić do powstawania mikrojąder w komórkach w interfazie. Do celów indukcji aneuploidii badana substancja chemiczna powinna być co do zasady obecna w trakcie mitozy. Zebrane i zabarwione komórki w interfazie są analizowane pod kątem obecności mikrojąder. W warunkach idealnych mikrojądra powinny być zliczane tylko w tych komórkach, które przeszły mitozę podczas narażenia na badaną substancję chemiczną lub w okresie po poddaniu ich działaniu tej substancji, jeżeli taki okres jest stosowany. W kulturach, którym podano inhibitor cytokinezy, można to łatwo osiągnąć poprzez liczenie jedynie komórek dwujądrowych. W przypadku braku inhibitora cytokinezy ważne jest, aby wykazać, że w poddanych analizie komórkach prawdopodobnie doszło do podziału komórek, co wynika ze zwiększenia liczebności populacji komórek, podczas narażenia na działanie badanej substancji chemicznej lub po nim. Dla wszystkich protokołów ważne jest, aby wykazać, że proliferacja komórek zaszła zarówno w hodowlach kontrolnych, jak i w hodowlach poddanych działaniu substancji, a także należy oszacować zakres cytotoksyczności wywołanej przez badaną substancję chemiczną lub cytostazy we wszystkich kulturach, które analizuje się pod kątem występowania mikrojąder.

OPIS METODY

Komórki

Można wykorzystać pierwotne hodowle limfocytów krwi obwodowej pochodzących od ludzi lub od innych ssaków (7) (20) (46) (47) oraz szereg linii komórkowych pochodzących od gryzoni, takich jak CHO, V79, CHL/IU i L5178Y, lub linie komórkowe pochodzące od ludzi, np. (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (zob. pkt 6). Do celów testów mikrojądrowych wykorzystywano również inne linie komórkowe, takie jak HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50) (51), komórki HepG2 (52) (53), A549 oraz pierwotne komórki zarodka chomika syryjskiego (54), jednak na chwilę obecną nie zostały one poddane walidacji w szerszym zakresie. Stosowanie tych linii komórkowych i rodzajów komórek powinno być zatem uzasadnione na podstawie ich wykazanej efektywności w badaniu, jak opisano w sekcji poświęconej kryteriom dopuszczalności. Jak donoszono, cytochalazyna B może potencjalnie wpływać na wzrost komórek L5178Y, dlatego też nie zaleca się jej stosowania z tą linią komórkową (23). Jeżeli stosowane są komórki pierwotne, ze względu na dobrostan zwierząt należy rozważyć użycie komórek pochodzących od ludzi, jeżeli jest to możliwe; należy je pobrać w zgodzie z zasadami etycznymi i przepisami mającymi zastosowanie do ludzi.

Ludzkie limfocyty krwi obwodowej należy pozyskiwać od młodych (w wieku około 18–35 lat) niepalących osób, u których nie stwierdzono żadnych schorzeń oraz które nie były narażone w ostatnim czasie na czynniki genotoksyczne (tj. substancje chemiczne, promieniowanie jonizujące) w stopniu, który mógłby zwiększyć podstawową częstość występowania komórek mikrojądrowych. Zagwarantuje to niską i stałą podstawową częstość występowania komórek mikrojądrowych. Wyjściowa częstość występowania komórek mikrojądrowych wzrasta wraz z wiekiem, a tendencja ta jest bardziej widoczna u kobiet niż u mężczyzn (55). Jeżeli dla celów stosowania łączy się komórki pochodzące od większej liczby dawców niż jeden, należy wskazać liczbę dawców. Należy wykazać, że komórki uległy podziałowi w okresie od rozpoczęcia poddawania ich działaniu badanej substancji chemicznej do momentu pobrania próbek. Kultury komórkowe utrzymuje się w fazie wzrostu wykładniczego (linie komórkowe) bądź stymuluje się ich podział (pierwotne kultury limfocytów) celem narażenia komórek na działanie badanej substancji chemicznej w różnych stadiach cyklu komórkowego, ponieważ czułość stadiów komórek na badaną substancję chemiczną może być nieznana. Komórki pierwotne, które wymagają stymulacji mitogenami, aby się podzielić, zasadniczo nie podlegają synchronizacji podczas narażenia na działanie badanej substancji chemicznej (np. limfocyty ludzkie po 48-godzinnej stymulacji mitogenami). Wykorzystywanie zsynchronizowanych komórek podczas podawania badanej substancji chemicznej nie jest zalecane, ale może zostać zaakceptowane w uzasadnionych przypadkach.

Podłoża i warunki hodowli

W celu utrzymania kultur należy zastosować odpowiednie podłoże oraz warunki inkubacji (naczynia do hodowli komórkowych, wilgotne środowisko o zawartości CO₂ 5 %, w stosownych przypadkach, oraz temperatura w wysokości 37 °C). Linie komórkowe powinny być rutynowo sprawdzane pod kątem stabilności zmiennej liczby chromosomów oraz nieobecności zanieczyszczenia mykoplazmą, a komórki nie powinny być wykorzystywane, jeżeli są zanieczyszczone lub w przypadku, gdy zmienna liczba chromosomów uległa zmianie. Należy ustalić normalny czas trwania cyklu komórkowego linii komórkowych lub pierwotnych kultur wykorzystywanych w laboratorium badawczym, który powinien być zgodny z opublikowanymi właściwościami komórek (20).

Przygotowanie kultur

Linie komórkowe: komórki są rozmnażane z kultur wyjściowych i wysiewane na podłoże w takiej gęstości, by komórki w zawieszynie lub w jednowarstwowej hodowli komórek mogły nadal rosnąć wykładniczo aż do czasu pobrania (np. należy unikać konfluencji w przypadku komórek rosnących w jednowarstwowej hodowli komórek).

Limfocyty: krew pełną z antykoagulantem (np. heparyną) lub oddzielone limfocyty hoduje się (np. przez 48 godzin dla limfocytów ludzkich) w obecności mitogenu (np. fitohemaglutyniny (PHA) dla limfocytów ludzkich) w celu indukcji podziału komórek przed ich narażeniem na działanie badanej substancji chemicznej oraz cytochalazyny B.

Aktywacja metaboliczna

Egzogenne układy metabolizujące należy stosować w przypadku, gdy stosuje się komórki o nieodpowiedniej endogennej wydolności metabolicznej. Najpowszechniej stosowanym układem, który jest domyślnie zalecany, jeżeli nie jest uzasadnione zastosowanie innego systemu, jest frakcja postmitochondrialna suplementowanego kofaktora (S9) przygotowywana z wątroby gryzoni (najczęściej szczurów) otrzymujących czynniki pobudzające enzymy takie jak Aroclor 1254 (56) (57) lub kombinację fenobarbitalu i b-naftoflawonu (58) (59) (60). Ta ostatnia kombinacja nie pozostaje w sprzeczności z Konwencją sztokholmską w sprawie trwałych zanieczyszczeń organicznych (61) i okazała się równie skuteczna jak Aroclor 1254 w wywoływaniu oksydaz wieloczynnościowych (58) (59) (60). Frakcja S9 jest zazwyczaj wykorzystywana w stężeniach w zakresie 1–2 % (objętościowo), ale stężenie to może być zwiększone do 10 % (obj.) w końcowym podłożu użytym do badania. Podczas poddawania zwierzęcia czynnikom należy unikać stosowania produktów, które zmniejszają indeks mitotyczny, a zwłaszcza czynników wiążących wapń (62). Klasa badanych substancji chemicznej może mieć wpływ na wybór rodzaju i stężenia egzogenego układu metabolizującego lub czynnika pobudzającego metabolizm.

Przygotowanie badanej substancji chemicznej

Badane substancje chemiczne w stanie stałym należy rozpuścić w odpowiednich rozpuszczalnikach oraz rozcieńczyć, w stosownych przypadkach, przed poddaniem komórek ich działaniu. Ciekłe substancje chemiczne można dodać do układu badawczego bezpośrednio lub rozcieńczyć przed podaniem do układu badawczego. Gazowe lub lotne substancje chemiczne należy badać za pomocą odpowiednich modyfikacji standardowych protokołów, takich jak poddawanie komórek działaniu substancji badanej w szczelnie zamkniętych naczyniach (63) (64) (65). Preparaty badanej substancji chemicznej należy przygotowywać tuż przed poddaniem komórek jej działaniu, chyba że dane dotyczące stabilności wskazują, iż dopuszczalne jest składowanie substancji.

Warunki badania

Rozpuszczalniki

Rozpuszczalnik należy wybrać tak, aby zoptymalizować rozpuszczalność badanych substancji chemicznych, unikając niepożądanego wpływu na przeprowadzenie badania, tj. zmiany wzrostu komórek, wpływu na spójność badanej substancji chemicznej, reakcji z naczyniami do hodowli komórkowych czy zakłócenia układu metabolizującego. Zaleca się, aby w miarę możliwości w pierwszej kolejności rozważyć zastosowanie wodnego rozpuszczalnika (lub podłoża). Sprawdzone rozpuszczalnikami są woda lub sulfotlenek dimetylu (DMSO). Zasadniczo zawartość rozpuszczalników organicznych nie powinna przekraczać 1 % (obj.). Jeżeli cytochalazyna B jest rozpuszczona w sulfotlenku dimetylu, całkowita ilość rozpuszczalnika organicznego używanego zarówno dla badanej substancji chemicznej, jak i cytochalazyny B nie powinna przekraczać 1 % (obj.); w przeciwnym razie należy zastosować próby kontrolne niepoddane działaniu substancji, aby upewnić się, że zawartość procentowa rozpuszczalnika organicznego nie wykazuje szkodliwego działania. Zawartość rozpuszczalników wodnych (soli fizjologicznej lub wody) w końcowym podłożu użytym do badania nie powinna przekroczyć 10 % (obj.). Jeżeli używane są inne rozpuszczalniki niż sprawdzone rozpuszczalniki (np. etanol czy aceton), ich użycie powinno być uzasadnione danymi, które potwierdzają ich zgodność z badaną substancją chemiczną, układem badawczym oraz brak toksyczności genetycznej w zastosowanym stężeniu. W razie braku takich danych potwierdzających należy uwzględnić próby kontrolne niepoddawane działaniu substancji (zob. dodatek 1) oraz próby kontrolne z rozpuszczalnikiem w celu wykazania, że wybrany rozpuszczalnik nie wywołuje skutków szkodliwych lub wpływających na chromosomy (np. aneuploidia lub klastogenność).

Wykorzystanie cytochalazyny B jako inhibitora cytokinezy

Jedną z najistotniejszych kwestii przy przeprowadzaniu testu MNvit jest zapewnienie, aby zliczane komórki przeszły mitozę podczas poddawania działaniu badanej substancji chemicznej lub w okresie po poddaniu, jeżeli jest stosowany. Z tego względu liczenie mikrojąder należy ograniczyć do komórek, które przeszły mitozę w trakcie ich poddawania działaniu badanej substancji chemicznej lub po nim. Cytochalazyna B to czynnik, który jest najpowszechniej stosowany do celów inhibicji cytokinezy, ponieważ hamuje on polimeryzację aktyny, a tym samym zapobiega oddzielaniu komórek potomnych po mitozie, doprowadzając do powstawania komórek dwujądrowych (6) (66) (67). W przypadku stosowania cytochalazyny B wpływ badanej substancji chemicznej na kinetykę proliferacji komórek można mierzyć jednocześnie. Cytochalazyna B powinna być wykorzystywana jako inhibitor cytokinezy w przypadku stosowania ludzkich limfocytów, ponieważ czas trwania cyklu komórkowego będzie różny dla różnych dawców oraz ze względu na to, że nie wszystkie limfocyty będą reagować na stymulację PHA. Wykorzystanie cytochalazyny B nie jest obowiązkowe dla innych rodzajów komórek, jeżeli można stwierdzić, że przeszły one podział, jak opisano w pkt 27. Ponadto cytochalazyna B nie jest zasadniczo stosowana, jeżeli próbki są oceniane pod względem mikrojąder z wykorzystaniem metody cytometrii przepływowej.

Laboratorium powinno ustalić odpowiednie stężenie cytochalazyny B dla każdego rodzaju komórek w celu uzyskania optymalnej częstości występowania komórek dwujądrowych w kulturach kontrolnych z rozpuszczalnikiem oraz wykazać, że to stężenie doprowadzi do produkcji wystarczającej liczby komórek dwujądrowych dla celów oceny. Odpowiednie stężenie cytochalazyny B zwykle wynosi 3–6 µg/ml (19).

Pomiar proliferacji komórek i cytotoksyczności oraz wybór badanych stężeń

Przy ustalaniu najwyższego stężenia badanej substancji chemicznej należy unikać stężeń, które mogą dawać zniekształcone wyniki dodatnie, np. stężeń powodujących nadmierną cytotoksyczność (zob. pkt 29), strącanie substancji w podłożu (zob. pkt 30) i znaczne zmiany pH lub osmolalności (zob. pkt 9). Jeżeli badana substancja chemiczna powoduje znaczną zmianę pH podłoża w momencie dodania, pH może zostać dopasowane poprzez buforowanie końcowego podłoża użytego do badania, aby uniknąć zniekształconych wyników dodatnich i utrzymać odpowiednie warunki hodowli.

Dokonyje się pomiaru proliferacji komórek, aby upewnić się, że odpowiednia liczba komórek poddanych działaniu substancji przeszła mitozę podczas testu oraz że substancja chemiczna jest podawana przy odpowiednim poziomie cytotoksyczności (zob. pkt 29). Cytotoksyczność powinna zostać określona w ramach głównego doświadczenia z użyciem aktywacji metabolicznej lub bez niej, przy wykorzystaniu odpowiedniego wskazania dotyczącego śmierci i wzrostu komórek (zob. pkt 26 i 27). Chociaż ocena cytotoksyczności w badaniu wstępnym może być przydatna w lepszym określeniu stężeń, które mają zostać użyte w głównym doświadczeniu, badanie wstępne nie jest obowiązkowe. Jeżeli taka ocena zostanie przeprowadzona, nie może ona zastąpić pomiaru cytotoksyczności w głównym doświadczeniu.

Podawanie hodowiom cytochalazyny B i pomiar względnych częstości występowania komórek jednojądrowych, dwujądrowych i wielojądrowych w hodowli stanowi precyzyjną metodę ilościowego określania wpływu na proliferację komórek oraz działania cytotoksycznego lub cytostatycznego badanej substancji (6) oraz zapewnia mikroskopowe liczenie jedynie tych komórek, które podzieliły się podczas podawania substancji lub po jej podaniu. W celu oszacowania działania cytotoksycznego lub cytostatycznego badanej substancji przez porównanie wartości w kulturach poddanych działaniu substancji oraz w kulturach kontrolnych należy zastosować wskaźnik proliferacji blokera cytokinezy (CBPI) (6) (27) (68) lub wskaźnik replikacji (RI) oparte na co najmniej 500 komórkach na kulturę (zob. wzory w dodatku 2). Ocena innych wskaźników cytotoksyczności (np. integralność komórki, apoptoza, martwica, liczenie w stadium metafazy, cykl komórkowy) może dostarczyć użytecznych informacji, ale nie powinna być stosowana zamiast CBPI czy RI.

W badaniach przeprowadzonych bez udziału cytochalazyny B należy wykazać, że komórki w kulturze uległy podziałowi, tak aby znaczny odsetek zliczanych komórek uległ podziałowi w trakcie poddania działaniu badanej substancji chemicznej lub po nim; w przeciwnym razie można uzyskać wyniki fałszywie ujemne. Zaleca się pomiar względnego podwojenia populacji (RPD) oraz względnego wzrostu liczby komórek (RICC) celem oszacowania cytotoksycznego lub cytostatycznego działania badanej substancji (17) (68) (69) (70) (71) (zob. wzory w dodatku 2). W przypadku rozszerzonych okresów pobierania próbek (tj. poddawanie komórek działaniu substancji chemicznej przez 1,5–2-krotność normalnego czasu trwania cyklu komórkowego, przez co okresy pobierania próbek trwają ogółem dłużej niż 3–4-krotność normalnego czasu trwania cyklu komórkowego, jak opisano w pkt 38 i 39) RPD może spowodować niedoszacowanie cytotoksyczności (71). W takich warunkach RICC może być lepszą miarą; pomocne oszacowanie może również zapewnić ocena cytotoksyczności po upływie 1,5–2-krotności czasu trwania cyklu komórkowego. Ocena innych wskaźników cytotoksyczności lub cytostazy (np. integralności komórki, apoptozy, martwicy, liczenia w stadium metafazy, wskaźnika proliferacji (PI), cyklu komórkowego, mostków nukleoplazmatycznych lub „pączków” jądrowych) może dostarczyć użytecznych dodatkowych informacji, ale nie powinna być stosowana zamiast RPD czy RICC.

Należy ocenić co najmniej trzy badane stężenia (poza kontrolami z rozpuszczalnikiem i kontrolami dodatnimi), które spełniają kryteria dopuszczalności (odpowiednia cytotoksyczność, liczba komórek itp.). Bez względu na rodzaj komórek (linie komórkowe bądź pierwotne kultury limfocytów) przy każdym badanym stężeniu można stosować zarówno zduplikowane, jak i pojedyncze kultury poddane działaniu substancji. Mimo że zalecane jest stosowanie zduplikowanych kultur, dopuszczalne jest również stosowanie pojedynczych kultur, pod warunkiem że policzono taką samą całkowitą liczbę komórek w przypadkach zarówno kultur pojedynczych, jak i zduplikowanych. Zastosowanie pojedynczych kultur jest szczególnie uzasadnione, jeżeli ocenie poddaje się więcej niż 3 stężenia (zob. pkt 44–45). Wyniki uzyskane na podstawie niezależnych zduplikowanych kultur przy danym stężeniu można łączyć na potrzeby analizy danych. W przypadku badanych substancji chemicznych wykazujących niewielką cytotoksyczność lub niewykazujących żadnej cytotoksyczności na ogół odpowiednie będzie zastosowanie 2–3-krotnych przedziałów stężenia. W przypadku wystąpienia cytotoksyczności wybrane badane stężenia powinny obejmować zakres rozpoczynający od stężenia, które wykazuje cytotoksyczność, jak opisano w pkt 29, oraz uwzględniający stężenia, w których wystąpiła umiarkowana i niewielka cytotoksyczność lub nie wystąpiła żadna cytotoksyczność. Wiele badanych substancji chemicznych wykazuje gwałtowny wzrost krzywych stężenie-odpowiedź, w związku z czym aby uzyskać dane przy niskiej i umiarkowanej cytotoksyczności lub aby szczegółowo zbadać zależność dawka-odpowiedź, konieczne będzie zastosowanie stężeń o bardziej zbliżonych wartościach lub więcej niż trzech stężeń (kultury pojedyncze lub zduplikowane), w szczególności w sytuacjach, w których wymagane jest powtórzenie doświadczenia (zob. pkt 60).

Jeżeli maksymalne stężenie opiera się na cytotoksyczności, najwyższe stężenie powinno dążyć do osiągnięcia cytotoksyczności na poziomie $55 \pm 5\%$ przy wykorzystaniu zalecanych parametrów cytotoksyczności (tj. zmniejszenie RICC i RPD dla linii komórkowych, jeżeli nie jest stosowana cytochalazyna B, i zmniejszenie CBPI lub RI, jeżeli cytochalazyna B jest stosowana w przypadku $45 \pm 5\%$ jednoczesnych kontroli ujemnych) (72). Należy zachować ostrożność w interpretowaniu wyników dodatnich, które wystąpiły wyłącznie w górnym przedziale tego zakresu cytotoksyczności $55 \pm 5\%$ (71).

Dla słabo rozpuszczalnych badanych substancji chemicznych, które nie wykazują cytotoksyczności w stężeniach niższych od najniższego stężenia nierozpuszczalnego, najwyższe badane stężenie powinno spowodować mętność lub osad widoczny gołym okiem lub przez mikroskop odwrócony pod koniec podawania badanej substancji chemicznej. Nawet jeżeli cytotoksyczność wystąpi dla stężeń powyżej najniższego stężenia nierozpuszczalnego, zaleca się przeprowadzenie testu tylko dla jednego stężenia powodującego mętność bądź wytrącenie się widocznego osadu, ponieważ osad może spowodować pojawienie się wyników zniekształconych. W przypadku stężenia powodującego powstanie osadu należy zadbać o to, aby pojawienie się osadu nie zakłóciło przebiegu testu (np. barwienia lub oceny). Pomocne może się okazać określenie rozpuszczalności podłoża przed wykonaniem doświadczenia.

Jeżeli nie zaobserwowano żadnego osadu ani ograniczenia cytotoksyczności, najwyższe badane stężenie powinno odpowiadać 10 mM, 2 mg/ml lub 2 µl/ml w zależności od tego, która z tych wartości jest najniższa (73) (74) (75). Jeżeli badana substancja chemiczna nie ma określonego składu, np. substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne (UVCB) (76), wyciągi pochodzące ze środowiska itp., może być konieczne podwyższenie (np. do 5 mg/ml) najwyższego stężenia w przypadku braku dostatecznej cytotoksyczności, tak aby zwiększyć stężenie każdego ze składników. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że wymagania te mogą się różnić w przypadku produktów leczniczych przeznaczonych dla ludzi (93).

Kontrole

Dla każdego czasu pobrania należy włączyć jednoczesną kontrolę ujemną (zob. pkt 21) obejmującą sam rozpuszczalnik w podłożu użytym do badania; w ramach tej kontroli test przeprowadza się w identyczny sposób jak w przypadku kultur poddanych działaniu substancji.

Jednoczesna kontrola dodatnia jest konieczna, aby wykazać zdolność laboratorium do zidentyfikowania klastogenów i aneugenów w warunkach określonych w stosowanym protokole badania oraz skuteczność egzogenego układu metabolizującego (w stosownych przypadkach). Przykładowe substancje służące do kontroli dodatniej są przedstawione poniżej w tabeli 1. W uzasadnionych przypadkach dopuszcza się zastosowanie alternatywnych substancji chemicznych służących do kontroli dodatniej.

W chwili obecnej nie są znane aneugeny wymagające aktywacji metabolicznej w celu wykazania działania genotoksycznego (17). Ponieważ testy na komórkach ssaków *in vitro* pod kątem toksyczności genetycznej są w dostatecznym stopniu ustandaryzowane, jeżeli chodzi o krótkoterminowe poddanie działaniu substancji chemicznej przeprowadzane jednocześnie z aktywacją metaboliczną i bez niej, zastosowanie kontroli dodatniej można ograniczyć do klastogenu wymagającego aktywacji metabolicznej. W tym przypadku pojedyncza reakcja klastogenna w ramach kontroli dodatniej wykaże zarówno aktywność układu metabolizującego, jak i reaktywność układu badawczego. W przypadku długoterminowego poddawania działaniu substancji chemicznej (bez S9) należy zastosować jednak oddzielną kontrolę dodatnią, ponieważ czas podawania badanej substancji chemicznej będzie się różnił od czasu w badaniu z wykorzystaniem aktywacji metabolicznej. Jeżeli klastogen został wybrany jako pojedyncza kontrola dodatnia dla krótkoterminowego poddawania działaniu badanej substancji chemicznej z aktywacją metaboliczną i bez niej, w przypadku poddawania długoterminowego bez aktywacji metabolicznej należy wybrać aneugen. W przypadku komórek wydolnych metabolicznie niewymagających użycia S9 należy zastosować kontrolę dodatnią zarówno pod kątem klastogenności, jak i aneugenności.

Każdą kontrolę dodatnią należy zastosować przy co najmniej jednym stężeniu, od którego oczekuje się wytworzenia odtwarzalnego oraz wykrywalnego wzrostu wykraczającego poza poziom wyjściowy, w celu wykazania czułości układu badawczego (tj. efekty są jasne, ale nie ujawniają badającemu bezpośrednio tożsamości zakodowanych szkiełek mikroskopowych), a reakcja nie powinna być zakłócona cytotoxycznoscia wykraczającą poza limity określone w niniejszej metodzie badawczej.

Tabela 1

Chemiczne substancje odniesienia zalecane do oceny biegłości laboratorium oraz do wyboru substancji do kontroli dodatniej

Kategoria	Substancja chemiczna	Numer CAS
1. Klastogeny aktywne bez aktywacji metabolicznej		
	Metanosulfonian metylu	66-27-3
	Mitomycyna C	50-07-7
	N-tlenek 4-nitrochinoliny	56-57-5
	Arabinozyd cytozyny	147-94-4
2. Klastogeny wymagające aktywacji metabolicznej		
	Benzo[a]piren	50-32-8
	Cyklofosfamid	50-18-0

Kategoria	Substancja chemiczna	Numer CAS
3. Aneugeny		
	Kolchicyna	64-86-8
	Winblastyna	143-67-9

PROCEDURA

Harmonogram podawania substancji chemicznej

Aby zmaksymalizować prawdopodobieństwo wykrycia aneugenu lub klastogenu oddziałującego na określonych etapach cyklu komórkowego, konieczne jest poddanie wystarczającej liczby komórek działaniu badanej substancji chemicznej na wszystkich poszczególnych etapach ich cykli komórkowych. Każde poddanie działaniu substancji chemicznej powinno rozpocząć się i zakończyć w momencie, w którym komórki rosną wykładniczo; komórki powinny nadal rosnąć aż do czasu pobrania próbek. Harmonogram podawania substancji chemicznej dla linii komórkowych i pierwotnych hodowli komórek może zatem różnić się nieco od harmonogramu stosowanego w przypadku limfocytów, które wymagają stymulacji mitogenami, aby rozpocząć swój cykl komórkowy (17). W przypadku limfocytów najefektywniejszym podejściem jest rozpoczęcie poddawania działaniu badanej substancji chemicznej po upływie 44–48 godzin od stymulacji PHA, kiedy to komórki będą się dzielić asynchronicznie (6).

Opublikowane dane (19) wskazują, że większość aneugenów i klastogenów jest wykrywana w okresie krótkoterminowego poddawania działaniu substancji chemicznej wynoszącym 3–6 godzin w obecności i w braku frakcji S9, po którym następuje usunięcie badanej substancji chemicznej i pobranie próbek w czasie równoważnym około 1,5–2-krotności normalnego czasu trwania cyklu komórkowego po rozpoczęciu poddawania działaniu substancji (7).

W celu gruntownej oceny, która jest niezbędna do potwierdzenia wyniku ujemnego, należy jednak przeprowadzić doświadczenie we wszystkich trzech następujących warunkach doświadczalnych z zastosowaniem krótkoterminowego poddawania działaniu substancji chemicznej z aktywacją metaboliczną i bez niej oraz długoterminowego poddawania działaniu substancji bez aktywacji metabolicznej (zob. pkt 56, 57 i 58):

- komórki należy poddawać działaniu badanej substancji chemicznej bez aktywacji metabolicznej przez 3–6 godzin, a następnie należy pobrać próbki w czasie równoważnym około 1,5–2-krotności normalnego czasu trwania cyklu komórkowego po rozpoczęciu poddawania działaniu substancji (19);
- komórki należy poddawać działaniu badanej substancji chemicznej z użyciem aktywacji metabolicznej przez 3–6 godzin, a następnie należy pobrać próbki w czasie równoważnym około 1,5–2-krotności normalnego czasu trwania cyklu komórkowego po rozpoczęciu poddawania działaniu substancji (19);
- komórki powinny być nieprzerwanie poddawane działaniu badanej substancji chemicznej bez aktywacji metabolicznej aż do pobrania próbek w czasie równoważnym około 1,5–2-krotności normalnego czasu trwania cyklu komórkowego.

Jeżeli którekolwiek z powyższych warunków doświadczalnych wywołały reakcję dodatnią, badanie któregośkolwiek z pozostałych schematów poddawania działaniu substancji chemicznej może okazać się zbędne.

Jeżeli wiadomo lub podejrzewa się, że badana substancja chemiczna wpływa na czas cyklu komórkowego (np. podczas badania analogów nukleozydowych), zwłaszcza w odniesieniu do komórek posiadających białko p53 (35) (36) (77), można wydłużyć czas pobierania próbek lub ustania działania substancji maksymalnie o kolejną 1,5–2-krotność normalnego czasu trwania cyklu komórkowego (tj. ogółem 3–4-krotność normalnego czasu trwania cyklu komórkowego od rozpoczęcia krótko- i długoterminowego poddawania działaniu substancji chemicznej). Z tych opcji można korzystać w sytuacjach, w których może istnieć obawa co do możliwych interakcji między badaną substancją chemiczną a cytochalazyną B. Podczas stosowania wydłużonych okresów pobierania próbek (tj. całkowity czas hodowli wynoszący 3–4-krotność czasu trwania cyklu komórkowego) należy zadbać, aby komórki wciąż aktywnie się dzieliły. Przykładowo wzrost wykładniczy limfocytów może spadać po 96 godzinach od stymulacji, a jednowarstwowe hodowle komórek mogą się zlać.

Zalecane harmonogramy podawania substancji chemicznej zestawiono w tabeli 2. Te ogólne harmonogramy podawania substancji chemicznej można modyfikować (i należy podać uzasadnienie) w zależności od stabilności lub reaktywności badanej substancji chemicznej lub określonych właściwości wzrostowych stosowanych komórek.

Tabela 2

Czas poddawania komórek działaniu substancji chemicznej i czas pobrania w przypadku testu MNvit

Limfocyty, komórki pierwotne i linie komórkowe <u>poddawane działaniu substancji</u> w obecności cytochalazyny B	+ S9 Krótkie poddawanie	Poddawać działaniu przez 3–6 godzin w obecności S9; usunąć S9 oraz podłoże użyte do badania; dodać świeże podłoże i cytochalazynę B; pobierać przez 1,5–2-krotność normalnego czasu trwania cyklu komórkowego po rozpoczęciu poddawania działaniu substancji.
	– S9 Krótkie poddawanie	Poddawać działaniu substancji przez 3–6 godzin; usunąć podłoże użyte do badania; dodać świeże podłoże i cytochalazynę B; pobierać przez 1,5–2-krotność normalnego czasu trwania cyklu komórkowego po rozpoczęciu poddawania działaniu substancji.
	– S9 Wydłużone poddawanie	Poddawać działaniu substancji przez 1,5–2-krotność normalnego czasu trwania cyklu komórkowego w obecności cytochalazyny B; pobierać po zakończeniu okresu poddawania działaniu substancji.

Linie komórkowe poddawane działaniu substancji bez cytochalazyny B (identyczne z przedstawionymi powyżej harmonogramami podawania substancji chemicznej, z tym że nie dodaje się cytochalazyny B)

W przypadku jednowarstwowych hodowli komórek po zakończeniu 3–6 godzin poddawania działaniu substancji mogą być obecne komórki mitotyczne (można je rozpoznać po okrągłym kształcie i fakcie, że oddzielają się od powierzchni). Z uwagi na łatwość oddzielania się komórek mitotycznych można je utracić w momencie usuwania podłoża zawierającego badaną substancję chemiczną. Jeżeli istnieją dowody na znaczny wzrost liczby komórek mitotycznych w porównaniu z próbami kontrolnymi, co wskazuje na prawdopodobieństwo zatrzymania mitozy, należy zebrać komórki poprzez odwirowanie i dodać je z powrotem do hodowli, aby uniknąć utraty w trakcie czasu poboru komórek w fazie mitozy zagrożonych aberracjami mikrojądrowymi i chromosomowymi.

Pobieranie komórek i przygotowywanie preparatów

Każdą kulturę należy pobrać oddzielnie i oddzielnie poddać działaniu substancji. Przygotowanie komórek może obejmować hipotoniczne przetwarzanie komórek, ale etap ten nie jest konieczny, jeżeli w inny sposób osiągnięto odpowiednie rozprowadzenie komórek. Można stosować różne techniki przygotowywania preparatów, pod warunkiem że uzyskuje się wysokiej jakości preparaty komórkowe do celów liczenia. Komórki z nienaruszoną błoną komórkową i nienaruszoną cytoplazmą należy zatrzymać, aby umożliwić wykrycie mikrojąder oraz (w metodzie z wykorzystaniem blokera cytokinezy) wiarygodne zidentyfikowanie komórek dwujądrowych.

Preparaty można barwić przy użyciu różnych metod, takich jak metoda Giemsa lub fluorescencyjne barwniki specyficzne dla DNA. Wykorzystanie odpowiednich barwników fluorescencyjnych (np. oranżu akrydyny (78) lub Hoechst 33258 oraz pyroniny-Y (79)) może wyeliminować niektóre spośród artefaktów związanych ze stosowaniem barwnika niebędącego barwnikiem specyficznym dla DNA. Jeżeli informacje mechanistyczne dotyczące powstawania mikrojąder są przedmiotem zainteresowania, w celu określenia zawartości mikrojądra (całe chromosomy zostaną wybarwione, natomiast acentryczne fragmenty chromosomów nie zostaną wybarwione) można zastosować przeciwciała antykinetochorowe, FISH z sondami molekularnymi specyficznymi dla pancertromerów lub syntezę *in situ* przy udziale startera ze starterami specyficznymi dla pancertromerów, wraz z odpowiednim barwieniem kontrastowym DNA (16) (17). Inne metody rozróżnienia klastogenów i aneugenów można stosować, o ile okazały się skuteczne i zostały zweryfikowane. Przykładowo w przypadku niektórych linii komórkowych przydatnych informacji mogą dostarczyć również pomiary jąder o liczbie chromosomów $< 2n$ jako zdarzeń hipodiploidalnych przy użyciu technik takich jak analiza obrazowa, laserowa cytometria skaningowa lub cytometria przepływowa (80) (81) (82). Obserwacje morfologii jąder również mogą uwidocznić oznaki możliwej aneuploidii. Ponadto badanie aberracji chromosomowych w stadium metafazy, najlepiej w odniesieniu do komórek tego samego rodzaju i protokołu o podobnej czułości, również może stanowić pomocne narzędzie do określenia, czy mikrojądra powstały w wyniku złamań chromosomów (przy czym należy pamiętać, że badanie aberracji chromosomowych nie wykryje utraty chromosomów).

Analiza

Wszystkie preparaty, w tym te zawierające rozpuszczalnik oraz komórki niepoddane działaniu substancji (jeżeli zostały użyte) lub stanowiące kontrolę dodatnią, należy niezależnie zakodować przed przeprowadzeniem analizy mikroskopowej częstości występowania mikrojąder. Przy stosowaniu automatycznego systemu zliczania, na przykład cytometrii przepływowej, laserowej cytometrii skaningowej lub analizy obrazowej, należy zastosować odpowiednie techniki w celu kontrolowania wszystkich błędów systematycznych lub zniekształceń. Bez względu na to, czy do zliczania mikrojąder używa się platformy automatycznej, należy przeprowadzić jednoczesną ocenę CBPI, RI, RPD lub RICC.

W kulturach poddanych działaniu cytochalazyny B częstości występowania mikrojąder należy analizować w co najmniej 2 000 komórek dwujądrowych na stężenie i próbę kontrolną (83), których liczbę należy podzielić równo pomiędzy kontrpróby, jeżeli takowe są stosowane. W przypadku pojedynczych kultur na dawkę (zob. pkt 28) w takiej pojedynczej kulturze należy zliczyć co najmniej 2 000 komórek dwujądrowych (83) na kulturę. Jeżeli do celów liczenia jest dostępnych znacznie mniej niż 1 000 komórek dwujądrowych przypadających na kulturę (dla zduplikowanych kultur) lub 2 000 (dla pojedynczej kultury) na każde stężenie oraz jeżeli nie wykryto znacznego wzrostu liczby mikrojąder, należy powtórzyć test, stosując więcej komórek lub mniej cytotoksyczne stężenia, w zależności od tego, co jest bardziej właściwe. Należy zwrócić uwagę, by nie liczyć komórek dwujądrowych o nieregularnych kształtach lub gdy obydwa jądra różnią się znacznie pod względem wielkości. Ponadto nie należy mylić komórek dwujądrowych ze źle rozproszonymi komórkami wielojądrowymi. Komórki zawierające więcej niż dwa jądra nie powinny analizowane pod kątem mikrojąder, ponieważ podstawowa częstość występowania mikrojąder może być wyższa w przypadku tych komórek (84). Liczenie komórek jednojądrowych jest dopuszczalne, jeżeli wykazano, że badana substancja chemiczna zakłóca aktywność cytochalazyny B. W takich przypadkach pomocne może być powtórzenie testu bez udziału cytochalazyny B. Zliczenie nie tylko komórek dwujądrowych, lecz także jednojądrowych, może być źródłem przydatnych informacji (85) (86), ale nie jest obowiązkowe.

W liniach komórkowych badanych bez poddania działaniu cytochalazyny B mikrojądra należy zliczyć w co najmniej 2 000 komórek dwujądrowych na stężenie testowe i próbę kontrolną (83), których liczbę należy podzielić równo pomiędzy kontrpróby, jeżeli takowe są stosowane. W przypadku stosowania pojedynczych kultur na stężenie (zob. pkt 28) w takiej pojedynczej kulturze należy zliczyć co najmniej 2 000 komórek na kulturę. Jeżeli do celów liczenia jest dostępnych znacznie mniej niż 1 000 komórek przypadających na kulturę (dla zduplikowanych kultur) lub 2 000 (dla pojedynczej kultury) na każde stężenie oraz jeżeli nie wykryto znacznego wzrostu liczby mikrojąder, należy powtórzyć test, stosując więcej komórek lub mniej cytotoksyczne stężenia, w zależności od tego, co jest bardziej właściwe.

W przypadku stosowania cytochalazyny B należy określić CBPI lub RI, aby ocenić proliferację komórek (zob. dodatek 2), używając co najmniej 500 komórek na kulturę. Jeżeli poddawanie działaniu substancji odbywa się w nieobecności cytochalazyny B, konieczne jest uzyskanie dowodów, że komórki w kulturze uległy podziałowi, jak omówiono w pkt 24–28.

Biegłość laboratorium

Aby ustalić wystarczające doświadczenie laboratorium w zakresie omawianego testu przed zastosowaniem go w rutynowych badaniach, laboratorium powinno wcześniej przeprowadzić szereg doświadczeń z wykorzystaniem substancji chemicznych służących do kontroli dodatniej działających za pomocą różnych mechanizmów (co najmniej jednej z aktywacją metaboliczną i jednej bez takiej aktywacji oraz jednej działającej za pomocą mechanizmu aneugenicznego, przy czym taką substancję należy wybrać spośród substancji chemicznych zawartych w tabeli 1) oraz różnych rodzajów kontroli ujemnej (uwzględniając kultury niepoddane działaniu substancji chemicznej oraz różne rozpuszczalniki/nośniki). Reakcje otrzymane w wyniku takiej kontroli dodatniej i ujemnej powinny odpowiadać reakcjom opisanym w literaturze. Nie dotyczy to laboratoriów, które dysponują odpowiednim doświadczeniem, tj. laboratoriów prowadzących bazę dostępnych danych historycznych, o której mowa w pkt 49–52.

Aby wykazać biegłość w zakresie wykrywania klastogennych i aneugennych substancji chemicznych, określić skuteczność układu metabolizującego oraz wykazać zasadność procedur liczenia (wizualna analiza mikroskopowa, cytometria przepływowa, laserowa cytometria skaningowa lub analiza obrazu), należy zbadać szereg substancji chemicznych służących do kontroli dodatniej (zob. tabela 1) przy krótkoterminowym i długoterminowym poddawaniu działaniu substancji chemicznej w przypadku braku aktywacji metabolicznej oraz przy krótkoterminowym poddawaniu działaniu substancji chemicznej w przypadku obecności aktywacji metabolicznej. Należy dobrać szereg stężeń wybranych substancji chemicznych, tak aby uzyskać powtarzalne i powiązane ze stężeniem wzrosty wykraczające poza poziom wyjściowy w celu wykazania czułości i zakresu oznaczania układu badawczego.

Dane historyczne dotyczące kontroli

Laboratorium powinno ustalić:

- zakres i rozkład historycznych wyników kontroli dodatniej,
- zakres i rozkład historycznych wyników kontroli ujemnej (bez poddania działaniu substancji chemicznej, z rozpuszczalnikiem).

Przy pierwszym gromadzeniu danych dotyczących rozkładu historycznych wyników kontroli ujemnej wyniki jednoczesnej kontroli ujemnej powinny być zgodne z opublikowanymi danymi dotyczącymi kontroli ujemnej, o ile takie dane istnieją. W miarę dodawania kolejnych danych doświadczalnych do rozkładu kontroli jednoczesne kontrole ujemne powinny w idealnych warunkach mieścić się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % dla tego rozkładu (87) (88). Prowadzona przez dane laboratorium baza danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej powinna wyjściowo zawierać dane z co najmniej 10 doświadczeń, a najlepiej z co najmniej 20 doświadczeń przeprowadzonych w porównywalnych warunkach doświadczalnych. Laboratoria powinny stosować metody kontroli jakości, takie jak karty kontrolne (np. karty C lub karty X-średnie (88)) w celu określania stopnia zmienności gromadzonych przez nie danych dotyczących kontroli dodatniej i ujemnej oraz w celu wykazania, że stosowana przez nie metodologia jest „pod kontrolą” (83). Dalsze zalecenia dotyczące sposobu gromadzenia i wykorzystywania danych historycznych (tj. kryteria włączania danych do zbioru danych historycznych i wykluczania danych z tego zbioru oraz kryteria dopuszczalności dla danego doświadczenia) można znaleźć w literaturze (87).

Wszelkie zmiany w protokole doświadczalnym należy rozpatrywać pod kątem ich spójności z dotychczas prowadzonymi przez laboratorium bazami danych historycznych dotyczących kontroli. Wszelkie poważne niespójności powinny skutkować utworzeniem nowej bazy danych historycznych dotyczących kontroli.

Dane dotyczące kontroli ujemnej powinny obejmować częstość występowania komórek z mikrojądrami w pojedynczej kulturze lub w ramach sumy zduplikowanych kultur, jak opisano w pkt 28. Jednoczesne kontrole ujemne powinny w idealnych warunkach mieścić się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % dla rozkładu danych zawartych w prowadzonej przez laboratorium bazie danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (87) (88). W przypadku gdy dane dotyczące jednoczesnej kontroli ujemnej nie mieszczą się w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 %, włączenie ich do rozkładu kontroli historycznej może być dopuszczalne, pod warunkiem że dane te nie stanowią skrajnych obserwacji nietypowych oraz że istnieją dowody świadczące o tym, iż dany układ badawczy znajduje się „pod kontrolą” (zob. pkt 50), a także dowody wykluczające błąd techniczny czy ludzki.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ**Przedstawienie wyników**

Jeżeli zastosowano technikę z blokerem cytokinezy, indukcję mikrojąder ocenia się wyłącznie na podstawie częstości występowania komórek dwujądrowych z mikrojądrami (niezależnie od liczby mikrojąder przypadających na komórkę). Wyniki liczenia komórek z jednym mikrojądrem, dwoma mikrojądrami lub większą ich liczbą można odnotowywać osobno i mogą one dostarczyć użytecznych informacji, lecz nie jest to obowiązkowe.

Należy odnotowywać jednoczesne pomiary cytotoksyczności lub cytostazy w odniesieniu do wszystkich kultur poddanych działaniu substancji chemicznej, kultur kontroli ujemnej i kultur kontroli dodatniej (16). Należy obliczyć CBPI lub RI dla wszystkich kultur poddanych działaniu substancji chemicznej i kultur kontrolnych jako pomiary opóźnienia cyklu komórkowego przy zastosowaniu metody z blokerem cytokinezy. W przypadku braku cytochalazyny B należy zastosować RPD lub RICC (zob. dodatek 2).

Należy dostarczyć dane dotyczące poszczególnych kultur. Dodatkowo wszystkie dane należy podsumować w postaci tabeli.

Kryteria dopuszczalności

Dopuszczalność testu ocenia się na podstawie następujących kryteriów:

- uznaje się, że dopuszczalne jest włączenie danych dotyczących jednoczesnej kontroli ujemnej do prowadzonej przez laboratorium bazy danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej, jak opisano w pkt 50;
- jednoczesne kontrole dodatnie (zob. pkt 50) powinny wywoływać reakcje zgodne z reakcjami odnotowanymi w prowadzonej przez laboratorium bazy danych historycznych dotyczących kontroli dodatniej i wykazywać statystycznie istotny wzrost w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną;
- kryteria proliferacji komórek w kontroli z rozpuszczalnikiem powinny zostać spełnione (pkt 25–27);
- zbadano wszystkie warunki doświadczalne do momentu uzyskania w jednych z nich wyników dodatnich (pkt 36–40);
- można poddać analizie wystarczającą liczbę komórek i stężeń (pkt 28 i 44–46);
- kryteria wyboru najwyższego stężenia są spójne z kryteriami opisanymi w pkt 24–31.

Ocena i interpretacja wyników

O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie dodatni, jeżeli w dowolnych ze zbadanych warunków doświadczalnych (zob. pkt 36–39):

- co najmniej jedno z badanych stężeń wykazuje statystycznie istotny wzrost w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną (89),
- ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu tendencji pokazuje, że wzrost jest powiązany z dawką w co najmniej jednych z warunków doświadczalnych (zob. pkt 28).
- którykolwiek wynik znajduje się poza rozkładem danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (np. poza granicami kontrolnymi wyznaczającymi przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona; zob. pkt 52).

W przypadku gdy wszystkie wspomniane kryteria są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna jest w stanie wywołać złamanie chromosomu lub zysk albo stratę w danym układzie badawczym. Zalecenia dotyczące najodpowiedniejszych metod statystycznych można również znaleźć w literaturze (90) (91) (92).

O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie ujemny, jeżeli we wszystkich zbadanych warunkach doświadczalnych (zob. pkt 36–39):

- żadne z badanych stężeń nie wykazuje statystycznie istotnego wzrostu w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną,
- ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu tendencji pokazuje, że wzrost nie jest powiązany ze stężeniem,
- wszystkie wyniki mieszczą się w rozkładzie danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej (np. w granicach kontrolnych wyznaczających przedział 95 % na podstawie rozkładu Poissona; zob. pkt 52).

Badaną substancję chemiczną uznaje się następnie za niezdolną do wywołania złamania chromosomu ani zysku lub straty w danym układzie badawczym. Zalecenia dotyczące najodpowiedniejszych metod statystycznych można również znaleźć w literaturze (90) (91) (92).

Weryfikacja wyraźnie dodatniej lub ujemnej reakcji nie jest wymagana.

Jeżeli reakcja nie jest ani wyraźnie dodatnia, ani wyraźnie ujemna, jak opisano powyżej, oraz aby ułatwić ustalenie biologicznego znaczenia wyniku, dane powinny zostać ocenione w oparciu o opinię eksperta lub wyniki dalszych badań. Przydatne może być zliczenie dodatkowych komórek (w stosownych przypadkach) lub powtórne przeprowadzenie doświadczenia, potencjalnie z zastosowaniem zmienionych warunków doświadczalnych (np. odstępów czasu między stężeniami, innych warunków aktywacji metabolicznej (tj. stężenie S9 lub pochodzenie S9)).

W rzadkich przypadkach nawet po przeprowadzeniu dalszych badań uzyskany zbiór danych uniemożliwi uznanie wyników za dodatnie lub ujemne i w takiej sytuacji zostanie uznany za niejednoznaczny.

Badane substancje chemiczne powodujące indukcję mikrojąder w teście MNvit mogą wywoływać taki skutek, ponieważ indukują one złamanie chromosomu, utratę chromosomu albo zarówno złamanie, jak i utratę. W celu ustalenia, czy mechanizm indukcji mikrojąder jest spowodowany aktywnością klastogenną czy aneugenną, można zastosować dalszą analizę z wykorzystaniem przeciwciał antykinetochorowych, sond szczególnych dla centromerów *in situ* lub innych metod.

Sprawozdanie z badania

Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna:

- źródło, numer partii, data graniczna do użytku, jeżeli jest dostępna;
- stabilność badanej substancji chemicznej, jeżeli jest znana;
- reaktywność badanych substancji chemicznych w rozpuszczalniku/nośniku lub w podłożach kultur komórkowych;
- rozpuszczalność i stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku, jeżeli są znane;
- pomiar pH, osmolalności i strącania w podłożu hodowli, do którego dodano badaną substancję chemiczną, w stosownych przypadkach.

Substancja jednoskładnikowa:

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

Substancja wieloskładnikowa, UVCB oraz mieszaniny:

- opisane w miarę możliwości poprzez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

Rozpuszczalnik:

- uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika;
- zawartość procentowa rozpuszczalnika w końcowym podłożu.

Komórki:

- rodzaj i źródło wykorzystywanych komórek;
- odpowiedniość wykorzystywanych rodzajów komórek;
- nieobecność mykoplazmy w przypadku linii komórkowych;
- w przypadku linii komórkowych – informacje na temat czasu trwania cyklu komórkowego lub wskaźnika proliferacji;
- w przypadku zastosowania limfocytów – płeć, wiek i wszelkie inne istotne informacje na temat dawców krwi, krew pełna lub oddzielone limfocyty, wykorzystany mitogen;
- normalny czas trwania cyklu komórkowego (kontrola ujemna);
- w przypadku linii komórkowych – liczba pasaży, o ile informacje na ten temat są dostępne;
- w przypadku linii komórkowych – metody utrzymania kultur komórkowych;
- w przypadku linii komórkowych – modalna liczba chromosomów.

Warunki badania:

- nazwa substancji zatrzymującej cytokinę (np. cytochalazyna B), o ile jest wykorzystywana, oraz jej stężenie oraz okres narażenia komórek na działanie tej substancji;
- stężenie badanej substancji chemicznej wyrażone jako stężenie końcowe w podłożu (tj. μg lub mg/mL lub mM podłoża);
- uzasadnienie wyboru stężeń oraz liczby kultur, z uwzględnieniem danych dotyczących cytotoksyczności oraz granic rozpuszczalności;
- skład podłoża, w stosownych przypadkach stężenie CO_2 , poziom wilgotności;
- stężenie (lub objętość) rozpuszczalnika i badanej substancji chemicznej dodanych do podłoża;
- temperatura i czas inkubacji;
- czas poddawania działaniu substancji chemicznej;
- czas pobrania po podaniu substancji chemicznej;
- w stosownych przypadkach zagęszczenie komórek w czasie osadzania;
- typ oraz skład układu metabolizującego (źródło frakcji S9, metoda przygotowania preparatu frakcji S9, stężenie lub objętość preparatu frakcji S9 i frakcji S9 w końcowym podłożu, kontrole jakości frakcji S9 (tj. aktywność enzymatyczna, sterylność, zdolność metaboliczna));
- substancje chemiczne służące do kontroli dodatniej i ujemnej, stężenia końcowe, warunki i okresy poddawania działaniu badanej substancji chemicznej i ustania działania substancji;
- metody przygotowywania preparatów oraz stosowane techniki barwienia;
- kryteria liczenia komórek zawierających mikrojądra (wybór komórek poddanych analizie i identyfikacja mikrojądra);
- liczba komórek poddanych analizie;

- metody pomiaru cytotoksyczności;
- wszelkie informacje uzupełniające istotne w kontekście cytotoksyczności i stosowanej metody;
- kryteria uznawania wyników badań za dodatnie, ujemne lub niejednoznaczne;
- stosowana(-e) metoda(-y) analizy statystycznej;
- metody, takie jak stosowanie przeciwciał antykinetochorowych lub sondy specyficzne dla pancentromerów, w celu określenia, czy mikrojądra zawierają całe chromosomy czy fragmenty chromosomów, jeżeli ma to zastosowanie;
- metody stosowane w celu ustalenia poziomu pH, osmolalności i strącania.

Wyniki:

- definicja dopuszczalnych komórek do celów analizy;
- w nieobecności cytochalazyny B – liczba komórek poddanych działaniu substancji chemicznej i liczba komórek pobranych z każdej kultury w przypadku linii komórkowych;
- zastosowany pomiar cytotoksyczności, tj. CBPI lub RI w przypadku stosowania metody z blokerem cytokinezy; RICC lub RPD, w przypadku gdy nie są stosowane metody z blokerem cytokinezy; ewentualne inne obserwacje (np. zlewanie się komórek, apoptoza, martwica, liczenie w stadium metafazy, częstość występowania komórek dwujądrowych);
- oznaki strącania i czas oznaczenia;
- dane dotyczące pH oraz osmolalności podłoża użytego do badania, jeżeli zostały ustalone;
- dystrybucja komórek jedno-, dwu- i wielojądrowych, jeżeli stosowana jest metoda z blokerem cytokinezy;
- w stosownych przypadkach liczba komórek z mikrojądrami podana osobno dla każdej kultury poddanej działaniu substancji chemicznej i kultury kontrolnej oraz określenie, czy pochodzą z komórek jedno- czy dwujądrowych;
- w stosownych przypadkach zależność stężenie-odpowieź;
- dane dotyczące jednoczesnych kontroli ujemnych (z rozpuszczalnikiem) i dodatnich (stężenia i rozpuszczalniki);
- dane historyczne dotyczące kontroli ujemnych (z rozpuszczalnikiem) i dodatnich wraz z zakresami, średnimi i odchyleniami standardowymi oraz granicami kontrolnymi wyznaczającymi przedział 95 % rozkładu, uwzględniając również ilość danych;
- analiza statystyczna; ewentualne p-wartości.

Omówienie wyników.

Wnioski.

BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD, Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. Publikacje OECD na temat środowiska, seria dotycząca badań i oceny, nr 234, OECD, Paryż.
- (2) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research*, t. 392/1–2, s. 1–4.
- (3) Parry, J.M., A. Sors, (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: projekt Wspólnoty Europejskiej dotyczący aneuploidii. *Mutation Research*, t. 287/1, s. 3–15.
- (4) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios*, t. 43/172–173, s. 233–246.

- (5) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 35/3, s. 167–172.
- (6) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, t. 2/5, s. 1084–1104.
- (7) Fenech, M., A.A. Morley (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research*, t. 161/2, s. 193–198.
- (8) Eastmond, D.A., J.D. Tucker (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 13/1, s. 34–43.
- (9) Eastmond, D.A., D. Pinkel (1990). Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probe. *Mutation Research*, t. 234/5, s. 9–20.
- (10) Miller, B.M. *et al.* (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis*, t. 6/4, s. 297–302.
- (11) Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis*, t. 8/4, s. 329–334.
- (12) Migliore, L. *et al.* (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research*, t. 319/3, s. 205–213.
- (13) Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis*, t. 8/6, s. 519–525.
- (14) Eastmond, D.A., D.S. Rupa, L.S. Hasegawa (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Research*, t. 322/1, s. 9–20.
- (15) Marshall, R.R. *et al.* (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Research*, t. 372/2, s. 233–245.
- (16) Zijno, P. *et al.* (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Research*, t. 372/2, s. 211–219.
- (17) Kirsch-Volders *et al.* (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research*, t. 540/2, s. 153–163.
- (18) Rozdział B.10 niniejszego załącznika: *Test aberracji chromosomowej w komórkach ssaków in vitro*.
- (19) Lorge, E. *et al.* (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research*, t. 607/1, s. 13–36.
- (20) Clare, G. *et al.* (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research*, t. 607/1, s. 37–60.
- (21) Aardema, M.J. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Research*, t. 607/1, s. 61–87.
- (22) Wakata, A. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Research*, t. 607/1, s. 88–124.

- (23) Oliver, J. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Research*, t. 607/1, s. 125–152.
- (24) Albertini, S. *et al.* (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Research*, t. 392/1-2, s. 187–208.
- (25) Miller, B. *et al.* (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research*, t. 392/1-2, s. 45–59.
- (26) Miller, B. *et al.* (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft für Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Research*, t. 410, s. 81–116.
- (27) Kalweit, S. *et al.* (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches. *Mutation Research*, t. 439/2, s. 183–190.
- (28) Kersten, B. *et al.* (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research*, t. 445/1, s. 55–71.
- (29) von der Hude, W. *et al.* (2000). *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells – results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Research*, t. 468/2, s. 137–163.
- (30) Garriott, M.L., J.B. Phelps, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research*, t. 517/1–2, s. 123–134.
- (31) Matsushima, T. *et al.* (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis*, t. 14/6, s. 569–580.
- (32) Elhajouji, A., E. Lorge (2006). Specjalne wydanie: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research*, t. 607/1, s. 1–152.
- (33) Kirkland, D. (2010). Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro* micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial. *Mutation Research*, t. 702/2, s. 139–147.
- (34) Hashimoto K. *et al.* (2011). Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, t. 59/1, s. 28–36.
- (35) Honma, M., M. Hayashi (2011). Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 52/5, s. 373–384.
- (36) Zhang, L.S. *et al.* (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research Letters*, t. 347/3–4, s. 105–115.
- (37) ECVAM (2006). Oświadczenie Europejskiego Centrum Uznawania Metod Alternatywnych (ECVAM) Naukowego Komitetu Doradczego (ESAC) dotyczące naukowej zasadności testu mikrojądrowego *in vitro* jako alternatywy dla testu aberracji chromosomowych *in vitro* na potrzeby badania genotoksyczności. 25. konferencja ESAC, dnia 16–17 listopada 2006 r.; dostępne na stronie: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- (38) ESAC (2006). Wzajemna ocena Naukowego Komitetu Doradczego ECVAM (ESAC), Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Dostępna na stronie internetowej: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- (39) Corvi, R. *et al.* (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis*, t. 23/4, s. 271–283.

- (40) Opracowanie ILSI (projekt). Lorge, E., M.M. Moore, J. Clements, M. O'Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, A. Sutter, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Young-Tannir. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. *Mutation Research*.
- (41) Scott, D. *et al.* (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. Sprawozdanie 9. grupy zadaniowej ICMPEMC. *Mutation Research*, t. 257/2, s. 147–205.
- (42) Morita, T. *et al.* (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research*, t. 268/2, s. 297–305.
- (43) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environmental Mutagenesis*, t. 8/6, s. 789–886.
- (44) Long, L.H. *et al.* (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 Research*, t. 634/1–2, s. 177–183.
- (45) Nesslany, F. *et al.* (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation*, t. 49, s. 439–452.
- (46) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, t. 147/1–2, s. 29–36.
- (47) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research*, t. 392, s. 11–18.
- (48) Payne, C.M. *et al.* (2010). Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, t. 62/6, s. 825–840.
- (49) Bazin, E. *et al.* (2010). Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin, Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 51/3, s. 251–259.
- (50) Le Hegarat, L. *et al.* (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cells by the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, t. 25/6, s. 555–560.
- (51) Josse, R. *et al.* (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay. *Mutagenesis*, t. 27/3, s. 295–304.
- (52) Ehrlich, V. *et al.* (2002). Fumonisin B₁ is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis*, t. 17/3, s. 257–260.
- (53) Knasmüller, S. *et al.* (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology*, t. 198/1–3, s. 315–328.
- (54) Gibson, D.P. *et al.* (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Research*, t. 392/1–2, s. 61–70.
- (55) Bonassi, S. *et al.* (2001). HUMAN MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 37/1, s. 31–45.
- (56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, t. 113/3–4, s. 173–215.
- (57) 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. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, t. 4/1, s. 55–65.

- (58) Elliott, B.M. *et al.* (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, t. 7, s. 175–177.
- (59) Matsushima, T. *et al.* (1976). „A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems”, w: *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al.* (red.), Elsevier, North-Holland, s. 85–88.
- (60) Johnson, T.E., D. R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 28, s. 51–59.
- (61) UNEP (2001). Konwencja Sztokholmska w sprawie trwałych zanieczyszczeń organicznych, Program Narodów Zjednoczonych ds. Ochrony Środowiska (UNEP). Dostępne na stronie internetowej: <http://www.pops.int/>
- (62) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987). Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutation Research*, t. 190/3, s. 225–228.
- (63) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982). „CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids”, w: *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (red.), Plenum, Nowy Jork, s. 91–103.
- (64) Zamora, P.O. *et al.* (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environmental Mutagenesis*, t. 5/6, s. 795–801.
- (65) Asakura, M. *et al.* (2008). An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay. *Mutation Research*, t. 652/2, s. 122–130.
- (66) Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research*, t. 285/1, s. 35–44.
- (67) Phelps, J.B., M.L. Garriott, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research*, t. 521/1–2, s. 103–112.
- (68) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2004). Sprostowanie do „Report from the *in vitro* micronucleus assay working group”. *Mutation Research*, 564, 97–100.
- (69) Lorge, E. *et al.* (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Research*, t. 655/1–2, s. 1–3.
- (70) Surralles, J. *et al.* (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, t. 341/3, s. 169–184.
- (71) Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutation Research*, t. 724, s. 86–87.
- (72) Pfuhrer, S. *et al.* (2011). *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutation Research*, t. 723/2, s. 101–107.
- (73) 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 (wytyczne dotyczące badań 473, 476 i 487). ENV/JM/TG(2014)17. Dostępny na wniosek.
- (74) Morita T., M. Honma, K. Morikawa (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 Research*, t. 741, s. 32–56.
- (75) Brookmire L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *in vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 54/1, s. 36–43.

- (76) EPA, Urząd ds. Bezpieczeństwa Substancji Chemicznych i Zapobiegania Zanieczyszczeniom (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances. <http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt>.
- (77) Sobol, Z. *et al.* (2012). Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutation Research*, t.746/1, s. 29–34.
- (78) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Research*, t. 120/4, s. 241–247.
- (79) MacGregor, J. T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Research*, t. 120/4, s. 269–275.
- (80) Bryce, S.M. *et al.* (2011). Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 52/4, s. 280–286.
- (81) Nicolette, J. *et al.* (2011). *in vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 52/5, s. 355–362.
- (82) Shi, J., R. Bezabhe, A. Szkudlinska (2010). Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis*, t. 25/1, s. 33–40.
- (83) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 198, OECD Publishing, Paryż.
- (84) Fenech, M. *et al.* (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, t. 534/1–2, s. 65–75.
- (85) Elhajouji, A., M. Cunha, M. Kirsch-Volders (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis*, t. 13/2, s. 193–198.
- (86) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2011). The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology*, t. 85/8, s. 873–899.
- (87) Hayashi, M. *et al.* (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, t.723/2, s. 87–90.
- (88) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. wyd. II, John Wiley and Sons, Nowy Jork.
- (89) Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003). „*In vitro* micronucleus test”, w: *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, wyd. II, Chow, S. (red.), Marcel Dekker, Inc. Nowy Jork, s. 463–467.
- (90) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions*, wyd. III, John Wiley & Sons, Nowy Jork.
- (91) Galloway, S.M. *et al.* (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 10/supplement 10, s. 1–175.
- (92) Richardson, C. *et al.* (1989). Analysis of Data from *in vitro* Cytogenetic Assays. in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (red.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 141–154.
- (93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.

Dodatek 1

DEFINICJE

Aneugen: każda substancja chemiczna lub proces, który poprzez reakcję z elementami mitotycznego i mejotycznego cyklu podziału komórek prowadzi do aneuploidii w komórkach lub organizmach.

Aneuploidia: wszelkie odchylenia od zwykłej diploidalnej (lub haploidalnej) liczby chromosomów w pojedynczym chromosomie lub w większej ich liczbie, ale nie w całym zestawie czy całych zestawach chromosomów (poliploidalność).

Apoptoza: zaprogramowana śmierć komórki, na którą składa się szereg etapów prowadzących do rozpadu komórek w cząstki otoczone błoną, które są następnie eliminowane przez fagocytozę lub wydalane.

Prolifercja komórek: wzrost liczby komórek w wyniku mitotycznego podziału komórek.

Centromer: region DNA chromosomu, w którym obydwie chromatydy się łączą i do którego obydwa kinetochory są przyłączone jeden obok drugiego.

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

Stężenia: odnoszą się do stężeń końcowych badanej substancji chemicznej w podłożu.

Klastogen: każda substancja chemiczna lub każde zdarzenie, które powoduje strukturalne aberracje chromosomowe w populacjach komórek lub organizmów eukariotycznych.

Cytokineza: proces podziału komórki następujący bezpośrednio po mitozie, mający na celu utworzenie dwóch komórek potomnych, z których każda zawiera jedno jądro.

Wskaźnik proliferacji blokera cytokinezy (CBPI): odsetek komórek w cyklu drugiego podziału w populacji poddanej działaniu substancji w stosunku do próby kontrolnej niepoddanej działaniu substancji (zob. wzór w dodatku 2).

Cytostaza: hamowanie wzrostu komórek (zob. wzór w dodatku 2).

Cytotoksyczność: w odniesieniu do badań objętych niniejszą metodą badawczą przeprowadzanych w obecności cytochalazyny B cytotoksyczność określa się jako obniżenie wskaźnika proliferacji blokera cytokinezy (CBPI) lub obniżenie wskaźnika replikacji (RI) komórek poddanych działaniu substancji w porównaniu z kontrolą ujemną (zob. pkt 26 i dodatek 2).

W odniesieniu do badań objętych niniejszą metodą badawczą przeprowadzanych w nieobecności cytochalazyny B cytotoksyczność określa się jako obniżenie względnego podwojenia populacji (RPD) lub obniżenie względnego wzrostu liczby (RICC) komórek poddanych działaniu substancji w porównaniu z kontrolą ujemną (zob. pkt 27 i dodatek 2).

Genotoksyczny: ogólny termin odnoszący się do wszelkiego rodzaju uszkodzeń DNA lub chromosomu, w tym złamań, delecji, adduktów, modyfikacji i sprzężeń nukleotydów, rearanżacji, mutacji genowych, aberracji chromosomowych oraz aneuploidii. Nie wszystkie rodzaje efektów genotoksycznych powodują mutacje lub stałe uszkodzenia chromosomu.

Komórki w interfazie: komórki niebędące w fazie mitozy.

Kinetochor: struktura zawierająca białko na centromerze chromosomu, do której przyczepiają się włókna wrzeciona kariokinetycznego w trakcie podziału komórki, umożliwiając uporządkowane przemieszczanie się chromosomów potomnych do biegunów komórek potomnych.

Mikrojądra: małe jądra, oddzielone oraz występujące dodatkowo w stosunku do jądra głównego komórek, wytwarzane w trakcie telofazy mitozy lub mejozy przez fragmenty chromosomów opóźnionych lub całe chromosomy.

Mitoza: podział jądra komórkowego, na który zazwyczaj składają się profaza, prometafaza, metafaza, anafaza i telofaza.

Indeks mitotyczny: stosunek komórek w metafazie do całkowitej liczby komórek zaobserwowanych w populacji komórek; wskazanie stopnia proliferacji komórek tej populacji.

Mutageny: tworzy dziedziczne zmiany w sekwencji lub sekwencjach par zasad DNA w genach lub w strukturze chromosomów (aberracje chromosomowe).

Nondysjunkcja: nierozdzielenie się pary chromatyd i brak odpowiedniego ich rozdziału do komórek potomnych, w wyniku czego powstają komórki potomne z nieprawidłową liczbą chromosomów.

Status p53: białko p53 bierze udział w procesie regulacji cyklu komórkowego, apoptozy i naprawy DNA. Komórki, w których odnotowuje się niedobór białka p53 i które są niezdolne do zatrzymania cyklu komórkowego lub do usunięcia uszkodzonych komórek poprzez apoptozę lub inne mechanizmy (np. poprzez zainicjowanie procesu naprawy DNA) powiązane z funkcjami, jakie białko p53 pełni w reakcji na uszkodzenie DNA, powinny teoretycznie być bardziej podatne na mutacje genowe lub aberracje chromosomowe.

Poliploidalność: aberracje liczby chromosomów w komórkach lub organizmach, obejmujące cały zestaw lub całe zestawy chromosomów, a nie pojedynczy chromosom lub chromosomy (aneuploidia).

Wskaźnik proliferacji (PI): metoda pomiaru cytotoksyczności, kiedy nie stosuje się cytochalazyny B (zob. wzór w dodatku 2).

Względny wzrost liczby komórek (RICC): metoda pomiaru cytotoksyczności, kiedy nie stosuje się cytochalazyny B (zob. wzór w dodatku 2).

Względne podwojenie populacji (RPD): metoda pomiaru cytotoksyczności, kiedy nie stosuje się cytochalazyny B (zob. wzór w dodatku 2).

Wskaźnik replikacji (RI): odsetek zakończonych cykli podziału komórkowego w hodowli poddanej działaniu substancji w stosunku do próby kontrolnej niepoddanej działaniu substancji w okresie narażenia i ustania działania substancji (zob. wzór w dodatku 2).

Frakcja S9 uzyskana z wątroby: supernatant z homogenatu wątroby po odwirowaniu przy 9 000 g, tj. surowy ekstrakt z wątroby.

Preparat frakcji S9: preparat złożony z frakcji S9 uzyskanej z wątroby i kofaktorów niezbędnych do aktywności metabolicznej enzymów.

Kontrola z rozpuszczalnikiem: ogólny termin opisujący kultury kontrolne otrzymujące wyłącznie rozpuszczalnik stosowany do rozpuszczenia badanej substancji chemicznej.

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

Próba kontrolna niepoddawana działaniu substancji: hodowle, które nie są poddawane działaniu żadnej substancji (tj. badanej substancji chemicznej ani rozpuszczalnika), lecz które są równolegle przetwarzane w taki sam sposób jako hodowle otrzymujące badaną substancję chemiczną.

Dodatek 2

WZORY DO OCENY CYTOTOKSYCZNOŚCI

W przypadku stosowania cytochalazyny B ocena cytotoxycznosci powinna opierać się na **wskaźniku proliferacji bloкера cytokinezy (CBPI)** lub **na wskaźniku replikacji (RI)** (17) (69). Wskaźnik proliferacji bloкера cytokinezy (CBPI) wskazuje średnią liczbę jąder przypadających na komórkę i może być stosowany do obliczania proliferacji komórek. Wskaźnik replikacji (RI) wskazuje względną liczbę cykli komórkowych na jedną komórkę podczas okresu narażenia na działanie cytochalazyny B w hodowlach poddanych działaniu substancji w porównaniu z hodowlami kontrolnymi i może być wykorzystywany do obliczania cytostazy w %:

$$\text{Cytostaza w \%} = 100 - 100 \{ (\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1) \}$$

gdzie:

T = hodowla poddana działaniu badanej substancji chemicznej

C = hodowla kontrolna

gdzie:

$$\text{CBPI} = \frac{((1. \text{komórek jednojądrowych}) + (2 \times 1. \text{komórek dwujądrowych}) + (3 \times 1. \text{komórek wielojądrowych}))}{(\text{łącna liczba komórek})}$$

Dlatego CBPI wynoszący 1 (wszystkie komórki są jednojądrowe) odpowiada cytostazie na poziomie 100 %.

Cytostaza = 100 - RI

$$\text{RI} = \frac{((1. \text{komórek dwujądrowych}) + (2 \times 1. \text{komórek wielojądrowych})) / (\text{łącna l. komórek})_T}{((1. \text{komórek dwujądrowych}) + (2 \times 1. \text{komórek wielojądrowych})) / (\text{łącna l. komórek})_C} \times 100$$

T = hodowle poddane działaniu substancji

C = hodowle kontrolne

Tym samym RI wynoszący 53 % oznacza, że w porównaniu do liczby komórek, które podzieliły się i utworzyły komórki dwu- i wielojądrowe w hodowli kontrolnej, jedynie 53 % tej liczby podzieliło się w hodowli poddanej działaniu substancji, tj. cytostaza na poziomie 47 %.

W przypadku gdy nie stosuje się cytochalazyny B, zaleca się ocenę cytotoxycznosci na podstawie **względnego wzrostu liczby komórek (RICC)** lub **względnego podwojenia populacji (RPD)** (69), ponieważ oba te wskaźniki uwzględniają odsetek populacji komórek, które uległy podziałowi.

$$\text{RICC}(\%) = \frac{(\text{wzrost l. komórek w hodowlach poddanych działaniu subst. (l. końc. - l. początk.)})}{(\text{wzrost liczby w hodowlach kontrolnych (l. końcowa - l. początkowa)})} \times 100$$

$$\text{RPD}(\%) = \frac{(\text{liczba podwojeń populacji w hodowlach poddanych działaniu subst.})}{(\text{liczba podwojeń populacji w kontrolnych})} \times 100$$

gdzie:

Podwojenie populacji = $[\log(\text{liczba komórek po poddaniu działaniu substancji chemicznej} \div \text{początkowa liczba komórek})] \div \log 2$

Dlatego też RICC lub RPD wynoszący 53 % oznacza cytotoxycznosc/cytostazę na poziomie 47 %.

W przypadku stosowania **wskaźnika proliferacji (PI)** cytotoxycznosc można ocenić przez liczenie klonów składających się z 1 komórki (cl1), 2 komórek (cl2), 3 do 4 komórek (cl4) i 5 do 8 komórek (cl8).

$$\text{PI} = \frac{((1 \times \text{cl1}) + (2 \times \text{cl2}) + (3 \times \text{cl4}) + (4 \times \text{cl8}))}{(\text{cl1} + \text{cl2} + \text{cl4} + \text{cl8})}$$

PI został wykorzystany jako cenny i wiarygodny parametr cytotoxycyzności również w przypadku linii komórkowych hodowanych *in vitro* w nieobecności cytochalazyny B (35) (36) (37) (38) i może być stosowany jako użyteczny dodatkowy parametr.

W każdym razie liczba komórek przed poddaniem działaniu substancji powinna być taka sama zarówno w przypadku hodowli poddanych działaniu substancji chemicznej, jak i w przypadku hodowli na potrzeby kontroli ujemnej.

Chociaż wskaźnik RCC (tj. liczba komórek w hodowlach poddanych działaniu substancji chemicznej podzielona przez liczbę komórek w hodowlach kontrolnych) był w przeszłości wykorzystywany jako parametr cytotoxycyzności, nie zaleca się dalszego korzystania z tego wskaźnika, ponieważ może to skutkować niedoszacowaniem cytotoxycyzności.

Podczas stosowania automatycznych systemów zliczania, na przykład cytometrii przepływowej, laserowej cytometrii skaningowej lub analizy obrazu, liczbę komórek we wspomnianym wzorze można zastąpić liczbą jąder.

W przypadku hodowli na potrzeby kontroli ujemnej wskaźnik podwojenia populacji lub wskaźnik replikacji powinien być zgodny z wymogiem pobierania próbek komórek po poddaniu działaniu substancji w czasie równoważnym około 1,5–2-krotności standardowego czasu trwania cyklu komórkowego.”;”;

15) w części B dodaje się rozdziały w brzmieniu:

„B.59 **Działanie uczulające na skórę *in chemico*: bezpośrednie oznaczanie reaktywności peptydów (DPRA)**

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) 442C (2015). Substancja działająca uczulająco na skórę oznacza substancję, która wywołuje reakcję alergiczną w następstwie kontaktu ze skórą, określoną przez Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów ONZ (ONZ GHS) (1) oraz rozporządzenie Unii Europejskiej (WE) 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin (CLP).⁽¹⁾ W niniejszej metodzie badawczej przedstawiono procedurę *in chemico* (bezpośrednie oznaczanie reaktywności peptydów– DPRA), którą należy stosować celem uzyskania rozróżnienia substancji działających uczulająco na skórę i substancji niewykazujących takiego działania zgodnie z GHS ONZ (1) i rozporządzeniem CLP.

Panuje ogólna zgoda co do kluczowych zdarzeń biologicznych stanowiących podstawę działania uczulającego na skórę. Istniejącą wiedzę dotyczącą mechanizmów chemicznych i biologicznych powiązanych z działaniem uczulającym na skórę podsumowano w formie mechanizmu wywoływania skutków szkodliwych (2), poczynawszy od molekularnego zdarzenia inicjującego poprzez zdarzenia pośrednie aż do skutku szkodliwego, tj. alergicznego kontaktowego zapalenia skóry u ludzi lub nadwrażliwości kontaktowej u gryzoni. W ramach mechanizmu wywoływania skutków szkodliwych w zakresie działania uczulającego na skórę molekularnym zdarzeniem inicjującym jest wiązanie kowalencyjne substancji elektrofilowych z centrami nukleofilowymi w białkach skóry.

Ocena działania uczulającego na skórę obejmuje na ogół wykorzystanie zwierząt laboratoryjnych. Klasyczne metody oparte o wykorzystanie świnek morskich, tj. test maksymalizacji na świnkach morskich Magnussona Kligmana (GMPT) i test Buehlera (metoda badawcza B.6 (3)), badają zarówno indukcję, jak i fazy elicytacji działania uczulającego na skórę. Przeprowadzany na myszach test lokalnych węzłów chłonnych (LLNA, metoda badawcza B.42 (4)) i jego dwie nieradioaktywne modyfikacje, LLNA: DA (TM B.50 (5)) i LLNA: BrdU-ELISA (metoda badawcza B.51 (6)), w ramach których ocenia się wyłącznie reakcję indukcyjną, także zyskały akceptację, ponieważ zapewniają one przewagę nad testami prowadzonymi na świnkach morskich pod względem dobrostanu zwierząt i obiektywnego pomiaru fazy indukcyjnej działania uczulającego na skórę.

Ostatnio uznano, że metody badawcze *in chemico* i *in vitro* oparte na analizie mechanistycznej są potwierdzone naukowo jako metody oceny zagrożenia wywołania działania uczulającego na skórę przez substancje chemiczne. Ze względu jednak na ograniczony mechanistyczny zakres mechanizmu wywoływania skutków szkodliwych w przypadku każdej z obecnie dostępnych metod badawczych niewymagających wykorzystania zwierząt konieczne będzie zastosowanie kombinacji metod (*in silico*, *in chemico* oraz *in vitro*) w ramach zintegrowanych podejść do badań i oceny (IATA), aby móc w pełni zastąpić aktualnie stosowane testy na zwierzętach (2) (7).

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

Sugeruje się zastosowanie DPRA w celu określenia molekularnego zdarzenia inicjującego mechanizm wywoływania skutków szkodliwych w zakresie działania uczulającego na skórę, tj. reaktywności białek, poprzez ilościowe określenie reaktywności badanej substancji chemicznej względem wzorcowych peptydów syntetycznych zawierających lizynę albo cysteinę (8). Następnie wykorzystuje się wartości procentowego obniżenia stężenia peptydu zawierającego cysteinę i lizynę w celu zakwalifikowania substancji do jednej z czterech klas reaktywności do celów rozróżnienia substancji działających uczulająco na skórę i substancji niewykazujących takiego działania (9).

DPRA oceniono w ramach badania walidacyjnego przeprowadzonego przez laboratorium referencyjne Unii Europejskiej ds. metod alternatywnych wobec testów na zwierzętach (EURL ECVAM) i późniejszej niezależnej wzajemnej oceny przeprowadzonej przez Naukowy Komitet Doradczy EURL ECVAM (ESAC) i zostało ono uznane za potwierdzone naukowo (10) do celów stosowania jako część IATA celem wsparcia rozróżnienia substancji działających uczulająco na skórę i substancji niewykazujących takiego działania na potrzeby klasyfikacji zagrożeń i oznakowań. Przykłady zastosowania danych DPRA w połączeniu z innymi informacjami są opisane w literaturze (11) (12) (13) (14).

Definicje znajdują się w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE, ZASTOSOWANIE I OGRANICZENIA

Korelacja między reaktywnością białek a potencjalnym działaniem uczulającym na skórę jest dobrze znana (15) (16) (17). Z uwagi jednak na fakt, że wiązanie białek stanowi tylko jedno kluczowe zdarzenie, mimo iż jest to molekularne zdarzenie inicjujące mechanizm wywoływania skutków szkodliwych w zakresie działania uczulającego na skórę, sama informacja o reaktywności białek wygenerowana przy zastosowaniu metod badawczych i niebadawczych może nie być wystarczająca, aby stwierdzić brak potencjalnego działania uczulającego na skórę substancji chemicznych. Dlatego też dane wygenerowane przy zastosowaniu niniejszej metody badawczej należy analizować w kontekście podejść zintegrowanych, takich jak IATA, łącząc je z innymi informacjami uzupełniającymi, tj. pochodzącymi z testów *in vitro* określających inne kluczowe zdarzenia w mechanizmie wywoływania skutków szkodliwych w zakresie działania uczulającego na skórę, jak również metod niebadawczych, w tym danych z podejść przekrojowych z zastosowaniem analogicznych substancji chemicznych.

Niniejszą metodę badawczą można stosować w połączeniu z innymi informacjami uzupełniającymi celem wsparcia rozróżnienia substancji działających uczulająco na skórę (tj. kategoria 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) i substancji niewykazujących takiego działania w kontekście IATA. Niniejszej metody badawczej nie można stosować samodzielnie ani w celu dalszego klasyfikowania substancji działających uczulająco na skórę do podkategorii 1A i 1B, zgodnie z GHS ONZ / rozporządzeniem CLP, ani w celu przewidzenia ich siły działania na potrzeby podjęcia decyzji dotyczących oceny bezpieczeństwa. Jednakże w zależności od ram regulacyjnych sam wynik dodatni w DPRA można wykorzystać celem zaklasyfikowania substancji chemicznej do kategorii 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP.

Okazało się, że metoda badawcza DPRA może być także przeprowadzana w laboratoriach, które mają doświadczenie w wykonywaniu analiz metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Poziom odtwarzalności prognoz, którego można oczekiwać od tej metody badawczej, ma wartość rzędu 85 % wewnątrz laboratoriów i 80 % pomiędzy laboratoriami (10). Wyniki uzyskane w badaniu walidacyjnym (18) i opublikowanych badaniach (19) ogólnie wskazują na to, że dokładność DPRA w rozróżnianiu substancji działających uczulająco (tj. kategoria 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) i substancji niewykazujących takiego działania wynosi 80 % (N=157) z czułością na poziomie 80 % (88/109) i swoistością na poziomie 77 % (37/48) w porównaniu z wynikami testu lokalnych węzłów chłonnych (LLNA). Jest bardziej prawdopodobne, że w wyniku DPRA zostaną zaniżone prognozy dotyczące substancji chemicznych wykazujących niską lub średnią siłę działania uczulającego na skórę (tj. podkategoria 1B wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) niż prognozy dotyczące substancji wykazujących wysoką siłę działania uczulającego na skórę (tj. subkategoria 1A wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) (18) (19). Przedstawione tutaj wartości dokładności DPRA jako samodzielnej metody badawczej są jednak wyłącznie orientacyjne, ponieważ tę metodę badawczą należy rozpatrywać w połączeniu z innymi źródłami informacji w kontekście IATA i zgodnie z przepisami pkt 9 powyżej. Co więcej, przy ocenie metod niewymagających wykorzystania zwierząt pod kątem działania uczulającego na skórę należy pamiętać, że test LLNA, jak również inne badania na zwierzętach, mogą nie w pełni odzwierciedlać sytuację gatunku będącego przedmiotem zainteresowania, tj. ludzi. Na podstawie ogólnie dostępnych danych wykazano, że DPRA ma zastosowanie do badanych substancji chemicznych obejmujących szereg organicznych grup funkcyjnych, mechanizmów reagowania, sił działania uczulającego na skórę (jak określono w badaniach *in vivo*) oraz właściwości fizykochemicznych (8) (9) (10) (19). Wszystkie te informacje łącznie wskazują na użyteczność DPRA w identyfikowaniu zagrożenia związanego z działaniem uczulającym na skórę.

Termin „badana substancja chemiczna” jest używany w niniejszej metodzie badawczej w odniesieniu do substancji będącej przedmiotem badania, i nie jest powiązany z zastosowaniem DPRA do badania substancji lub mieszanin. Niniejsza metoda badawcza nie ma zastosowania do badania związków metali, ponieważ wiadomo, że reagują one z białkami w innych mechanizmach niż wiązania kowalencyjne. Badana substancja chemiczna powinna być rozpuszczalna w odpowiednim rozpuszczalniku o stężeniu końcowym wynoszącym 100 mM (zob. pkt 18). Badane substancje chemiczne, które nie rozpuszczają się w tym stężeniu, można mimo to nadal badać w niższych rozpuszczalnych stężeniach. W takim przypadku wynik dodatni można nadal wykorzystać celem wsparcia identyfikacji badanej substancji chemicznej jako substancji działającej uczulająco na skórę, lecz z wyniku ujemnego nie należy wyciągać żadnego rozstrzygającego wniosku dotyczącego braku reaktywności. Obecnie dostępne są ograniczone informacje na temat możliwości zastosowania DPRA w odniesieniu do mieszanin o znanym składzie (18) (19). Uważa się jednak, że istnieje techniczna możliwość zastosowania DPRA do badania substancji wieloskładnikowych i mieszanin o znanym składzie (zob. pkt 18). Przed zastosowaniem niniejszej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się, czy zastosowanie niniejszej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak – dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny. Obecny model prognozowania nie może być stosowany w odniesieniu do złożonych mieszanin o nieznanym składzie lub substancji o nieznanym lub zmiennym składzie, złożonych produktów reakcji lub materiałów biologicznych (tj. substancji UVCB) z uwagi na określony stosunek molowy badanej substancji chemicznej i peptydu. W tym celu konieczne będzie opracowanie nowego modelu prognozowania opartego na podejściu grawimetrycznym. W przypadkach, w których można przedstawić dowody na brak możliwości zastosowania omawianej metody badawczej w odniesieniu do innych konkretnych kategorii substancji chemicznych, metody tej nie należy stosować w odniesieniu do tych konkretnych kategorii substancji chemicznych.

Niniejsza metoda badawcza jest metodą *in chemico*, która nie obejmuje układu metabolicznego. Za pomocą niniejszej metody badawczej nie można wykrywać substancji chemicznych, które wymagają bioaktywacji enzymatycznej do uwolnienia swojego potencjalnego działania uczulającego na skórę (tj. prohaptenu). Istnieją dane, z których wynika, że w niektórych przypadkach za pomocą niniejszej metody badawczej prawidłowo wykrywane są substancje chemiczne, które stają się czynnikami uczulającymi po transformacji abiotycznej (tj. prehaptenu) (18). W świetle powyższego wyniki ujemne uzyskane po zastosowaniu tej metody badawczej należy interpretować w kontekście zdefiniowanych ograniczeń i w połączeniu z innymi źródłami informacji w ramach IATA. Badane substancje chemiczne, które nie wiążą się kowalencyjnie z peptydem, lecz wspierają jego utlenianie (tj. dimeryzację cysteiny), mogłyby prowadzić do potencjalnego zawyżenia oszacowania obniżenia stężenia peptydu, skutkując potencjalnymi prognozami fałszywie dodatnimi lub przypisanie do wyższej klasy reaktywności (zob. pkt 29 i 30).

Jak opisano, DPRA pozwala na rozróżnienie substancji działających uczulająco na skórę i substancji niewykazujących takiego działania. DPRA może się jednak także potencjalnie przyczynić do oceny siły działania uczulającego (11), kiedy stosuje się je w ramach podejść zintegrowanych, takich jak IATA. Wymagane jest jednak przeprowadzenie dalszych prac, najlepiej na podstawie danych dotyczących ludzi, aby ustalić, w jaki sposób wyniki DPRA mogą potencjalnie wpłynąć na ocenę siły działania.

ZASADA BADANIA

DPRA jest metodą *in chemico*, za pomocą której określa się ilościowo stężenie resztkowe peptydu zawierającego cysteinę lub lizynę po 24-godzinnej inkubacji z badaną substancją chemiczną w temperaturze $25 \pm 2,5$ °C. Tego rodzaju syntetyczne peptydy zawierają fenyloalaninę w celu ułatwienia detekcji. Względne stężenie peptydów mierzy się za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z elucją gradientową i detekcją UV na poziomie 220 nm. Następnie oblicza się wartości procentowego obniżenia stężenia peptydu zawierającego zarówno cysteinę, jak i lizynę oraz wykorzystywane w modelu prognozowania (zob. pkt 29), który pozwala na przypisanie badanej substancji chemicznej do jednej z czterech klas reaktywności stosowanych w celu uzyskania rozróżnienia substancji działających uczulająco i substancji niewykazujących takiego działania.

Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania opisanej tu metody badawczej laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną z zastosowaniem dziesięciu substancji służących do wykazania biegłości wymienionych w dodatku 2.

PROCEDURA

Niniejsza metoda badawcza opiera się na protokole DPRA DB-ALM nr 154 (20), który reprezentuje protokół wykorzystany w badaniu walidacyjnym koordynowanym przez EURL ECVAM. Zaleca się, aby ten protokół był stosowany przy wdrażaniu i stosowaniu tej metody w laboratorium. Poniżej opisano główne elementy i procedury DPRA. Jeżeli stosuje się alternatywny układ HPLC, należy wykazać jego równoważność w stosunku do zweryfikowanego układu opisanego w protokole DB-ALM (tj. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości ujętych w dodatku 2).

Przygotowanie peptydów zawierających cysteinę lub lizynę

Roztwory podstawowe cysteiny (Ac-RFAACAA-COOH) i lizyny (Ac-RFAAKAA-COOH) zawierające peptydy syntetyczne o czystości powyżej 85 %, a najlepiej w przedziale 90–95 %, powinny zostać świeżo przygotowane tuż przed ich inkubacją z badaną substancją chemiczną. Stężenie końcowe peptydu zawierającego cysteinę powinno wynosić 0,667 mM w buforze fosforanowym o pH 7,5, a stężenie końcowe peptydu zawierającego lizynę powinno wynosić 0,667 mM w roztworze buforowanym octanem amonu o pH 10,2. Należy ustalić sekwencję analiz HPLC w celu utrzymania czasu analizy HPLC wynoszącego mniej niż 30 godzin. W odniesieniu do układu HPLC stosowanego w badaniu walidacyjnym i opisanego w niniejszej metodzie badawczej w pojedynczej analizie HPLC można umieścić do 26 próbek do analizy (które zawierają badaną substancję chemiczną, kontrole dodatnie oraz odpowiednią liczbę kontroli z rozpuszczalnikiem w zależności od liczby poszczególnych rozpuszczalników wykorzystanych w badaniu, przy czym każda jest badana trzykrotnie). We wszystkich kontrpróbach badanych w ramach tej samej analizy należy stosować identyczne roztwory podstawowe peptydów zawierających cysteinę i lizynę. Zaleca się, aby przed użyciem poszczególnych partii peptydów wykazać ich odpowiednią rozpuszczalność.

Przygotowanie badanej substancji chemicznej

Przed wykonaniem testu należy ocenić rozpuszczalność badanej substancji chemicznej w odpowiednim rozpuszczalniku zgodnie z procedurą rozpuszczalności opisaną w protokole DPRA DB-ALM (20). Odpowiedni rozpuszczalnik spowoduje całkowite rozpuszczenie badanej substancji chemicznej. Ponieważ w DPRA badana substancja chemiczna jest inkubowana w dużym nadmiarze z peptydami zawierającymi cysteinę albo lizynę, uznaje się, że kontrola wizualna tworzenia się przejrzystego roztworu jest wystarczająca, aby upewnić się, że badana substancja chemiczna (i wszystkie jej składniki w przypadku badania substancji wieloskładnikowej lub mieszaniny) się rozpuściła. Odpowiednimi rozpuszczalnikami są acetonitryl, woda, mieszanina wody i acetonitrylu w stosunku 1:1, izopropanol, aceton lub mieszanina acetonu i acetonitrylu w stosunku 1:1. Inne rozpuszczalniki mogą być stosowane, o ile nie wpływają na stabilność peptydu monitorowaną z próbami kontrolnymi odniesienia C (tj. próbkami, które stanowi sam peptyd rozpuszczony w odpowiednim rozpuszczalniku; zob. dodatek 3). W ostateczności, w przypadku gdy badana substancja chemiczna nie rozpuszcza się w żadnym ze wspomnianych rozpuszczalników, należy podjąć próbę rozpuszczenia tej substancji w 300 µL sulfotlenku dimetylu i rozcieńczyć otrzymany roztwór w 2700 µL acetonitrylu, a jeżeli badana substancja chemiczna nie rozpuszcza się w tej mieszaninie, należy podjąć próbę rozpuszczenia takiej samej ilości badanej substancji chemicznej w 1500 µL sulfotlenku dimetylu i rozcieńczyć otrzymany roztwór w 1500 µL acetonitrylu. Badaną substancję chemiczną należy uprzednio odważyć do szklanych fiolek i bezpośrednio przed badaniem rozpuścić w odpowiednim rozpuszczalniku celem przygotowania roztworu o stężeniu 100 mM. W przypadku mieszanin i substancji wieloskładnikowych o znanym składzie należy ustalić jeden stopień czystości, sumując proporcje ich składników (wyłączając wodę) oraz należy ustalić jedną pozorną masę cząsteczkową, biorąc pod uwagę poszczególne masy cząsteczkowe każdego składnika mieszaniny (wyłączając wodę) i ich poszczególnych proporcji. Otrzymany stopień czystości i pozorną masę cząsteczkową należy następnie wykorzystać do obliczenia masy badanej substancji chemicznej potrzebnej do przyrządzenia roztworu o stężeniu 100 mM. W przypadku polimerów, dla których nie można ustalić dominującej masy cząsteczkowej, do celów sporządzenia roztworu o stężeniu 100 mM można wziąć pod uwagę masę cząsteczkową monomeru (lub pozorną masę cząsteczkową poszczególnych monomerów składających się na polimer). Podczas badania mieszanin, substancji wieloskładnikowych lub polimerów o znanym składzie należy jednak również rozważyć zbadanie czystej substancji chemicznej. W przypadku cieczy czystą substancję chemiczną należy zbadać jako taką bez uprzedniego rozcieńczenia przez inkubowanie jej w stosunku molowym 1:10 i 1:50 odpowiednio z peptydami zawierającymi cysteinę i lizynę. W przypadku substancji stałych badaną substancję chemiczną należy rozpuścić do osiągnięcia jej maksymalnego rozpuszczalnego stężenia w tym samym rozpuszczalniku, który wykorzystano do sporządzenia roztworu pozornego o stężeniu 100 mM. Wspomnianą substancję należy następnie zbadać bez dalszego rozcieńczenia przez inkubowanie jej w stosunku molowym 1:10 i 1:50 odpowiednio z peptydami zawierającymi cysteinę i lizynę. Zbieżne wyniki (reaktywne lub niereaktywne) między roztworem pozornym o stężeniu 100 mM a czystą substancją chemiczną powinny umożliwić wyciągnięcie jednoznacznego wniosku co do rezultatu.

Przygotowanie próby kontrolnej dodatniej, prób kontrolnych odniesienia i prób kontrolnych koelucji

Aldehyd cynamonowy (CAS 104-55-2; czystość oznaczająca zdatność do celów spożywczych na poziomie $\geq 95\%$) należy stosować jako próbę kontrolną dodatnią w stężeniu 100 mM w acetonitrylu. Inne odpowiednie substancje służące do kontroli dodatniej, najlepiej zapewniające średnie wartości obniżenia stężenia, mogą być stosowane, jeżeli są dostępne dane historyczne pozwalające na uzyskanie porównywalnych kryteriów dopuszczalności serii. Ponadto próby kontrolne odniesienia (tj. próbki zawierające tylko peptyd rozpuszczony w odpowiednim rozpuszczalniku) także powinny być zawarte w sekwencji analiz HPLC i one są stosowane do weryfikacji odpowiedności układu HPLC przed analizą (próby kontrolne odniesienia A), stabilności prób kontrolnych odniesienia w miarę upływu czasu (próby kontrolne odniesienia B) i celem zweryfikowania, że rozpuszczalnik użyty do rozpuszczania badanej substancji chemicznej nie ma wpływu na procentowe obniżenie stężenia peptydu (próby kontrolne odniesienia C) (zob. dodatek 3). W odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej stosuje się odpowiednią próbę kontrolną odniesienia w celu obliczenia procentowego obniżenia stężenia peptydu dla danej substancji chemicznej (zob. pkt 26). Ponadto w odniesieniu do każdej z badanych substancji chemicznych w sekwencji analiz należy uwzględnić próbę kontrolną koelucji składającą się z samej badanej substancji chemicznej celem wykrycia możliwej koelucji badanej substancji chemicznej z peptydem zawierającym lizynę albo cysteinę.

Inkubacja badanej substancji chemicznej z roztworami z peptydem zawierającym cysteinę i lizynę.

Roztwory z peptydem zawierającym cysteinę i lizynę należy inkubować w szklanych fiolkach z autosamplerem z badaną substancją chemiczną w stosunku molowym odpowiednio 1:10 i 1:50. Jeśli bezpośrednio po dodaniu roztworu z badaną substancją chemiczną do roztworu z peptydem zostanie zauważony osad spowodowany niską rozpuszczalnością badanej substancji chemicznej w wodzie, wówczas nie można mieć pewności, jak duża ilość badanej substancji chemicznej pozostała w roztworze i wejdzie w reakcję z peptydem. W takim przypadku wynik dodatni można zatem nadal wykorzystać, lecz wynik ujemny jest niepewny i należy go interpretować z należytą ostrożnością (zob. także przepisy pkt 11 dotyczące badania substancji chemicznych nierozpuszczalnych w stężeniu do 100 mM). Powstały w wyniku reakcji roztwór należy pozostawić bez dostępu światła w temperaturze $25 \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 24 ± 2 godziny przed przeprowadzeniem analizy HPLC. Każdą badaną substancję chemiczną należy analizować trzykrotnie w odniesieniu do obydwu peptydów. Przed wykonaniem analizy HPLC trzeba przeprowadzić kontrolę wzrokową próbek. Jeżeli zauważy się osad lub rozdzielanie faz, próbki można poddać wirowaniu przy małej prędkości (100–400 xg) w celu wytrącenia osadu na dnie fiołki jako środek ostrożności, ponieważ duże ilości osadu mogą zapchać dreny lub kolumny układu HPLC. Jeżeli po okresie inkubacji zostanie zauważone strącanie lub rozdzielanie faz, obniżenie stężenia peptydu może być niedoszacowane i w przypadku wyniku ujemnego nie można z dostateczną pewnością wyciągnąć wniosku o braku reaktywności.

Przygotowanie krzywej wzorcowej do analizy HPLC

Należy wyznaczyć krzywą wzorcową zarówno w odniesieniu do peptydu zawierającego cysteinę, jak i do peptydu zawierającego lizynę. Wzorce peptydów należy przygotować w 20- lub 25-procentowym roztworze buforowym acetonitrylu z buforem fosforanowym (pH 7,5) w przypadku peptydu zawierającego cysteinę i roztworze buforowanym octanem amonu (pH 10,2) w przypadku peptydu zawierającego lizynę. W przypadku stosowania wzorcowych serii stężeń wzrastających w postępie geometrycznym roztworu podstawowego z peptydem (0,667 mM) należy sporządzić 6 roztworów wzorcowych w celu pokrycia zakresu od 0,534 do 0,0167 mM. W krzywej wzorcowej należy również uwzględnić próbę ślepa roztworu buforowego do rozcieńczenia. Odpowiednie krzywe wzorcowe powinny mieć $r^2 > 0,99$.

Przygotowanie i analiza HPLC

Przed przeprowadzaniem analizy należy zweryfikować, czy układ HPLC jest odpowiedni. Obniżenie stężenia peptydu monitoruje się za pomocą HPLC w połączeniu z detektorem UV (detektor fotodiodowy lub detektor absorbancji o stałej długości fali z sygnałem 220 nm). W układzie HPLC instaluje się odpowiednią kolumnę. W układzie HPLC opisanym w zatwierdzonym protokole stosuje się Zorbax SB-C-18 2,1 mm \times 100 mm \times 3,5 mikrona jako preferowaną kolumnę. Z taką kolumną w odwróconym układzie faz HPLC cały układ należy

pozostawić w temperaturze 30 °C z 50-proc. fazą A (0,1-procentowy (obj.) kwas trifluorooctowy w wodzie) i 50-proc. fazą B (0,085-procentowy (obj.) kwas trifluorooctowy w acetonitrylu) na co najmniej 2 godziny przed analizą. Analizę HPLC należy przeprowadzać z zastosowaniem natężenia przepływu wynoszącego 0,35 ml/min i gradientu liniowego z 10- – 25-procentowym acetonitrylem przez 10 minut, po czym konieczny jest szybki wzrost do 90-proc. acetonitrylu celem usunięcia pozostałych materiałów. Należy wstrzyknąć jednakowe ilości substancji wzorcowej, badanej i kontrolnej. Pomiedzy wstrzyknięciami kolumnę należy ponownie pozostawić w warunkach początkowych na 7 minut. Jeżeli stosuje się inną kolumnę w odwróconym układzie faz HPLC, konieczne będzie dostosowanie opisanych powyżej parametrów początkowych w celu zagwarantowania odpowiedniej elucji i integracji peptydów zawierających cysteinę i lizynę, w tym objętość iniekcji, która może się różnić w zależności od zastosowanego układu (zwykle w zakresie 3–10 µl). Należy zauważyć, że jeżeli stosuje się alternatywny układ HPLC, należy wykazać jego równoważność w stosunku do zweryfikowanego układu opisanego powyżej (tj. poprzez badanie substancji służących do wykazania bieglności ujętych w dodatku 2). Absorbancję monitoruje się przy 220 nm. Jeśli stosuje się detektor fotodiodowy, należy także odnotować absorbancję przy 258 nm. Należy wziąć pod uwagę fakt, że niektóre dostawy acetonitrylu mogą wywierać negatywny wpływ na stabilność peptydu i trzeba to ocenić przy stosowaniu nowej partii acetonitrylu. Jako wskaźnik koelucji można stosować stosunek powierzchni piku 220 i powierzchni piku 258. Dla każdej próbki stosunek znajdujący się w przedziale 90 % < średni (!) stosunek powierzchni dla próbek kontrolnych < 100 % stanowiłby dobry wskaźnik, że koelucja nie nastąpiła.

Niektóre badane substancje chemiczne mogą wspierać utlenianie peptydu zawierającego cysteinę. Pík dimeryzowanego peptydu zawierającego cysteinę można monitorować wzrokowo. Jeżeli wydaje się, że nastąpiła dimeryzacja, należy to odnotować, ponieważ procentowe obniżenie stężenia peptydu może być przeszacowane, co prowadzi do prognoz fałszywie dodatnich lub przypisania do wyższej klasy reaktywności (zob. pkt 29 i 30).

Analizę HPLC w odniesieniu do peptydów zawierających cysteinę i lizynę można przeprowadzać jednocześnie (jeśli dostępne są dwa układy HPLC) lub w różnych dniach. Jeśli analiza jest przeprowadzana w różnych dniach, wówczas wszystkie roztwory badanej substancji chemicznej powinny być świeżo przygotowane dla obu oznaczeń w każdym dniu. Należy odnotowywać czas analizy w celu zapewnienia, aby iniekcja pierwszej próbki rozpoczęła się 22–24 godzin po zmieszaniu badanej substancji chemicznej z roztworem z peptydem. Należy ustalić sekwencję analiz HPLC w celu utrzymania czasu analizy HPLC wynoszącego mniej niż 30 godzin. W odniesieniu do układu HPLC stosowanego w badaniu walidacyjnym i opisanego w niniejszej metodzie badawczej w pojedynczej analizie HPLC można umieścić do 26 próbek do analizy (zob. także pkt 17). Przykład sekwencji analizy HPLC jest podany w dodatku 3.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Ocena danych

Stężenie peptydu zawierającego cysteinę lub lizynę określa się w każdej próbce fotometrycznie przy 220 nm, mierząc powierzchnię piku (pole pod krzywą) odpowiednich pików oraz obliczając stężenie peptydu z zastosowaniem liniowej krzywej wzorcowej wyprowadzonej z wzorców.

Procentowe obniżenie stężenia peptydu określa się w każdej próbce, mierząc powierzchnię piku i dzieląc ją przez średnią powierzchnię piku odpowiednich prób kontrolnych odniesienia C (zob. dodatek 3) zgodnie z wzorem opisanym poniżej.

$$\text{Proc. obniżenie stężenia peptydu} = \left[1 - \left(\frac{\text{Powierzchnia piku peptydu w iniekcji kontrpróby}}{\text{Śr. pow. piku peptydu prób kontr. odniesienia C}} \right) \right] \times 100$$

Kryteria dopuszczalności

Aby analiza została uznana za ważną, powinny być spełnione następujące kryteria:

- a) krzywa wzorcowa powinna mieć $r^2 > 0,99$;

(!) W całym dokumencie średnia oznacza średnią arytmetyczną.

- b) średnia wartość procentowego obniżenia stężenia peptydu we wszystkich trzech kontrpróbach kontroli dodatniej z aldehydem cynamonowym powinna zawierać się w przedziale 60,8–100 % w przypadku peptydu zawierającego cysteinę i w przedziale 40,2–69,0 % w przypadku peptydu zawierającego lizynę, a maksymalne odchylenie standardowe kontrprób kontroli dodatniej powinno wynosić < 14,9 % w przypadku procentowego obniżenia stężenia cysteiny i < 11,6 % w przypadku procentowego obniżenia stężenia lizyny; oraz
- c) średnie stężenie peptydu w próbach kontrolnych odniesienia A powinno mieścić się w przedziale 0,50–± 0,05 mM, a współczynnik zmienności powierzchni piku peptydu dla wszystkich dziewięciu prób kontrolnych odniesienia B i C w acetonitrylu powinien wynosić < 15,0 %.

Jeśli co najmniej jedno z powyższych kryteriów nie jest spełnione, analizę należy powtórzyć.

Aby wyniki badania substancji chemicznej zostały uznane za ważne, powinny być spełnione następujące kryteria:

- a) maksymalne odchylenie standardowe dla kontrprób z badaną substancją chemiczną powinno wynosić < 14,9 % w przypadku procentowego obniżenia stężenia cysteiny i < 11,6 % w przypadku procentowego obniżenia stężenia lizyny,
- b) średnie stężenie peptydu dla wszystkich trzech prób kontrolnych odniesienia C w odpowiednim rozpuszczalniku powinno zawierać się w przedziale 0,50–± 0,05 mM. Jeśli powyższe kryteria nie są spełnione, dane powinny zostać odrzucone i należy powtórzyć analizę dla tej konkretnej badanej substancji chemicznej.

Model prognozowania

Dla każdej badanej substancji chemicznej oblicza się średnią wartość obniżenia stężenia cysteiny i lizyny. Ujemne obniżenie stężenia uznaje się przy obliczaniu średniej za „0”. Stosując model prognozowania z cysteiną w stosunku 1:10 / lizyną w stosunku 1:50 pokazany w tabeli 1, należy zastosować próg na poziomie 6,38 % średniego obniżenia stężenia peptydu jako pomoc w rozróżnieniu substancji działających uczulająco na skórę i substancji niewykazujących takiego działania w ramach IATA. Zastosowanie modelu prognozowania w celu przypisania badanej substancji chemicznej do klasy reaktywności (tj. niska, umiarkowana i wysoka reaktywność) może okazać się użyteczne na potrzeby oceny siły działania w ramach IATA.

Tabela 1

Model prognozowania ⁽¹⁾ z cysteiną w stosunku 1:10 / lizyną w stosunku 1:50

Średnie procentowe obniżenie stężenia cysteiny i lizyny	Klasa reaktywności	Prognoza DPRA ⁽²⁾
0 % ≤ średnie procentowe obniżenie stężenia ≤ 6,38 %	Brak reaktywności lub minimalna reaktywność	Ujemny
6,38 % < średnie procentowe obniżenie stężenia ≤ 22,62 %	Niska reaktywność	Dodatni
22,62 % < średnie procentowe obniżenie stężenia ≤ 42,47 %	Umiarkowana reaktywność	
42,47 % < średnie procentowe obniżenie stężenia ≤ 100 %	Wysoka reaktywność	

⁽¹⁾ Liczby odnoszą się do statystycznie wygenerowanych wartości progowych i nie są związane z precyzją pomiaru.

⁽²⁾ Prognozę DPRA należy rozpatrywać w ramach IATA i zgodnie z przepisami pkt 9 i 12.

Mogą zdarzyć się sytuacje, w których badana substancja chemiczna (substancja albo jeden składnik lub kilka składników substancji wieloskładnikowej lub mieszaniny) będzie znacznie absorbowała przy stężeniu 220 nm i będzie miała taki sam czas retencji jak peptyd (koelucja). Problem koelucji można rozwiązać poprzez nieznaczne wyregulowanie układu HPLC w celu dodatkowego oddzielenia czasu elucji badanej substancji chemicznej i peptydu. Jeżeli stosuje się alternatywny układ HPLC w celu rozwiązania problemu koelucji, należy wykazać jego równoważność w stosunku do zweryfikowanego układu opisanego powyżej (tj. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości ujętych w dodatku 2). W przypadku wystąpienia koelucji pik peptydu nie będzie mógł zostać zintegrowany i obliczenie procentowego obniżenia stężenia peptydu nie będzie możliwe. Jeżeli koelucja takich badanych substancji chemicznych wystąpi zarówno w odniesieniu do peptydów zawierających cysteinę, jak i do peptydów zawierających lizynę, analizę należy zgłosić jako niejednoznaczną. W przypadku gdy koelucja wystąpi tylko w przypadku peptydu zawierającego lizynę, wówczas można zastosować model prognozowania z cysteiną w stosunku 1:10 opisany w tabeli 2.

Tabela 2

Model prognozowania ⁽¹⁾ z cysteiną w stosunku 1:10

Procentowe obniżenie stężenia cysteiny	Klasa reaktywności	Prognoza DPRA ⁽²⁾
0 % ≤ procentowe obniżenie stężenia cysteiny ≤ 13,89 %	Brak reaktywności lub minimalna reaktywność	Ujemny
13,89 % < procentowe obniżenie stężenia cysteiny ≤ 23,09 %	Niska reaktywność	Dodatni
23,09 % < procentowe obniżenie stężenia cysteiny ≤ 98,24 %	Umiarkowana reaktywność	
98,24 % < procentowe obniżenie stężenia cysteiny ≤ 100 %	Wysoka reaktywność	

⁽¹⁾ Liczby odnoszą się do statystycznie wygenerowanych wartości progowych i nie są związane z precyzją pomiaru.

⁽²⁾ Prognozę DPRA należy rozpatrywać w ramach IATA i zgodnie z przepisami pkt 9 i 12.

Mogą zdarzyć się też inne sytuacje, w których nakładanie się czasu retencji badanej substancji chemicznej i jednego z peptydów będzie niepełne. W takich przypadkach można oszacować wartości procentowego obniżenia stężenia peptydu i wykorzystać je w modelu prognozowania z cysteiną w stosunku 1:10 / lizyną w stosunku 1:50, nie można jednak precyzyjnie przypisać badanej substancji chemicznej do klasy reaktywności.

Pojedyncza analiza HPLC zarówno dla peptydu zawierającego cysteinę, jak i dla peptydu zawierającego lizynę powinna być wystarczająca dla badanej substancji chemicznej, w przypadku gdy wynik jest jednoznaczny. Jednakże w przypadku wyników zbliżonych do progu stosowanego w celu rozróżnienia wyników dodatnich i ujemnych (tj. wyników granicznych), mogą być potrzebne dodatkowe badania. W sytuacjach, w których średnie procentowe obniżenie stężenia zawiera się w przedziale 3–10 % w przypadku modelu prognozowania z cysteiną w stosunku 1:10 / lizyną w stosunku 1:50 lub procentowe obniżenie stężenia cysteiny zawiera się w przedziale 9–17 % w przypadku modelu prognozowania z cysteiną w stosunku 1:10, należy rozważyć przeprowadzenie drugiej analizy, a także trzeciej analizy w przypadku rozbieżnych wyników dwóch pierwszych analiz.

Sprawozdanie z badania

Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

— Substancja jednoskładnikowa

— dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory;

- wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie;
 - czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;
 - postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);
 - badane stężenie(-a);
 - warunki przechowywania i stabilności w dostępnym zakresie.
- Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszanina:
- opisana w miarę możliwości np. poprzez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), czystości, przedstawienie informacji dotyczących występowania ilościowego oraz wskazanie istotnych właściwości fizykochemicznych składników (zob. powyżej);
 - wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie;
 - masa cząsteczkowa lub pozorna masa cząsteczkowa w przypadku mieszanin lub polimerów o znanym składzie lub inne informacje istotne dla przebiegu badania;
 - postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);
 - badane stężenie(-a);
 - warunki przechowywania i stabilności w dostępnym zakresie.

Kontrole

- Kontrola dodatnia
 - dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory;
 - wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie;
 - czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;
 - postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);
 - badane stężenie(-a);
 - warunki przechowywania i stabilności w dostępnym zakresie;
 - odniesienie do wyników historycznych kontroli dodatnich wykazuje odpowiednie kryteria dopuszczalności serii, w stosownych przypadkach.
- Kontrola z rozpuszczalnikiem/nośnikiem
 - stosowany rozpuszczalnik/nośnik i stosunek ich elementów składowych, jeżeli są dostępne;
 - dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS lub inne identyfikatory;
 - czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;
 - wygląd fizyczny, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne w przypadku stosowania innych rozpuszczalników/nośników niż te opisane w metodzie badawczej, w dostępnym zakresie;
 - warunki przechowywania i stabilności w dostępnym zakresie;

- uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej;
- w odniesieniu do acetonitrylu wyniki badania wpływu na stabilność peptydu.

Przygotowanie peptydów, kontroli dodatniej i badanej substancji chemicznej

- charakterystyka roztworów z peptydami (dostawca, partia, dokładna masa peptydu, ilość dodana do roztworu podstawowego);
- charakterystyka roztworu do kontroli dodatniej (dokładna masa substancji służącej do kontroli dodatniej, objętość dodana do roztworu do badań);
- charakterystyka roztworów z badaną substancją chemiczną (dokładna masa badanej substancji chemicznej, ilość dodana do roztworu do badań).

Ustawienia przyrządu do HPLC oraz analiza HPLC

- rodzaj przyrządu do HPLC, kolumny układu HPLC i kolumny osłonowe, detektor i autosampler;
- parametry istotne dla analizy HPLC, takie jak: temperatura kolumny, objętości iniekcji, natężenie przepływu i gradient.

Odpowiedniość układu

- powierzchnia pików peptydu przy stężeniu 220 nm dla każdej kontrpróby z substancją wzorcową i próbą kontrolną odniesienia A;
- liniowa krzywa wzorcowa przedstawiona graficznie i odnotowana jako r^2 ;
- stężenie peptydu kontrpróby z próbą kontrolną odniesienia A;
- średnie stężenie peptydu (mM) dla wszystkich trzech prób kontrolnych odniesienia A, SD i CV;
- stężenie peptydu dla prób kontrolnych odniesienia A i C.

Sekwencja przeprowadzania analizy

- W odniesieniu do prób kontrolnych odniesienia:
 - powierzchnia pików peptydu przy stężeniu 220 nm dla każdej kontrpróby B i C;
 - średnia powierzchnia pików peptydu przy stężeniu 220 nm dla wszystkich dziewięciu prób kontrolnych odniesienia B i C w acetonitrylu, SD i CV (aby uzyskać stabilność prób kontrolnych odniesienia w czasie analizy);
 - w odniesieniu do każdego stosowanego rozpuszczalnika – średnia powierzchnia pików peptydu przy stężeniu 220 nm dla wszystkich trzech odpowiednich prób kontrolnych odniesienia C (celem obliczenia procentowego obniżenia stężenia peptydu);
 - w odniesieniu do każdego stosowanego rozpuszczalnika – stężenie peptydu (mM) dla wszystkich trzech odpowiednich prób kontrolnych odniesienia C;
 - w odniesieniu do każdego stosowanego rozpuszczalnika – średnie stężenie peptydu (mM) dla wszystkich trzech odpowiednich prób kontrolnych odniesienia C, SD i CV.
- W odniesieniu do kontroli dodatniej:
 - powierzchnia pików peptydu przy stężeniu 220 nm dla każdej kontrpróby;
 - procentowe obniżenie stężenia peptydu dla każdej kontrpróby;
 - średnie procentowe obniżenie stężenia peptydu dla wszystkich trzech kontrprób, SD i CV.
- W odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej:
 - wygląd osadu w mieszaninie powstałej w wyniku reakcji po zakończeniu czasu inkubacji, jeśli osad został zaobserwowany. Czy osad został ponownie rozpuszczony lub odwirowany;

- występowanie koelucji;
- w stosownych przypadkach opis wszelkich innych istotnych obserwacji;
- powierzchnia pików peptydu przy stężeniu 220 nm dla każdej kontrpróby;
- procentowe obniżenie stężenia peptydu dla każdej kontrpróby;
- średnie procentowe obniżenie stężenia peptydu dla wszystkich trzech kontrprób, SD i CV;
- średnie wartości procentowego obniżenia stężenia cysteiny i lizyny;
- zastosowany model prognozowania i prognoza DPRA.

Badanie biegłości

- w stosownych przypadkach procedura stosowana w celu wykazania biegłości laboratorium w zakresie przeprowadzania metody badawczej (tj. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości) lub do wykazania odtwarzalnego przeprowadzania metody badawczej w miarę upływu czasu.

Omówienie wyników

- omówienie wyników uzyskanych za pomocą metody badawczej DPRA;
- omówienie wyników zastosowania metody badawczej w kontekście IATA, jeżeli są dostępne inne odpowiednie informacje.

Wniosek

BIBLIOGRAFIA

- (1) Organizacja Narodów Zjednoczonych (ONZ) (2013). Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS). Wydanie piąte zmienione, ONZ Nowy Jork i Genewa, 2013. Dostępne na stronie internetowej: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Seria dotycząca badań i oceny nr 168, OECD, Paryż.
- (3) Rozdział B.6 niniejszego załącznika: Działanie uczulające na skórę.
- (4) Rozdział B.42 niniejszego załącznika: Test lokalnych węzłów chłonnych
- (5) Rozdział B.50 niniejszego załącznika: Działanie uczulające na skórę: test lokalnych węzłów chłonnych: DA.
- (6) Rozdział B.51 niniejszego załącznika: Działanie uczulające na skórę: Test lokalnych węzłów chłonnych BrdU-ELISA
- (7) Adler *et al.* (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Archives of Toxicology* 85:367–485.
- (8) Gerberick *et al.* (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicological Sciences* 81, s. 332–343.
- (9) Gerberick *et al.* (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. *Toxicological Sciences* 97:417–427.
- (10) EURL-ECVAM UE (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Dostępne na stronie internetowej: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra>
- (11) Jaworska *et al.* (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. *Journal of Applied Toxicology*, opublikowany w internecie, 14 maja 2013 r., DOI: 10.1002/jat.2869.

- (12) Bauch *et al.* (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 63: 489–504.
 - (13) Nukada *et al.* (2013). Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. *Toxicology in vitro* 27, s. 609–618.
 - (14) Ball *et al.* (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 60:389–400.
 - (15) Landsteiner i Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *Journal of Experimental Medicine* 64:625–639.
 - (16) Dupuis i Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. Nowy Jork i Bazylea: Marcel Dekker Inc.
 - (17) Lepoittevin *et al.* (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.
 - (18) EURL ECVAM UE (2012) Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report, 74 s. Dostępny na stronie internetowej: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra
 - (19) Natsch *et al.* (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, opublikowany w internecie, 9 kwietnia 2013 r., DOI:10.1002/jat.2868.
 - (20) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing, 17 s. Dostępny na stronie internetowej: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
 - (21) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Seria OECD dotycząca badań i oceny nr 34, Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju, Paryż, Francja.
 - (22) FDA (Urząd ds. Żywności i Leków) (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, 22 s. Dostępny na stronie internetowej: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf – 138
 - (23) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. Europejskie Centrum ds. Ekotoksykologii i Toksykologii Substancji Chemicznych (sprawozdanie techniczne nr 87).
-

Dodatek 1

DEFINICJE

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

Mechanizm wywoływania skutków szkodliwych: sekwencja zdarzeń, począwszy od struktury chemicznej docelowej substancji chemicznej lub grupy podobnych substancji chemicznych poprzez molekularne zdarzenie inicjujące aż do pożądanego wyniku *in vivo* (2).

Krzywa wzorcowa: zależność między wartością odpowiedzi doświadczalnej a stężeniem analitycznym (zwana także krzywą kalibracyjną) znanej substancji.

Substancja chemiczna: substancja albo mieszanina.

Współczynnik zmienności: miara zmienności wyliczana dla grupy danych dla powtórzeń poprzez podzielenie odchylenia standardowego przez średnią arytmetyczną. Aby przedstawić go w postaci procentowej, można pomnożyć go przez 100.

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

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

Molekularne zdarzenie inicjujące: indukowane chemicznie zakłócenie układu biologicznego na poziomie molekularnym, które zostało uznane za zdarzenie inicjujące w mechanizmie wywoływania skutków szkodliwych.

Mieszanina: mieszanina lub roztwór, które składają się z dwóch lub więcej substancji niewchodzących ze sobą w reakcję (1).

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

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

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

Próba kontrolna odniesienia: próbka niepoddana działaniu badanej substancji, zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, w tym rozpuszczalnik lub nośnik; jest przetwarzana razem z próbkami poddanymi działaniu badanej substancji oraz z innymi próbkami kontrolnymi w celu określenia wyjściowej reakcji dla próbek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w tym samym rozpuszczalniku lub nośniku. W przypadku badania z jednoczesną kontrolą ujemną próbka ta wykazuje również, czy rozpuszczalnik lub nośnik wchodzi w reakcję z układem badawczym.

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

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

Odtwarzalność: zgodność wyników uzyskanych w wyniku badania tej samej substancji chemicznej przy użyciu tego samego protokołu badania (zob. wiarygodność) (21).

Czułość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik dodatni / aktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą danej metody badawczej. Jest to miara dokładności metody badawczej, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności metody badawczej (21).

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

Substancja: pierwiastki chemiczne i ich związki w stanie naturalnym lub uzyskane w wyniku dowolnego procesu produkcyjnego, w tym wszelkie dodatki konieczne do zachowania trwałości produktu i wszelkie zanieczyszczenia powstałe w wyniku zastosowanego procesu, z wyłączeniem wszelkich rozpuszczalników, które można oddzielić bez wpływu na stabilność substancji i bez zmiany jej składu (1).

Odpowiedniość układu: określenie wydajności (np. czułości) przyrządu za pomocą analizy wzorca dokonanej przed rozpoczęciem partii analitycznej (22).

Badana substancja chemiczna: termin „badana substancja chemiczna” jest używany w odniesieniu do substancji będącej przedmiotem badania.

Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (GHS ONZ): system, w ramach którego proponuje się klasyfikację substancji chemicznych (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz omawia się odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak: piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki substancji i produktów niebezpiecznych, aby przekazać informacje na temat ich szkodliwego działania w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) i środowiska (1).

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

Właściwa metoda badawcza: metoda badawcza, którą uznano za wystarczająco istotną i wiarygodną dla danego celu i która opiera się na uzasadnionych naukowo podstawach. Metoda badawcza nie może zostać uznana za właściwą w sensie absolutnym, ale tylko w odniesieniu do określonego celu (21).

Dodatek 2

SUBSTANCJE SŁUŻĄCE DO WYKAZANIA BIEGŁOŚCI

Działanie uczulające na skórę *in chemico*: bezpośrednie oznaczenie reaktywności peptydów (DPRA)

Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania niniejszej metody badawczej laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną, uzyskując oczekiwaną prognozę DPRA dla 10 substancji do oceny biegłości wskazanych w tabeli 1 oraz uzyskując wartości obniżenia stężenia cysteiny i lizyny, które mieszczą się w odpowiednim zakresie odniesienia dla 8 z 10 substancji służących do wykazania biegłości dla każdego peptydu. Substancje służące do wykazania biegłości wybrano w taki sposób, aby odzwierciedlić zakres reakcji na zagrożenia związane z działaniem uczulającym na skórę. Przy wyborze substancji kierowano się również następującymi kryteriami: dostępnością handlową, dostępnością wysokiej jakości danych referencyjnych z badań *in vivo* oraz danych z badań *in vitro* uzyskanych za pomocą DPRA oraz faktem, że zostały one wykorzystane w badaniu walidacyjnym koordynowanym przez EURL ECVAM w celu wykazania udanego wdrożenia niniejszej metody badawczej w laboratoriach biorących udział w badaniu.

Tabela 1

Zalecane substancje służące do wykazania biegłości technicznej w zakresie bezpośredniego oznaczania reaktywności peptydów

Substancje służące do wykazania biegłości	Numer CAS	Stan skupienia	Prognoza <i>in vivo</i> (1)	Prognoza DPRA (2)	Zakres (3) obniżenia stężenia peptydu zawierającego cysteinę w %	Zakres (3) obniżenia stężenia peptydu zawierającego lizynę w %
2,4-chlorodinitrobenzen	97-00-7	Substancja stała	Czynnik uczulający (wyjątkowo silny)	Dodatni	90–100	15–45
Oksazolon	15646-46-5	Substancja stała	Czynnik uczulający (wyjątkowo silny)	Dodatni	60–80	10–55
Formaldehyd	50-00-0	Ciecz	Czynnik uczulający (silny)	Dodatni	30–60	0–24
Benzylidenoaceton	122-57-6	Substancja stała	Czynnik uczulający (umiarkowany)	Dodatni	80–100	0–7
Farnezał	19317-11-4	Ciecz	Czynnik uczulający (słaby)	Dodatni	15–55	0–25
2,3-butanodion	431-03-8	Ciecz	Czynnik uczulający (słaby)	Dodatni	60–100	10–45
1-butanol	71-36-3	Ciecz	Brak działania uczulającego	Ujemny	0–7	0–5,5
6-metylokumaryna	92-48-8	Substancja stała	Brak działania uczulającego	Ujemny	0–7	0–5,5

Substancje służące do wykazania biegłości	Numer CAS	Stan skupienia	Prognoza <i>in vivo</i> ⁽¹⁾	Prognoza DPRA ⁽²⁾	Zakres ⁽³⁾ obniżenia stężenia peptydu zawierającego cysteinę w %	Zakres ⁽³⁾ obniżenia stężenia peptydu zawierającego lizynę w %
Kwas mlekowy	50-21-5	Ciecz	Brak działania uczulającego	Ujemny	0–7	0–5,5
4-metoksyacetofenon	100-06-1	Substancja stała	Brak działania uczulającego	Ujemny	0–7	0–5,5

⁽¹⁾ Zagrożenie i prognozy (siły działania) *in vivo* są oparte na danych z badania LLNA (19). Siłę działania *in vivo* określa się na podstawie kryteriów zaproponowanych przez ECETOC (23).

⁽²⁾ Prognozę DPRA należy rozpatrywać w ramach IATA i zgodnie z przepisami pkt 9 i 11.

⁽³⁾ Zakresy wyznaczone na podstawie co najmniej 10 wartości obniżenia stężenia uzyskanych przez 6 niezależnych laboratoriów.

Dodatek 3

PRZYKŁADOWA SEKWENCJA ANALIZY

Wzorce i próby kontrolne odniesienia	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 Roztwór buforowy do rozcieńczania: Próba kontrolna odniesienia A, kontrpróba 1 Próba kontrolna odniesienia A, kontrpróba 2 Próba kontrolna odniesienia A, kontrpróba 3
Próby kontrolne koelucji	Próba kontrolna koelucji 1 dla badanej substancji chemicznej 1 Próba kontrolna koelucji 2 dla badanej substancji chemicznej 2
Próby kontrolne odniesienia	Próba kontrolna odniesienia B, kontrpróba 1 Próba kontrolna odniesienia B, kontrpróba 2 Próba kontrolna odniesienia B, kontrpróba 3
Pierwsza seria kontrprób	Próba kontrolna odniesienia C, kontrpróba 1 Aldehyd cynamonowy, kontrpróba 1 Próba 1, kontrpróba 1 Próba 2, kontrpróba 1
Druga seria kontrprób	Próba kontrolna odniesienia C, kontrpróba 2 Aldehyd cynamonowy, kontrpróba 2 Próba 1, kontrpróba 2 Próba 2, kontrpróba 2
Trzecia seria kontrprób	Próba kontrolna odniesienia C, kontrpróba 3 Aldehyd cynamonowy, kontrpróba 3 Próba 1, kontrpróba 3 Próba 2, kontrpróba 3
Próby kontrolne odniesienia	Próba kontrolna odniesienia B, kontrpróba 4 Próba kontrolna odniesienia B, kontrpróba 5 Próba kontrolna odniesienia B, kontrpróba 6

W sekwencji analizy należy uwzględnić trzy zestawy prób kontrolnych odniesienia (tj. prób składających się wyłącznie z peptydu rozpuszczonego w odpowiednim rozpuszczalniku):

próba kontrolna odniesienia A: stosowana w celu weryfikacji odpowiedniości układu HPLC;

próba kontrolna odniesienia B: stosowana na początku i na końcu sekwencji analizy w celu weryfikacji stabilności prób kontrolnych odniesienia w czasie analizy;

próba kontrolna odniesienia C: stosowana w sekwencji analizy w celu zweryfikowania, czy rozpuszczalnik zastosowany do rozpuszczenia badanej substancji chemicznej nie wpływa na procentowe obniżenie stężenia peptydu.

B.60 Badanie działania uczulającego na skórę *in vitro*: metoda badawcza z wykorzystaniem lucyferazy ARE-Nrf2

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 442D (2015). Substancja działająca uczulająco na skórę oznacza substancję, która wywołuje reakcję alergiczną w następstwie kontaktu ze skórą, określoną przez Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów ONZ (ONZ GHS) (1) oraz rozporządzenie Unii Europejskiej (WE) 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin (CLP).⁽¹⁾ W niniejszej metodzie badawczej przedstawiono procedurę *in vitro* (badanie z wykorzystaniem lucyferazy ARE-Nrf2), którą należy stosować uzupełniająco w celu rozróżnienia substancji działających uczulająco na skórę i substancji niewykazujących takiego działania zgodnie z GHS ONZ (1) i rozporządzeniem CLP.

Panuje ogólna zgoda co do kluczowych zdarzeń biologicznych stanowiących podstawę działania uczulającego na skórę. Istniejącą wiedzę dotyczącą mechanizmów chemicznych i biologicznych powiązanych z działaniem uczulającym na skórę podsumowano w formie mechanizmu wywoływania skutków szkodliwych (2), poczynawszy od molekularnego zdarzenia inicjującego poprzez zdarzenia pośrednie aż do niekorzystnego skutku dla zdrowia, tj. alergicznego kontaktowego zapalenia skóry u ludzi lub nadwrażliwości kontaktowej u gryzoni (2) (3). Molekularnym zdarzeniem inicjującym jest wiązanie kowalencyjne substancji elektrofilowych z centrami nukleofilowymi w białkach skóry. Drugie kluczowe zdarzenie w tym mechanizmie wywoływania skutków szkodliwych następuje w keratynocytach i obejmuje reakcje zapalne oraz ekspresję genów powiązaną ze specyficznymi mechanizmami sygnalizacji komórkowej, takimi jak mechanizmy zależne od elementu odpowiedzi antyoksydacyjnej/elektrofilowej (ARE). Trzecim kluczowym zdarzeniem jest aktywacja komórek dendrytycznych, na ogół oceniana na podstawie ekspresji specyficznych markerów powierzchniowych komórki, chemokinów i cytokinów. Czwartym kluczowym zdarzeniem jest proliferacja limfocytów T, która jest oceniana pośrednio w ramach testu lokalnych węzłów chłonnych przeprowadzonego na myszach (4).

Ocena działania uczulającego na skórę obejmuje na ogół wykorzystanie zwierząt laboratoryjnych. Klasyczne metody oparte o wykorzystanie świnek morskich, tj. test maksymalizacji na świnkach morskich Magnussona Kligmana (GMPT) i test Buehlera (metoda badawcza B.6 (5)), badają zarówno indukcję, jak i fazy elicytacji działania uczulającego na skórę. Przeprowadzany na myszach test lokalnych węzłów chłonnych (LLNA, metoda badawcza B.42 (4)) i jego dwie nieradioaktywne modyfikacje, LLNA: DA (TM B.50 (6)) i LLNA: BrdU-ELISA (metoda badawcza B.51 (7)), w ramach których ocenia się wyłącznie reakcję indukcyjną, także zyskały akceptację, ponieważ zapewniają one przewagę nad testami prowadzonymi na świnkach morskich pod względem dobrostanu zwierząt i obiektywnego pomiaru fazy indukcyjnej działania uczulającego na skórę.

Ostatnio uznano, że metody badawcze *in chemico* i *in vitro* oparte na analizie mechanistycznej są potwierdzone naukowo jako metody oceny zagrożenia wywołania działania uczulającego na skórę przez substancje chemiczne. Ze względu jednak na ograniczony mechanistyczny zakres mechanizmu wywoływania skutków szkodliwych w przypadku każdej z obecnie dostępnych metod badawczych niewymagających wykorzystania zwierząt konieczne będzie zastosowanie kombinacji metod (*in silico*, *in chemico* oraz *in vitro*) w ramach zintegrowanych podejść do badań i oceny (IATA), aby móc w pełni zastąpić aktualnie stosowane testy na zwierzętach (2) (3).

Proponuje się, aby niniejsza metoda badawcza (badanie z wykorzystaniem lucyferazy ARE-Nrf2) została użyta do określenia drugiego kluczowego zdarzenia, które wyjaśniono w pkt 2. Z dostępnych informacji wynika, że substancje działające uczulająco na skórę wywołują indukcję genów regulowanych elementem odpowiedzi antyoksydacyjnej (ARE) (8) (9). Drobnocząsteczkowe substancje elektrofilowe, takie jak substancje działające uczulająco na skórę, mogą oddziaływać na białko sensorowe Keap1 (białko związane ECH typu Kelch 1), np. poprzez modyfikację kowalencyjną jego reszty cysteinowej, co skutkuje uwolnieniem się tego białka od czynnika transkrypcyjnego Nrf2 (czynnik jądrowy 2 związany z NF-E2). Zdysocjowany Nrf2 może wówczas aktywować geny zależne od ARE, takie jak geny kodujące enzymy detoksykacyjne II fazy (8) (10) (11).

Obecnie jedynym badaniem z wykorzystaniem lucyferazy ARE-Nrf2 *in vitro* objętym niniejszą metodą badawczą jest badanie KeratinoSensTM, w odniesieniu do którego ukończono badania walidacyjne (9) (12) (13), a następnie laboratorium referencyjne Unii Europejskiej ds. metod alternatywnych wobec testów na zwierzętach (EURL ECVAM) przeprowadziło niezależną wzajemną ocenę (14). Badanie KeratinoSensTM za potwierdzone naukowo do celów stosowania jako część IATA celem wsparcia rozróżnienia substancji działających uczulająco na skórę i substancji niewykazujących takiego działania na potrzeby klasyfikacji zagrożeń i oznakowań (14). Laboratoria, które chcą wdrożyć tę metodę badawczą, mogą otrzymać rekombinowaną linię komórkową wykorzystywaną w badaniu KeratinoSensTM, zawierając umowę licencyjną z podmiotem, który opracował tę metodę badawczą (15).

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

Definicje znajdują się w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE, ZASTOSOWANIE I OGRANICZENIA

Ponieważ aktywacja mechanizmu Keap1-Nrf2-ARE dotyczy tylko drugiego kluczowego zdarzenia w mechanizmie wywoływania skutków szkodliwych w zakresie działania uczulającego na skórę, jest mało prawdopodobne, aby informacje uzyskane w wyniku metod badawczych opartych na aktywacji tego mechanizmu zastosowane samodzielnie były wystarczające do tego, aby wyciągnąć wnioski dotyczące potencjalnego działania uczulającego na skórę substancji chemicznych. Dlatego też dane wygenerowane przy zastosowaniu niniejszej metody badawczej należy analizować w kontekście podejść zintegrowanych, takich jak IATA, łącząc je z innymi informacjami uzupełniającymi, tj. pochodzącymi z testów *in vitro* określających inne kluczowe zdarzenia w mechanizmie wywoływania skutków szkodliwych w zakresie działania uczulającego na skórę, jak również metod niebadawczych, z uwzględnieniem danych z podejść przekrojowych z zastosowaniem analogicznych substancji chemicznych. Przykładowe sposoby zastosowania metody badawczej z wykorzystaniem lucyferazy ARE-Nrf2 w połączeniu innymi informacjami są opisane w literaturze (13) (16) (17) (18) (19).

Niniejsza metoda badawcza może stanowić pomoc w rozróżnieniu substancji działających uczulająco na skórę (tj. kategoria 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) i substancji niewykazujących takiego działania w kontekście IATA. Niniejszej metody badawczej nie można stosować samodzielnie ani w celu dalszego klasyfikowania substancji działających uczulająco na skórę do podkategorii 1A i 1B, zgodnie z GHS ONZ / rozporządzeniem CLP, ani w celu przewidzenia ich siły działania na potrzeby podejmowania decyzji dotyczących oceny bezpieczeństwa. Jednakże w zależności od ram regulacyjnych sam wynik dodatni można wykorzystać celem zaklasyfikowania substancji chemicznej do kategorii 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP.

Na podstawie zbioru danych z badania walidacyjnego oraz badań wewnętrznych wykorzystanych do celów niezależnej wzajemnej oceny metody badawczej udowodniono, że badanie KeratinoSens™ można przeprowadzać również w laboratoriach posiadających doświadczenie w zakresie kultury komórkowej. Poziom odwarzalności prognoz, którego można oczekiwać od tej metody badawczej, ma wartość rzędu 85 % wewnątrz laboratoriów i pomiędzy laboratoriami (14). Dokładność (77 % – 155/201), czułość (78 % – 71/91) i swoistość (76 % – 84/110) badania KeratinoSens™ w zakresie rozróżniania substancji działających uczulająco na skórę (tj. kategoria 1 wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) i substancji niewykazujących takiego działania w porównaniu do wyników LLNA obliczono, uwzględniając wszystkie dane przedłożone EURL ECVAM na potrzeby oceny oraz wzajemnej oceny przedmiotowej metody badawczej (14). Podane wartości liczbowe są podobne do niedawno opublikowanych danych opartych na badaniach wewnętrznych około 145 substancji (77-procentowa dokładność, 79-procentowa czułość, 72-procentowa swoistość) (13). Jest bardziej prawdopodobne, że w wyniku badania KeratinoSens™ zostaną zaniżone prognozy dotyczące substancji chemicznych wykazujących niską lub średnią siłę działania uczulającego na skórę (tj. podkategoria 1B wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) niż prognozy dotyczące substancji wykazujących wysoką siłę działania uczulającego na skórę (tj. subkategoria 1A wg GHS ONZ / rozporządzenia CLP) (13) (14). Wszystkie te informacje łącznie wskazują na użyteczność badania KeratinoSens™ w identyfikowaniu zagrożenia związanego z działaniem uczulającym na skórę. Przedstawione tutaj wartości dokładności badania KeratinoSens™ jako samodzielnej metody badawczej są jednak wyłącznie orientacyjne, ponieważ tę metodę badawczą należy rozpatrywać w połączeniu z innymi źródłami informacji w kontekście IATA i zgodnie z przepisami pkt 9 powyżej. Co więcej, przy ocenie metod niewymagających wykorzystania zwierząt pod kątem działania uczulającego na skórę należy pamiętać, że test LLNA, jak również inne badania na zwierzętach mogą nie w pełni odzwierciedlać sytuację gatunku będącego przedmiotem zainteresowania, tj. ludzi.

Termin „badana substancja chemiczna” jest używany w niniejszej metodzie badawczej w odniesieniu do substancji będącej przedmiotem badania, i nie jest powiązany z zastosowaniem metody badawczej z wykorzystaniem lucyferazy ARE-Nrf2 do badania substancji lub mieszanin. Na podstawie obecnie dostępnych danych wykazano, że badanie KeratinoSens™ ma zastosowanie do badanych substancji chemicznych obejmujących szereg organicznych grup funkcyjnych, mechanizmów reagowania, sił działania uczulającego na skórę (jak określono w badaniach *in vivo*) oraz właściwości fizykochemicznych (9) (12) (13) (14). Badaniu poddano głównie substancje jednoskładnikowe, chociaż istnieje również ograniczona ilość danych dotyczących badania mieszanin (20). Niniejsza metoda badawcza ma jednak zastosowanie techniczne w odniesieniu do badania zarówno substancji wieloskładnikowych, jak i mieszanin. Przed zastosowaniem niniejszej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy jednak zastanowić się, czy zastosowanie niniejszej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak – dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny.

Ponadto podczas badania substancji wieloskładnikowych lub mieszanin należy rozważyć możliwe zakłócenie obserwowanych reakcji przez składniki cytotoksyczne. Niniejsza metoda badawcza ma zastosowanie do badanych substancji chemicznych, które są rozpuszczalne lub tworzą stabilną dyspersję (tj. koloid bądź zawiesinę, w których badana substancja chemiczna nie osadza się ani nie oddziela od rozpuszczalnika w różnej fazie) w wodzie lub w sulfotlenku dimetylu (uwzględniając wszystkie składniki badanej substancji chemicznej w przypadku badania substancji wieloskładnikowej lub mieszaniny). Badane substancje chemiczne, które nie spełniają powyższych warunków w najwyższym wymaganym stężeniu końcowym 2 000 μM (por. pkt 22), mogą być nadal badane w niższych stężeniach. W takim przypadku wyniki spełniające kryteria uznania za wyniki dodatnie opisane w pkt 39 można nadal wykorzystać celem wsparcia identyfikacji badanej substancji chemicznej jako substancji działającej uczulająco na skórę, natomiast wynik ujemny uzyskany przy stężeniach $< 1\ 000\ \mu\text{M}$ należy uznać za niejednoznaczny (zob. model prognozowania w pkt 39). Zasadniczo substancje o LogP do 5 zostały zbadane z powodzeniem, natomiast substancje skrajnie hydrofobowe o LogP powyżej 7 wykraczają poza znany zakres zastosowania tej metody badawczej (14). W przypadku substancji o LogP wynoszącym 5–7 dostępne są jedynie ograniczone informacje.

Wyniki ujemne należy interpretować ostrożnie, ponieważ substancje, które wykazują reaktywność wyłącznie wobec reszt lizynowych, mogą być wykrywane w ramach niniejszej metody badawczej jako dające wynik ujemny. Ponadto z powodu ograniczonej wydolności metabolicznej zastosowanych linii komórkowych (21) i z powodu warunków doświadczalnych prohapteny (tj. substancje chemiczne wymagające aktywacji enzymatycznej np. przez enzymy P450) oraz prehapteny (tj. substancje chemiczne aktywowane przez samoutlenianie), w szczególności te o niskim tempie utleniania, również mogą dawać wyniki ujemne. Badane substancje chemiczne, które nie mają działania uczulającego, ale mimo to stanowią drażniące substancje chemiczne, mogą z kolei doprowadzić do otrzymania wyników fałszywie dodatnich (14). Ponadto badane substancje chemiczne o wysokiej cytotoksyczności nie zawsze można ocenić w sposób wiarygodny. Co więcej, badane substancje chemiczne, które zakłócają działanie enzymu lucyferazy, mogą zakłócać aktywność lucyferazy w badaniach opartych na komórkach, powodując inhibicję pozorną albo zwiększoną luminescencję (22). Na przykład z dostępnych informacji wynika, że stężenia fitoestrogenu wyższe niż 1 μM zakłócają sygnały luminescencyjne w innych badaniach genów reporterowych opartych na lucyferazie z powodu nadaktywacji lucyferazowego genu reporterowego (23). W rezultacie należy ostrożnie badać ekspresję lucyferazy uzyskaną przy wysokich stężeniach fitoestrogenów lub podobnych substancji chemicznych, co do których przypuszcza się, że wywołują one – podobnie jak fitoestrogeny – nadaktywację lucyferazowego genu reporterowego (23). W przypadkach, w których można przedstawić dowody na brak możliwości zastosowania omawianej metody badawczej w odniesieniu do innych konkretnych kategorii badanych substancji chemicznych, metody tej nie należy stosować w odniesieniu do tych konkretnych kategorii substancji chemicznych.

Poza tym, że ułatwia rozróżnianie między substancjami działającymi uczulająco na skórę a substancjami niewykazującymi działania uczulającego na skórę, badanie KeratinoSens™ dostarcza również informacji na temat zależności stężenie-odpowiedź, które mogą potencjalnie wpłynąć na ocenę siły działania uczulającego w przypadku ich wykorzystania w ramach podejść zintegrowanych, takich jak IATA (19). Wymagane jest jednak przeprowadzenie dalszych prac, najlepiej na podstawie wiarygodnych danych dotyczących ludzi, aby ustalić, w jaki sposób wyniki badania KeratinoSens™ mogą potencjalnie wpłynąć na ocenę siły działania (24) oraz na możliwość podzielenia czynników uczulających na podkategorie zgodnie z GHS ONZ / rozporządzeniem CLP.

ZASADA BADANIA

W metodzie badawczej z wykorzystaniem lucyferazy ARE-Nrf2 stosuje się unieśmiertnioną przylegającą linię komórkową pozyskaną z keratynocytów człowieka HaCaT poddanych stabilnej transfekcji przy użyciu selekcyjnego plazmidu. Linia komórkowa zawiera gen lucyferazy podlegający kontroli transkrypcyjnej ze strony promotora konstytutywnego skondensowanego z elementem ARE genu, co do którego wiadomo, że jego ekspresja podlega zwiększeniu wskutek styczności z alergenami kontaktowymi (25) (26). Sygnał lucyferazy świadczy o aktywacji endogennych genów zależnych Nrf2 wskutek oddziaływania czynników uczulających, przy czym wykazano istnienie zależności między sygnałem lucyferazy w rekombinowanej linii komórkowej a Nrf2 (27). Zastosowanie tej metody daje możliwość dokonania ilościowego pomiaru (w drodze detekcji luminescencyjnej) indukcji genu lucyferazy przy wykorzystaniu powszechnie stosowanych substratów lucyferazy generujących światło jako wskaźnika aktywności czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w komórkach, które zostały narażone na działanie substancji elektrofilowych.

Badane substancje chemiczne uznaje się za dodatnie w ramach badania KeratinoSens™, jeżeli wywołują statystycznie istotną indukcję aktywności lucyferazy powyżej określonego progu (tj. co najmniej 1,5-krotny wzrost lub wzrost o 50 %) przy danym stężeniu, które nie wywiera istotnego wpływu na żywotność komórek (tj. poniżej 1000 μM przy stężeniu, w którym żywotność komórek utrzymuje się powyżej 70 % (9) (12)). W tym celu oznacza się maksymalną krotność indukcji aktywności lucyferazy w ramach (ujemnej) próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem (I_{max}). Ponadto, biorąc pod uwagę fakt, że komórki są poddawane działaniu badanych substancji chemicznych w szeregu stężeń, poziom stężenia niezbędny do wywołania statystycznie istotnej indukcji aktywności lucyferazy powyżej określonego progu (tj. wartości $\text{EC}_{1,5}$) należy interpolować z krzywej dawka-efekt (aby zapoznać się ze stosownymi obliczeniami, zob. pkt 32). Należy również przeprowadzić równoległe pomiary cytotoksyczności, aby ocenić, czy do indukcji aktywności lucyferazy dochodzi również przy stężeniach niższych niż stężenia cytotoksyczne.

Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania badania z wykorzystaniem lucyferazy ARE-Nrf2 zgodnego z niniejszą metodą badawczą laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną z zastosowaniem dziesięciu substancji służących do wykazania biegłości wskazanych w dodatku 2.

Aby usprawnić proces walidacji nowych lub zmienionych metod badawczych wykorzystywanych do badania lucyferazy ARE-Nrf2 *in vitro* podobnych do badania KeratinoSens™ i aby umożliwić terminowe modyfikowanie niniejszej metody badawczej w celu uwzględnienia tych metod badawczych, można skorzystać z dostępnych standardów wykonywania badań (PS) (28). Wzajemne uznawanie danych (MAD) zgodnie z porozumieniem OECD będzie możliwe wyłącznie w przypadku metod badawczych zweryfikowanych zgodnie ze standardem wykonywania badań, jeżeli te metody badawcze zostały poddane przeglądowi i włączone do odpowiednich wytycznych OECD dotyczących badań.

PROCEDURA

Obecnie jedyną metodą objętą niniejszą metodą badawczą jest potwierdzone naukowo badanie KeratinoSens™ (9) (12) (13) (14). Standardowe procedury operacyjne dotyczące badania KeratinoSens™ są dostępne i należy z nich korzystać przy wdrażaniu niniejszej metody badawczej i stosowaniu jej w warunkach laboratoryjnych (15). Laboratoria, które chcą wdrożyć tę metodę badawczą, mogą otrzymać rekombinowaną linię komórkową wykorzystywaną w badaniu KeratinoSens™, zawierając umowę licencyjną z podmiotem, który opracował tę metodę badawczą. W poniższych punktach opisano najistotniejsze elementy i procedury związane z metodą badawczą wykorzystywaną do badania lucyferazy ARE-Nrf2.

Przygotowanie kultur keratynocytów

Należy korzystać z transgenicznej linii komórkowej o stabilnej insercji genu reporterowego lucyferazy pod kontrolą elementu ARE (np. linii komórkowej KeratinoSens™). Po odebraniu komórek rozmnaża się je (np. od dwóch do czterech pasaży) i przechowuje się je zamrożone jako jednorodny zbiór. Komórki pochodzące z tego pierwotnego zbioru można rozmnażać do momentu osiągnięcia maksymalnej dozwolonej liczby pasaży (tj. 25 w przypadku KeratinoSens™), po czym wykorzystuje się je w ramach rutynowych badań przeprowadzanych przy wykorzystaniu odpowiedniej pożywki utrzymującej (w przypadku KeratinoSens™ za taką pożywkę uznaje się pożywkę DMEM zawierającą surowicę i Genetycynę).

Na potrzeby badania komórki powinny zlewać się w 80–90 %, przy czym należy dopilnować, aby komórki nigdy nie osiągnęły stadium pełnej konfluencji. Na dzień przed przeprowadzeniem badania komórki pobiera się i umieszcza w dołkach 96-dołkowych płytek (10 000 komórek na dołek w przypadku KeratinoSens™). Należy zadbać o to, by w trakcie osadzania nie dochodziło do przypadków powstawania osadu komórkowego, aby zapewnić jednorodny rozkład liczby komórek we wszystkich dołkach. Powstanie takiego osadu może doprowadzić do dużego zróżnicowania liczby komórek w poszczególnych dołkach. Do celów pomiaru aktywności lucyferazy w ramach każdego powtórzenia wykorzystuje się trzy kontrpróby, a w badaniu żywotności komórek wykorzystuje się jedną równoległą kontrpróbę.

Przygotowanie badanej i kontrolnej substancji chemicznej

Badaną substancję chemiczną oraz substancje kontrolne przygotowuje się w dniu przeprowadzenia badania. W przypadku badania KeratinoSens™ badane substancje chemiczne rozpuszcza się w sulfotlenku dimetylu (DMSO) do chwili uzyskania pożądanego stężenia końcowego (np. 200 mM). Roztwory sulfotlenku dimetylu można uznać za samo sterylizujące się, dlatego też w ich przypadku dokonanie sterylizacji przez filtrowanie nie jest konieczne. Badaną substancję chemiczną, która nie rozpuszcza się w sulfotlenku dimetylu, należy rozpuścić w sterylnej wodzie lub w podłożu, po czym uzyskane roztwory należy poddać sterylizacji np. przez filtrowanie. W przypadku badanej substancji chemicznej, która nie posiada określonej masy cząsteczkowej, w ramach badania KeratinoSens™ przygotowuje się roztwór podstawowy o domyślnym stężeniu (40 mg/ml lub 4 % (w/v)). W przypadku zastosowania rozpuszczalników innych niż sulfotlenek dimetylu, woda lub podłoże należy przedstawić odpowiednie uzasadnienie naukowe.

W oparciu o podstawowe roztwory uzyskane po rozpuszczeniu badanej substancji chemicznej w sulfotlenku dimetylu sporządza się serie stężeń wzrastających w postępie geometrycznym, co pozwala przygotować 12 głównych stężeń substancji chemicznej, które mają zostać wykorzystane w badaniu (od 0,098 do 200 mM w badaniu KeratinoSens™). Jeżeli badana substancja chemiczna nie jest rozpuszczalna w sulfotlenku dimetylu, serie stężeń sporządzane w celu przygotowania głównych stężeń przeprowadza się przy wykorzystaniu sterylnej wody lub sterylnego podłoża. Niezależnie od zastosowanego rozpuszczalnika stężenia główne rozcieńcza się następnie 25-krotnie w podłożu zawierającym surowicę i wykorzystuje się je w celu poddania działaniu substancji chemicznej, stosując dodatkowy 4-krotny współczynnik rozcieńczenia, aby stężenia końcowe badanej substancji chemicznej mieściły się w zakresie od 0,98 do 2000 µM w ramach badania KeratinoSens™. Jeżeli zostanie to odpowiednio uzasadnione, można również zastosować alternatywne stężenia (np. w przypadku wystąpienia cytotoxyczności lub w przypadku wystąpienia słabej rozpuszczalności).

W ramach kontroli ujemnej (z rozpuszczalnikiem) wykorzystywanej w badaniu KeratinoSens™ stosuje się sulfotlenek dimetylu (nr CAS 67-68-5, ≥ 99 % czystości), na potrzeby którego przygotowuje się sześć dołków na płytkę. Próbę tę poddaje się takiej samej procedurze rozcieńczania jak opisana w pkt 22 procedura przewidziana dla stężeń głównych, aby stężenie końcowe w negatywnej próbie kontrolnej (z rozpuszczalnikiem) wynosiło 1 %, nie wywierało wpływu na żywotność komórek i odpowiadało stężeniu sulfotlenku dimetylu w badanej substancji chemicznej i w kontroli dodatniej. Jeżeli badana substancja chemiczna nie jest rozpuszczalna w sulfotlenku dimetylu, który został rozcieńczony w wodzie, poziom stężenia sulfotlenku dimetylu we wszystkich dołkach, w których ma zostać umieszczony końcowy roztwór do badań, musi wynosić 1 %, podobnie jak ma to miejsce w przypadku innych substancji chemicznych i substancji kontrolnych.

Za kontrolę dodatnią w badaniu KeratinoSens™ uznaje się aldehyd cynamonowy (nr CAS 14371-10-9, ≥ 98 % czystości), na potrzeby którego przygotowuje się serie 5 stężeń głównych wynoszących od 0,4 do 6,4 mM w sulfotlenku dimetylu (z roztworu podstawowego o stężeniu 6,4 mM), który następnie rozcieńcza się zgodnie z opisaną w pkt 22 procedurą przewidzianą dla stężeń głównych, aby stężenie końcowe kontroli dodatniej mieściło się w zakresie od 4 do 64 µM. Dopuszcza się również możliwość wykorzystania innych kontroli dodatnich, najlepiej kontroli o wartości $EC_{1,5}$ mieszczącej się w średnim zakresie, jeżeli istnieją dane historyczne, na podstawie których można ustanowić porównywalne kryteria dopuszczalności.

Podawanie badanej i kontrolnej substancji chemicznej

W odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej i substancji służącej do kontroli dodatniej należy przeprowadzić jedno doświadczenie obejmujące co najmniej dwa niezależne powtórzenia, w ramach których wykorzystuje się trzy kontrpróby (tj. $n=6$), aby sformułować prognozę (dodatnią lub ujemną). Jeżeli wyniki uzyskane po dokonaniu dwóch niezależnych powtórzeń są rozbieżne, należy przeprowadzić trzecie powtórzenie z wykorzystaniem trzech kontrprób (tj. $n=9$). Każde niezależne powtórzenie przeprowadza się innego dnia przy wykorzystaniu świeżego roztworu podstawowego badanych substancji chemicznych oraz niezależnie pozyskanych komórek. Komórki mogą jednak pochodzić z tego samego pasażu.

Po osadzeniu komórek w sposób opisany w pkt 20 hoduje się je przez 24 godziny na płytkach 96-dołkowych. Następnie podłoże usuwa się i zastępuje się je świeżym podłożem (w przypadku KeratinoSens™ podłożem o objętości 150 µl zawierającym surowicę, ale niezawierającym Genetycyny), do którego dodaje się 50 µl 25-krotnie rozcieńczonej badanej i kontrolnej substancji chemicznej. Co najmniej jeden dołek na każdej płytce powinien pozostać niewypełniony (brak komórek i niepoddanie działaniu substancji chemicznej), aby ocenić wartości tła.

Następnie płytki poddane działaniu substancji chemicznej inkubuje się przez około 48 godzin w temperaturze 37 ± 1 °C i przy obecności 5 % CO_2 w ramach badania KeratinoSens™. Należy dołożyć starań, aby nie dopuścić do odparowania lotnych badanych substancji chemicznych i aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu między dołkami zawierającymi badane substancje chemiczne, np. przykrywając dołki folią przed rozpoczęciem inkubacji z wykorzystaniem badanych substancji chemicznych.

Pomiar aktywności lucyferazy

Trzy czynniki mają kluczowe znaczenie dla zapewnienia prawidłowości pomiarów luminescencji:

- wybór odpowiednio czułego lumenometru;
- korzystanie z płytki wysokości odpowiedniej do tego, by zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu światłem; oraz
- korzystanie z substratu lucyferazy o natężeniu światła wystarczającym do zapewnienia dostatecznej czułości i niskiego poziomu różnicowania wyników.

Przed przystąpieniem do badania należy przeprowadzić doświadczenie kontrolne zgodnie z układem opisanym w dodatku 3, aby zapewnić spełnienie tych trzech kryteriów.

Po upływie 48-godzinnej okresu narażenia na działanie badanej substancji chemicznej i substancji kontrolnej w ramach badania KeratinoSens™ komórki przemywa się roztworem chlorku sodu buforowanym fosforanami, po czym do każdego dołka na 20 min dodaje się odpowiedni bufor do przeprowadzania lizy w temperaturze pokojowej w celu dokonania pomiaru luminescencji.

Następnie płytki z lizatami komórkowymi umieszcza się w celu przeprowadzenia pomiaru w lumenometrze, który w ramach badania KeratinoSens™ jest zaprogramowany w następujący sposób: (i) dodanie substratu lucyferazy do każdego dołka (tj. 50 µl); (ii) odczekanie 1 sekundy; (iii) integrowanie aktywności lucyferazy przez 2 sekundy. W przypadku zastosowania innych ustawień, np. z uwagi korzystanie z innego modelu lumenometru, należy przedstawić stosowne uzasadnienie. Ponadto można również zastosować substrat jarzeniowy, o ile warunki dotyczące kontroli jakości doświadczenia ustanowione w dodatku 3 zostały spełnione.

Ocena cytotoksyczności

W ramach badania KeratinoSens™ dotyczącego żywotności komórek po upływie 48-godzinnej okresu narażenia na działanie substancji pożywkę zastępuje się świeżą pożywką zawierającą bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy (MTT) (nr CAS 298-93-1), a komórki inkubuje się przez 4 godziny w temperaturze 37 °C i w obecności 5 % CO₂. Następnie pożywka zawierająca bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy jest usuwana, a komórki są poddawane lizie (np. poprzez dodanie 10-procentowego roztworu laurylo-siarczanu sodu) przez całą noc. Po zakończeniu wytrząsania poziom absorpcji mierzy się fotometrem przy 600 nm.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Ocena danych

W ramach badania KeratinoSens™ oblicza się następujące parametry:

- wartość maksymalnej średniej krotności indukcji aktywności lucyferazy (I_{max}) zaobserwowana dla poszczególnych stężeń badanej substancji chemicznej i kontroli dodatniej;
- wartość EC_{1,5} odpowiadająca stężeniu, przy którym indukcja aktywności lucyferazy przekracza 1,5-krotność progu (tj. 50 % wartości zwiększonej aktywności lucyferazy); oraz
- wartości stężenia IC₅₀ i IC₃₀ przy zmniejszeniu żywotności komórek odpowiednio o 50 % i 30 %.
- Krotność indukcji aktywności lucyferazy oblicza się zgodnie z równaniem 1, natomiast ogólną maksymalną krotność indukcji (I_{max}) oblicza się jako średnią dla poszczególnych powtórzeń.

Równanie 1:

$$\text{krotność indukcji} = \frac{(L_{\text{próbka}} - L_{\text{próba ślepa}})}{(L_{\text{rozpuszczalnik}} - L_{\text{próba ślepa}})}$$

gdzie:

$L_{\text{próbka}}$	oznacza poziom luminescencji zmierzony w dołku, do którego wprowadzono badaną substancję chemiczną
$L_{\text{próba ślepa}}$	oznacza poziom luminescencji zmierzony w dołku stanowiącym próbę ślepa, do którego nie wprowadzono żadnych komórek i którego nie poddano działaniu żadnej substancji chemicznej
$L_{\text{rozpuszczalnik}}$	oznacza średni poziom luminescencji zmierzony w dołkach zawierających komórki i (ujemną) kontrolę z rozpuszczalnikiem

Wartość EC_{1,5} oblicza się w drodze interpolacji liniowej przeprowadzanej zgodnie z równaniem 2, natomiast wartość ogólnego EC_{1,5} oblicza się, wyciągając średnią geometryczną z poszczególnych powtórzeń.

Równanie 2:

$$EC_{1,5} = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1,5 - I_a}{I_b - I_a} \right) + C_a$$

gdzie:

C_a oznacza najniższe stężenie w μM przy krotności indukcji $> 1,5$

C_b oznacza najwyższe stężenie w μM przy krotności indukcji $< 1,5$

I_a oznacza krotność indukcji zmierzoną dla najniższego stężenia przy krotności indukcji $> 1,5$ (średnia wartość z trzech dołków stanowiących kontrpróbę)

I_b oznacza krotność indukcji zmierzoną dla najwyższego stężenia przy krotności indukcji $> 1,5$ (średnia wartość z trzech dołków stanowiących kontrpróbę)

Żywotność oblicza się zgodnie z równaniem 3:

Równanie 3:

$$\text{Żywotność} = \frac{(V_{\text{próbka}} - V_{\text{próba ślepa}})}{V_{\text{rozzpuszczalnik}} - V_{\text{próba ślepa}}} \times 100$$

gdzie:

$V_{\text{próbka}}$ oznacza wartość absorbcji MTT zmierzoną w dołku zawierającym badaną substancję chemiczną

$V_{\text{próba ślepa}}$ oznacza wartość absorbcji MTT zmierzoną w dołku stanowiącym próbę ślepa, do którego nie wprowadzono żadnych komórek i którego nie poddano działaniu żadnej substancji chemicznej

$V_{\text{rozzpuszczalnik}}$ oznacza średnią wartość absorbcji MTT zmierzoną w dołkach zawierających komórki i (ujemną) kontrolę z rozpuszczalnikiem

Wartość IC_{50} i IC_{30} oblicza się w drodze interpolacji liniowej przeprowadzanej zgodnie z równaniem 4, natomiast wartość ogólnego IC_{50} i IC_{30} oblicza się, wyciągając średnią geometryczną z poszczególnych powtórzeń.

Równanie 4:

$$IC_x = (C_b - C_a) \times \left(\frac{(100 - x) - V_a}{V_b - V_a} \right) + C_a$$

gdzie:

X stanowi wyrażony procentowo spadek przy danym stężeniu, który należy obliczyć (50 i 30 dla IC_{50} i IC_{30})

C_a oznacza najniższe stężenie w μM przy spadku żywotności $> x$ %

C_b oznacza najwyższe stężenie w μM przy spadku żywotności $< x$ %

V_a oznacza wyrażoną procentowo żywotność dla najniższego stężenia przy spadku żywotności $> x$ %

V_b oznacza wyrażoną procentowo żywotność dla najwyższego stężenia przy spadku żywotności $< x$ %

Dla każdego stężenia, przy którym odnotowuje się krotność indukcji aktywności lucyferazy $> 1,5$, oblicza się poziom istotności statystycznej (np. w ramach dwustronnego testu t-Studenta), porównując wartości luminescencji odnotowane w odniesieniu do trzech kontrprób z wartościami luminescencji w dołkach, do których dodano (ujemną) kontrolę z rozpuszczalnikiem, aby ustalić, czy indukcja aktywności lucyferazy jest statystycznie istotna ($p < 0,05$). Wartość $EC_{1,5}$ zależy od wartości najniższego stężenia przy krotności indukcji aktywności lucyferazy $> 1,5$. W każdym przypadku sprawdza się, czy wartość ta jest niższa niż wartość IC_{30} , co oznaczałoby, że spadek żywotności komórek przy stężeniu oznaczającym $EC_{1,5}$ jest mniejszy niż 30 %.

Zaleca się poddanie danych kontroli wzrokowej w oparciu o wykresy. W przypadku nieodnotowania wyraźnej krzywej dawka-efekt lub w przypadku, gdy zaobserwowana krzywa dawka-efekt jest dwufazowa (tj. dwukrotnie przekracza próg 1,5), doświadczenie należy powtórzyć, aby upewnić się, czy wynik ten jest specyficzny dla badanej substancji chemicznej, czy też jest spowodowany wystąpieniem artefaktu w doświadczeniu. Jeżeli reakcja dwufazowa jest możliwa do odtworzenia w ramach odrębnego doświadczenia, należy zgłosić niższą wartość $EC_{1,5}$ (stężenie przy pierwszym przekroczeniu progu 1,5).

W rzadkich przypadkach, w których wystąpi statystycznie nieistotna indukcja powyżej progu 1,5-krotności, po której odnotowane zostanie wyższe stężenie, w przypadku którego wystąpi statystycznie istotna indukcja, wyniki takiego powtórzenia uznaje się za ważne i dodatnie wyłącznie w przypadku, gdy w odniesieniu do stężenia niecytotoksycznego odnotowano statystycznie istotną indukcję powyżej progu 1,5.

Ponadto w przypadku badanych substancji chemicznych generujących 1,5-krotną lub większą indukcję już przy najniższym poziomie badanego stężenia wynoszącym $0,98 \mu\text{M}$, na podstawie kontroli wzrokowej przeprowadzanej w oparciu o przebieg krzywej dawka-efekt wartość $EC_{1,5}$ ustala się na poziomie $< 0,98$.

Kryteria dopuszczalności

Przy korzystaniu z badania KeratinoSens™ należy spełnić następujące kryteria dopuszczalności. Po pierwsze, indukcja aktywności lucyferazy uzyskana po zastosowaniu substancji służącej do kontroli dodatniej, tj. aldehydu cynamonowego, powinna być statystycznie istotna powyżej progu 1,5 (np. stosując test t-Studenta) w odniesieniu do co najmniej jednego zbadanego stężenia (od 4 to $64 \mu\text{M}$).

Po drugie, wartość $EC_{1,5}$ powinna mieścić się w przedziale dwóch odchyłeń standardowych średniej historycznej w danej placówce badawczej (np. między $7 \mu\text{M}$ a $30 \mu\text{M}$ w oparciu o zbiór danych dotyczących walidacji), która powinna być regularnie aktualizowana. Ponadto średnia indukcja odnotowana w trzech kontrpróbach, w których zastosowano aldehyd cynamonowy w stężeniu $64 \mu\text{M}$, powinna mieścić się w przedziale od 2 do 8. Jeżeli to ostatnie kryterium nie zostanie spełnione, należy uważnie monitorować zależność dawka-odpowiedź w przypadku aldehydu cynamonowego, a wyniki badań można uznać za dopuszczalne wyłącznie w przypadku, gdy zaobserwowana zostanie wyraźna zależność dawka-odpowiedź w kontekście wzrostu indukcji aktywności lucyferazy przy zwiększających się stężeniach kontroli dodatniej.

Średni współczynnik zmienności poziomu luminescencji zmierzonego dla kontroli ujemnej (z rozpuszczalnikiem), w której wykorzystano sulfotlenek dimetylu, powinien być niższy niż 20 % w każdym powtórzeniu, które obejmuje 6 dołków badanych trójkami. Jeżeli poziom zmienności będzie wyższy, wyniki należy odrzucić.

Interpretacja wyników i model prognozowania

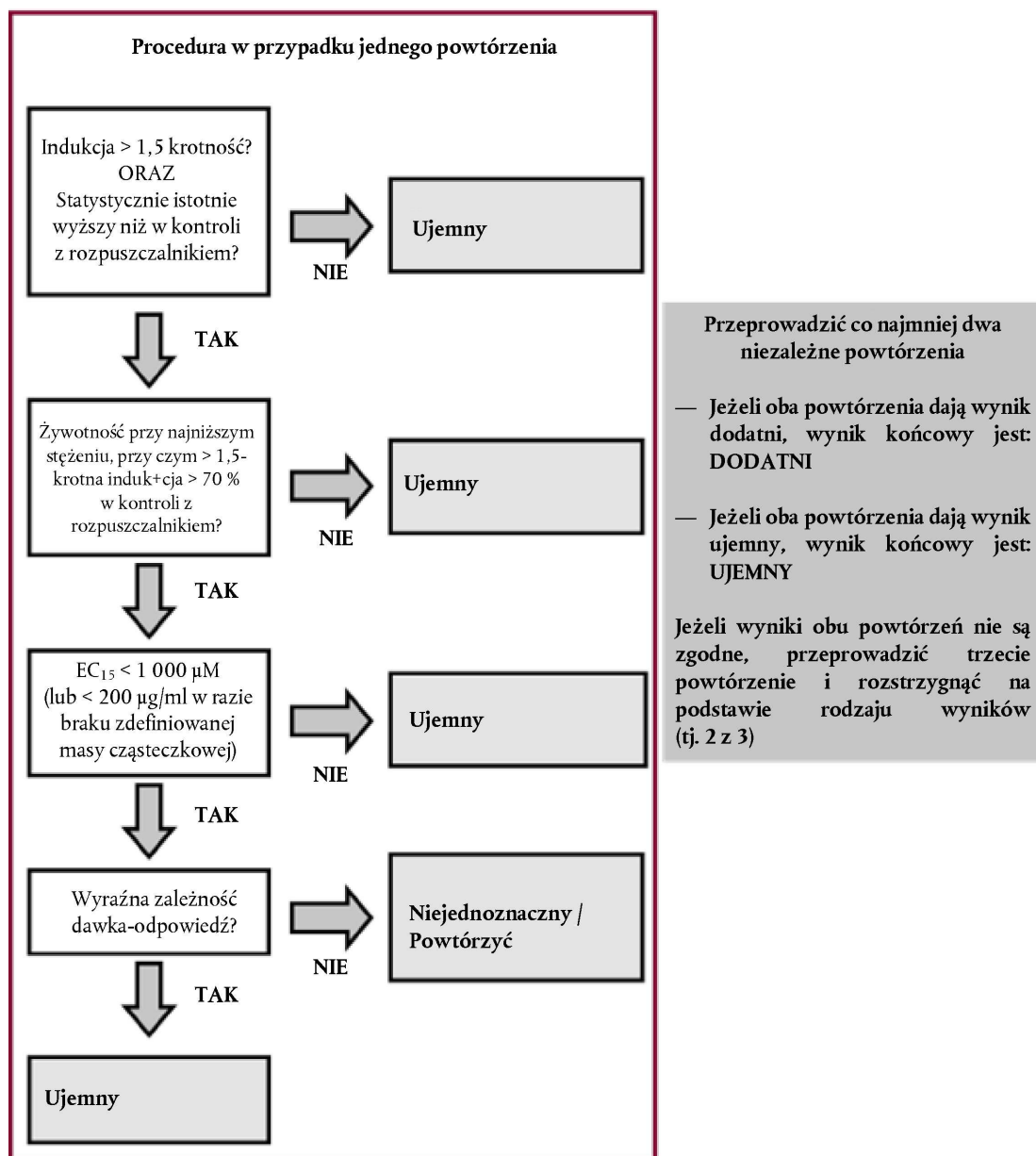
Prognozę KeratinoSens™ uznaje się za dodatnią, jeżeli wszystkie 4 przedstawione poniżej warunki zostaną spełnione w dwóch na dwa powtórzenia lub w tych samych dwóch na trzy powtórzenia – w przeciwnym wypadku prognozę KeratinoSens™ uznaje się za ujemną (wykres 1):

1. wartość I_{max} jest wyższa niż ($>$) 1,5-krotność i w statystycznie istotny sposób różna od wartości odnotowanej w (ujemnej) kontroli z rozpuszczalnikiem (ustalanej zgodnie z dwustronnym, niesparowanym testem t-Studenta);
2. żywotność komórek jest wyższa niż ($>$) 70 % przy najniższym stężeniu, w przypadku którego odnotowuje się ponad 1,5-krotną indukcję aktywności lucyferazy (tj. przy stężeniu oznaczającym $EC_{1,5}$);
3. wartość $EC_{1,5}$ jest mniejsza niż ($<$) $1\ 000 \mu\text{M}$ (lub $< 200 \mu\text{g/ml}$ w przypadku badanych substancji chemicznych, dla których nie ustalono masy cząsteczkowej);
4. można zaobserwować ogólną zależność dawka-odpowiedź w kontekście indukcji lucyferazy (lub reakcji dwufazowej, o której mowa w pkt 33).

Jeżeli w ramach danego powtórzenia wszystkie trzy pierwsze warunki zostały spełnione, ale nie można zaobserwować wyraźnej zależności dawka-odpowiedź w kontekście indukcji lucyferazy, wynik powtórzenia należy uznać za niewiążący, co może wiązać się z koniecznością przeprowadzenia dalszych badań (wykres 1). Ponadto wynik ujemny zaobserwowany w przypadku stężeń $< 1\ 000 \mu\text{M}$ (lub $< 200 \mu\text{g/ml}$ w przypadku badanych substancji chemicznych, dla których nie ustalono masy cząsteczkowej) również powinien zostać uznany za niewiążący (zob. pkt 11).

Wykres 1

Model prognozowania wykorzystywany w badaniu KeratinoSens™. Prognozę KeratinoSens™ należy rozpatrywać w ramach IATA i zgodnie z przepisami pkt 9 i 11.



W rzadkich przypadkach badane substancje chemiczne, które indukują aktywność lucyferazy na poziomie bardzo zbliżonym do poziomów cytotoksycznych, mogą dawać wynik dodatni w pewnych powtórzeniach na poziomach niecytotoksycznych (tj. $EC_{1,5}$ oznaczające stężenie poniżej ($<$) IC_{30}), a w innych powtórzeniach tylko na poziomach cytotoksycznych (tj. $EC_{1,5}$ oznaczające stężenie powyżej ($>$) IC_{30}). Takie badane substancje chemiczne należy powtórnie zbadać, przeprowadzając zawężoną analizę zależności dawka-odpowieź przy zastosowaniu niższego współczynnika rozcieńczenia (np. 1,33- lub $\bar{O}2$ -($=1,41$)krotne rozcieńczenie pomiędzy dołkami), aby określić, czy nastąpiła indukcja na poziomach cytotoksycznych (9).

Sprawozdanie z badania

Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

- Substancja jednoskładnikowa
 - dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory;

- wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie, rozpuszczalność w sulfotlenku dimetylu, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie;
 - czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;
 - postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);
 - badane stężenie(-a);
 - warunki przechowywania i stabilności w dostępnym zakresie.
- Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszanina:
- opisana w miarę możliwości np. poprzez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), czystości, przedstawienie informacji dotyczących występowania ilościowego oraz wskazanie istotnych właściwości fizykochemicznych składników (zob. powyżej);
 - wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie, rozpuszczalność w sulfotlenku dimetylu i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie;
 - masa cząsteczkowa lub pozorna masa cząsteczkowa w przypadku mieszanin lub polimerów o znanym składzie lub inne informacje istotne dla przebiegu badania;
 - postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);
 - badane stężenie(-a);
 - warunki przechowywania i stabilności w dostępnym zakresie.

Kontrole

- Kontrola dodatnia
- dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny lub inne identyfikatory;
 - wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie, rozpuszczalność w sulfotlenku dimetylu, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne, w dostępnym zakresie i w stosownych przypadkach;
 - czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;
 - postępowanie z daną substancją przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);
 - badane stężenie(-a);
 - warunki przechowywania i stabilności w dostępnym zakresie;
 - odniesienie do wyników historycznych kontroli dodatnich wykazuje odpowiednie kryteria dopuszczalności serii, w stosownych przypadkach.
- Kontrola ujemna (z nośnikiem)
- dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa(-y) IUPAC lub CAS, numer(-y) CAS lub inne identyfikatory;
 - czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp.;
 - wygląd fizyczny, masa cząsteczkowa i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne w przypadku stosowania kontroli ujemnych/nośników innych niż te opisane w niniejszej metodzie badawczej, w dostępnym zakresie;
 - warunki przechowywania i stabilności w dostępnym zakresie;
 - uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej.

Warunki metody badawczej

- nazwa i adres sponsora i placówki przeprowadzającej badanie oraz dane kierownika badań;
- opis zastosowanej metody badawczej;
- zastosowana linia komórkowa, warunki jej przechowywania oraz źródło (np. placówka, z której je otrzymano);
- liczba pasaży i poziom konfluencji komórek wykorzystanych do badania;
- metoda zliczania komórek zastosowana do osadzania przed badaniem i środki podjęte w celu zapewnienia rozmieszczenia jednorodnej liczby komórek (por. pkt 20);
- zastosowany luminometr (np. model), w tym ustawienia przyrządu, wykorzystany substrat lucyferazy oraz wykazanie odpowiednich pomiarów luminescencji w oparciu o badanie kontrolne opisane w dodatku 3;
- procedura stosowana w celu wykazania biegłości laboratorium w zakresie przeprowadzania metody badawczej (tj. poprzez badanie substancji służących do wykazania biegłości) lub do wykazania odtwarzalnego przeprowadzania metody badawczej w miarę upływu czasu.

Procedura badawcza

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

Wyniki

- Tabela zestawienie wartości I_{max} , $EC_{1,5}$ i wartości żywotności (tj. IC_{50} , IC_{30}) uzyskanych w odniesieniu do danej badanej substancji chemicznej i kontroli dodatniej dla każdego powtórzenia, jak również wartości średnich (I_{max} : średnia; $EC_{1,5}$ i wartości żywotności: średnia geometryczna), odchylenia standardowego (SD) obliczonego przy użyciu danych ze wszystkich poszczególnych powtórzeń oraz wskazanie oceny badanej substancji chemicznej według modelu prognozowania;
- współczynnik zmienności otrzymany w oparciu o odczyty luminescencji w odniesieniu do kontroli ujemnej dla każdego doświadczenia;
- wykres przedstawiający krzywe dawka-efekt w odniesieniu do indukcji aktywności lucyferazy i żywotności;
- w stosownych przypadkach opis wszelkich innych istotnych obserwacji.

Omówienie wyników

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

Wniosek

BIBLIOGRAFIA

- (1) Organizacja Narodów Zjednoczonych (ONZ) (2013). Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS), wydanie piąte zmienione, ONZ, Nowy Jork i Genewa 2013. Dostępne na stronie internetowej: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 168. OECD, Paryż.

- (3) Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen K.E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F.Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleinjans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorta P., Munn S., Pfuhrer S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J.M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Archives of Toxicology* 85, s. 367–485.
- (4) Rozdział B.42 niniejszego załącznika: Działanie uczulające na skórę: badanie lokalnych węzłów chłonnych.
- (5) Rozdział B.6 niniejszego załącznika: Działanie uczulające na skórę.
- (6) Rozdział B.50 niniejszego załącznika: Działanie uczulające na skórę: badanie lokalnych węzłów chłonnych DA.
- (7) Rozdział B.51 niniejszego załącznika: Działanie uczulające na skórę: badanie lokalnych węzłów chłonnych BrdU-ELISA.
- (8) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. *Toxicological Sciences* 113, s. 284–292.
- (9) Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 245, s. 281–290.
- (10) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chem. Res. Toxicol.* 18, s. 1779–1791.
- (11) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1(1), s. 45–49.
- (12) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: results of a ring-study in five laboratories. *Toxicol. In Vitro* 25, s. 733–744.
- (13) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, 33, s. 1337–1352.
- (14) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 s. Dostępne na stronie internetowej: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation
- (15) DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSens™, 17 s. Dostępne na stronie internetowej: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>
- (16) Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different *in vitro* and *in silico* assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. *Toxicol. Sci.* 107, s. 106–121.
- (17) Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 60, s. 389–400.
- (18) Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 63, s. 489–504.

- (19) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. *J Appl Toxicol.* 33, s. 1353–1364.
 - (20) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study. *Toxicology In Vitro* 27, s. 1220–1225.
 - (21) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, s. 1683–1969.
 - (22) 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, s. 646–657.
 - (23) OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. Wytoczne OECD w odniesieniu do badania chemikaliów nr 457. OECD, Paryż.
 - (24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. Europejskie Centrum ds. Ekotoksykologii i Toksykologii Substancji Chemicznych (sprawozdanie techniczne nr 87).
 - (25) Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. *J. Invest. Dermatol.*, 126, s. 1813–1822.
 - (26) Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. *Toxicol. Lett.* 150, s. 301–316.
 - (27) Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. *Toxicol. in vitro* 27, s. 2225–2232.
 - (28) OECD (2015). Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 213, OECD, Paryż.
 - (29) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 34. OECD, Paryż, Francja.
 - (30) NAFTA (Północnoamerykański Układ Wolnego Handlu) (2012). Technical Working Group on Pesticides – (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 s. <http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf>
-

Dodatek 1

DEFINICJE

Dokładność: stopień zgodności pomiędzy wynikami zastosowania metody badawczej a przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności metody badawczej i jeden z aspektów jej istotności. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność” na oznaczenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy użyciu metody badawczej (29).

Mechanizm wywoływania skutków szkodliwych: sekwencja zdarzeń, począwszy od struktury chemicznej docelowej substancji chemicznej lub grupy podobnych substancji chemicznych poprzez molekularne zdarzenie inicjujące aż do pożądanego wyniku *in vivo* (2).

ARE: element odpowiedzi antyoksydacyjnej (nazywany również EpRE – elementem odpowiedzi elektrofilowej) jest elementem odpowiedzi występującym w obszarze promotora powyżej sekwencji kodującej genu wielu genów cytoprotekcyjnych i II fazy. Podczas aktywacji przez czynnik transkrypcyjny Nrf2 pośredniczy w indukcji transkrypcyjnej tych genów.

Substancja chemiczna: substancja albo mieszanina.

Współczynnik zmienności: miara zmienności wyliczana dla grupy danych dla powtórzeń poprzez podzielenie odchylenia standardowego przez średnią arytmetyczną. Aby przedstawić go w postaci procentowej, można pomnożyć go przez 100.

EC_{1,5}: interpolowane stężenie dla 1,5-krotności indukcji lucyferazy.

IC₃₀: stężenie powodujące zmniejszenie żywotności komórek o 30 %.

IC₅₀: stężenie powodujące zmniejszenie żywotności komórek o 50 %.

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

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

I_{max}: maksymalny współczynnik sygnału aktywności lucyferazy w porównaniu z kontrolą z rozpuszczalnikiem (kontrolą ujemną) mierzony przy dowolnym stężeniu badanej substancji chemicznej.

Keap1: białko związane ECH typu Kelch 1; białko sensorowe, które może regulować aktywność Nrf2. W warunkach nieindukowanych białko sensorowe Keap1 oddziałuje na czynnik transkrypcyjny Nrf2, powodując ubikwitynację i degradację proteolityczną w proteasomie. Kowalencyjna modyfikacja reaktywnych pozostałości cysteiny Keap1 przez drobne cząsteczki mogą powodować dysocjację Nrf2 od Keap1 (8) (10) (11).

Mieszanina: mieszanina lub roztwór, które składają się z dwóch lub więcej substancji niewchodzących ze sobą w reakcję (1).

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

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

Nrf2: czynnik jądrowy 2 związany z NF-E2 (ang. nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2); czynnik transkrypcyjny biorący udział w mechanizmie odpowiedzi antyoksydacyjnej. Gdy Nrf2 nie jest ubikwitynowany, gromadzi się w cytoplazmie i przemieszcza się do jądra, gdzie łączy się z ARE w obszarze promotora powyżej sekwencji kodującej genu wielu genów cytoprotekcyjnych, inicjując ich transkrypcję (8) (10) (11).

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

Istotność: opis powiązania badania z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest ono znaczące i użyteczne z punktu widzenia określonego celu. Jest to zakres, w jakim badanie pozwala prawidłowo zmierzyć lub przewidzieć biologiczny oczekiwany skutek. Istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) metody badawczej (29).

Wiarygodność: miary zakresu, w jakim metoda badawcza może być przeprowadzana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jej przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją, obliczając odtwarzalność wewnątrz- i międzylaboratoryjną oraz powtarzalność wewnątrzlaboratoryjną (29).

Odtwarzalność: zgodność wyników uzyskanych w wyniku badania tej samej substancji chemicznej przy użyciu tego samego protokołu badania (zob. wiarygodność) (29).

Czułość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik dodatni / aktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą danej metody badawczej. Jest to miara dokładności metody badawczej, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności metody badawczej (29).

Kontrola z rozpuszczalnikiem/nośnikiem: kontrola zawierająca wszystkie składniki układu badawczego z wyjątkiem badanej substancji chemicznej, ale z uwzględnieniem stosowanego rozpuszczalnika. Wykorzystywana jest do określenia wyjściowej reakcji dla próbek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w tym samym rozpuszczalniku.

Swoistość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik ujemny / nieaktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą danej metody badawczej. Jest to miara dokładności metody badawczej, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności metody badawczej (29).

Substancja: pierwiastki chemiczne i ich związki w stanie naturalnym lub uzyskane w wyniku dowolnego procesu produkcyjnego, w tym wszelkie dodatki konieczne do zachowania trwałości produktu i wszelkie zanieczyszczenia powstałe w wyniku zastosowanego procesu, z wyłączeniem wszelkich rozpuszczalników, które można oddzielić bez wpływu na stabilność substancji i bez zmiany jej składu (1).

Badana substancja chemiczna: termin „badana substancja chemiczna” jest używany w odniesieniu do substancji będącej przedmiotem badania.

Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (GHS ONZ): system, w ramach którego proponuje się klasyfikację substancji chemicznych (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz omawia się odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak: piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki substancji i produktów niebezpiecznych, aby przekazać informacje na temat ich szkodliwego działania w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) i środowiska (1).

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

Właściwa metoda badawcza: metoda badawcza, którą uznano za wystarczająco istotną i wiarygodną dla danego celu i która opiera się na uzasadnionych naukowo podstawach. Metoda badawcza nie może zostać uznana za właściwą w sensie absolutnym, ale tylko w odniesieniu do określonego celu (29).

Dodatek 2

SUBSTANCJE SŁUŻĄCE DO WYKAZANIA BIEGŁOŚCI

Badanie działania uczulającego na skórę *in vitro*: metoda badawcza z wykorzystaniem lucyferazy ARE-Nrf2

Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania niniejszej metody badawczej laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną, prawidłowo określając prognozę KeratinoSens™ dla 10 substancji służących do wykazania biegłości wskazanych w tabeli 1 oraz określając wartości EC_{1,5} i IC₅₀, które mieszczą się w odpowiednim zakresie odniesienia, dla co najmniej 8 z 10 substancji służących do wykazania biegłości. Substancje służące do wykazania biegłości wybrano w taki sposób, aby odzwierciedlić zakres reakcji na zagrożenia związane z działaniem uczulającym na skórę. Przy wyborze substancji kierowano się również następującymi kryteriami: dostępnością handlową tych substancji, dostępnością wysokiej jakości danych referencyjnych z badań *in vivo* oraz dostępnością wysokiej jakości danych *in vitro* uzyskanych w wyniku przeprowadzenia badania KeratinoSens™.

Tabela 1

Zalecane substancje służące do wykazania biegłości technicznej w odniesieniu do badania KeratinoSens™

Substancje służące do wykazania biegłości	Numer CAS	Stan skupienia	Prognoza <i>in vivo</i> ⁽¹⁾	KeratinoSens™ Prognoza ⁽²⁾	Zakres odniesienia EC _{1,5} (µM) ⁽³⁾	Zakres odniesienia IC ₅₀ (µM) ⁽³⁾
Izopropanol	67-63-0	Ciecz	Brak działania uczulającego	Ujemny	>1 000	>1 000
Kwas salicylowy	69-72-7	Substancja stała	Brak działania uczulającego	Ujemny	>1 000	>1 000
Kwas mlekowy	50-21-5	Ciecz	Brak działania uczulającego	Ujemny	>1 000	>1 000
Glicerol	56-81-5	Ciecz	Brak działania uczulającego	Ujemny	>1 000	>1 000
Alkohol cynamylowy	104-54-1	Substancja stała	Czynnik uczulający (słaby)	Dodatni	25–175	>1 000
Dimetakrylan glikolu etylenowego	97-90-5	Ciecz	Czynnik uczulający (słaby)	Dodatni	5–125	>500
2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	Substancja stała	Czynnik uczulający (w stopniu umiarkowanym)	Dodatni	25–250	>500
Metylodibromoglutaronitryl	35691-65-7	Substancja stała	Czynnik uczulający (silny)	Dodatni	<20	20–100
Siarczan 4-metyloaminofenolu	55-55-0	Substancja stała	Czynnik uczulający (silny)	Dodatni	<12,5	20–200
2,4-dinitrochlorobenzen	97-00-7	Substancja stała	Czynnik uczulający (wyjątkowo silny)	Dodatni	<12,5	5–20

⁽¹⁾ Prognozy zagrożenia (i siły działania) *in vivo* są oparte na danych z badania LLNA (13). Siłę działania *in vivo* określa się na podstawie kryteriów zaproponowanych przez ECETOC (24).

⁽²⁾ Prognozę KeratinoSens™ należy rozpatrywać w ramach IATA i zgodnie z przepisami pkt 9 i 11 niniejszej metody badawczej.

⁽³⁾ Na podstawie historycznych wartości zaobserwowanych (12).

Dodatek 3

KONTROLA JAKOŚCI POMIARÓW LUMINESCENCJI

Podstawowe doświadczenie mające na celu zapewnienie optymalnych pomiarów luminescencji w ramach badania KeratinoSens™

Następujące trzy parametry mają decydujące znaczenie dla zapewnienia uzyskania wiarygodnych wyników badania luminometrem:

- wystarczająca czułość zapewniająca stabilne tło w dołkach kontrolnych;
- brak gradientu na płycie wskutek długiego czasu trwania odczytu; oraz
- brak zanieczyszczenia światłem sąsiednich dołków przez dołki o dużej aktywności.

Przed badaniem zalecane jest zapewnienie odpowiednich pomiarów luminescencji poprzez zbadanie układu płytek kontrolnych zgodnie z poniższym opisem (analiza potrójna).

Układ płytek na potrzeby pierwszego doświadczenia próbnego

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu
B	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu
C	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu
D	Dimetakrylan glikolu etylenowego 0,98	Dimetakrylan glikolu etylenowego 1,95	Dimetakrylan glikolu etylenowego 3,9	Dimetakrylan glikolu etylenowego 7,8	Dimetakrylan glikolu etylenowego 15,6	Dimetakrylan glikolu etylenowego 31,25	Dimetakrylan glikolu etylenowego 62,5	Dimetakrylan glikolu etylenowego 125	Dimetakrylan glikolu etylenowego 250	Dimetakrylan glikolu etylenowego 500	Dimetakrylan glikolu etylenowego 1 000	Dimetakrylan glikolu etylenowego 2 000
E	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu
F	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu
G	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu
H	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Sulfotlenek dimetylu	Aldehyd cynamonowy 4	Aldehyd cynamonowy 8	Aldehyd cynamonowy 16	Aldehyd cynamonowy 32	Aldehyd cynamonowy 64	Próba ślepa

EGDMA = dimetakrylan glikolu etylenowego (nr CAS: 97-90-5), silnie indukująca substancja chemiczna

CA = aldehyd cynamonowy, pozytywna chemiczna substancja odniesienia (nr CAS: 104-55-2)

Analiza kontroli jakości powinna wykazać:

- wyraźną zależność dawka-odpowiedź w rzędzie D, z wartością I_{\max} >20-krotności tła (w większości przypadków osiągnęte są wartości I_{\max} wynoszące 100–300);

- brak zależności dawka-odpowiedź w rzędach C i E (wartość indukcji nie wyższa niż 1,5, a w idealnych warunkach nie wyższa niż 1,3) wskutek możliwego zanieczyszczenia światłem, w szczególności w sąsiedztwie dołków o dużej aktywności w rzędzie zawierającym dimetakrylan glikolu etylenowego;
 - brak statystycznie istotnej różnicy między rzędami A, B, C, E, F i G (tj. brak gradientu na płycie); oraz
 - zmienność w każdym z rzędów A, B, C, E, F i G oraz w dołkach zawierających sulfotlenek dimetylu w rzędzie H nie powinna przekraczać 20 % (tj. powinno istnieć stabilne tło).
-

B.61 Metoda badania przecieku fluoresceiny do celów identyfikacji substancji żrących i silnie drażniących dla oczu

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 460 (2012). Metoda badania przecieku fluoresceiny (FL) jest metodą badawczą *in vitro*, którą można stosować w niektórych okolicznościach i przy określonych ograniczeniach w celu zaklasyfikowania substancji chemicznych (substancji i mieszanin) jako substancji żrących i silnie drażniących dla oczu, określonych przez Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów Organizacji Narodów Zjednoczonych (GHS ONZ) (kategoria 1), rozporządzenie (WE) nr 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin (rozporządzenie CLP) ⁽¹⁾ (kategoria 1) oraz Agencję Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (EPA) (kategoria I) (1)(2). Do celów niniejszej metody badawczej substancje silnie drażniące dla oczu definiuje się jako substancje chemiczne, które powodują uszkodzenie tkanki oka po podaniu badanej substancji chemicznej, nieustępujące w ciągu 21 dni lub powodujące poważne fizyczne pogorszenie widzenia, a substancjami żrącymi dla oczu są substancje chemiczne, które powodują nieodwracalne uszkodzenie tkanki oka. Te substancje chemiczne zostały zaklasyfikowane do kategorii 1 wg GHS ONZ, kategorii 1 wg unijnego rozporządzenia CLP lub kategorii I wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych.

Chociaż uważa się, że metoda badawcza FL nie może całkowicie zastąpić badania na oku królika *in vivo*, zaleca się jej stosowanie w ramach zintegrowanej strategii badań do celów regulacyjnej klasyfikacji i oznakowania. Metoda badawcza FL jest zatem zalecana jako wstępny etap w ramach podejścia odgórnego do identyfikacji substancji żrących/silnie drażniących dla oczu, szczególnie w przypadku ograniczonych rodzajów substancji chemicznych (tj. substancji i mieszanin rozpuszczalnych w wodzie) (3)(4).

Obecnie powszechnie uznaje się, że w dającej się przewidzieć przyszłości żaden pojedynczy test działania drażniącego na oko *in vitro* nie będzie w stanie zastąpić testu działania drażniącego na oko *in vivo* (metoda badawcza B.5 (5)) do celów prognozowania pełnego zakresu działania drażniącego różnych klas chemicznych. Strategiczne połączenia kilku alternatywnych metod badawczych w ramach (zintegrowanej) strategii badań mogą jednak być w stanie zastąpić test działania drażniącego na oczy *in vivo* (4). Podejście odgórne (4) ma w założeniu być stosowane wówczas, gdy na podstawie istniejących informacji oczekuje się, że substancja chemiczna będzie miała wysoki potencjał działania drażniącego.

W oparciu o model prognozowania opisany szczegółowo w pkt 35 metoda badawcza FL pozwala zidentyfikować substancje chemiczne w ograniczonej dziedzinie zastosowania jako substancje żrące/silnie drażniące dla oczu (kategoria 1 wg GHS ONZ; kategoria 1 wg unijnego rozporządzenia CLP; kategoria I wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych) bez konieczności przeprowadzania dalszych badań. To samo zakłada się w odniesieniu do mieszanin, chociaż mieszanin nie używano w walidacji. Metodę badawczą FL można zatem wykorzystywać w celu ustalenia działania drażniącego/żrącego substancji chemicznych dla oczu zgodnie ze strategią badań sekwencyjnych metody badawczej B.5 (5). Substancja chemiczna, w odniesieniu do której w ramach metody badawczej FL nie przewiduje się, żeby była żrąca lub silnie drażniąca dla oczu, musiałaby jednak zostać przebadana przy użyciu co najmniej jednej dodatkowej metody badawczej (*in vitro* lub *in vivo*), która umożliwi dokładną identyfikację (i) substancji chemicznych, które są substancjami żrącymi/silnie drażniącymi dla oczu dającymi w badaniu FL wynik fałszywie ujemny *in vitro* (kategoria 1 wg GHS ONZ; kategoria 1 wg unijnego rozporządzenia CLP; kategoria I wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych); (ii) substancji chemicznych, które nie są sklasyfikowane jako substancje żrące/drażniące dla oczu (brak kategorii wg GHS ONZ; brak kategorii wg unijnego rozporządzenia CLP; kategoria IV wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych), lub (iii) substancji chemicznych, które są substancjami umiarkowanie/delikatnie drażniącymi dla oczu (kategorie 2A i 2B wg GHS ONZ; kategoria 2 wg unijnego rozporządzenia CLP; kategorie II i III wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych).

Niniejsza metoda badawcza ma na celu opisanie procedur stosowanych do oceny potencjalnego działania żrącego lub silnie drażniącego badanej substancji chemicznej na oczy, określanego na podstawie potencjału powodowania przez tę substancję uszkodzenia nieprzepuszczalnej zlewającej się jednowarstwowej hodowli komórek. Spójność przepuszczalności przelnabłonkowej jest główną funkcją nabłonka występującego w spojówce i rogówce. Przepuszczalność przelnabłonkowa jest kontrolowana przez różne połączenia ścisłe. Wykazano, że wzrost przepuszczalności nabłonka rogówki *in vivo* powiązany jest ze stopniem nasilenia stanu zapalnego i uszkodzenia powierzchniowego obserwowanym wraz z rozwojem podrażnienia oczu.

W metodzie badawczej FL efekty toksyczne po krótkim czasie narażenia na działanie badanej substancji chemicznej są mierzone na podstawie wzrostu przepuszczalności soli sodowej fluoresceiny przez jednowarstwową hodowlę komórek nabłonka psiej nerki Madin-Darby'ego (MDCK) na przepuszczalnych insertach. Wielkość przecieku fluoresceiny, który występuje, jest proporcjonalna do uszkodzenia połączeń ścisłych, połączeń desmosomalnych i błon komórkowych wywołanego przez substancję chemiczną. Może być wykorzystana do oszacowania potencjału toksyczności badanej substancji chemicznej dla oczu. W dodatku 1 znajduje się schemat przedstawiający hodowlę komórek MDCK na membranie insertu do celów metody badawczej FL.

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

Definicje znajdują się w dodatku 2.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

Niniejsza metoda badawcza opiera się na protokole nr 71 INVITTOX (6), który został oceniony w ramach międzynarodowego badania walidacyjnego przez Europejskie Centrum Uznawania Metod Alternatywnych (ECVAM) przy udziale Międzyagencyjnego Komitetu Koordynacyjnego ds. Uznawania Metod Alternatywnych (ICCVAM) i Japońskiego Centrum Uznawania Metod Alternatywnych (JaCVAM).

Metoda badawcza FL nie jest zalecana do celów identyfikacji substancji chemicznych, które powinny być sklasyfikowane jako umiarkowanie/delikatnie drażniące, lub substancji chemicznych (substancji i mieszanin), których nie należy sklasyfikować jako drażniących dla oczu (tj. kategoria 2A/2B i brak kategorii wg GHS; kategoria 2 i brak kategorii wg unijnego rozporządzenia CLP; kategoria II/III/IV wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych), jak wynika z badania walidacyjnego (3) (7).

Ta metoda badawcza ma zastosowanie wyłącznie do badania substancji chemicznych rozpuszczalnych w wodzie (substancji i mieszanin). Metoda badawcza FL na ogół daje dokładną prognozę potencjału działania silnie drażniącego na oczy w przypadku substancji chemicznych, które są rozpuszczalne w wodzie, lub w przypadku gdy rozcieńczenie nie ma wpływu na efekt toksyczny (7). Aby można było substancję chemiczną zaliczyć do substancji rozpuszczalnych w wodzie, w warunkach doświadczalnych substancja ta powinna być rozpuszczalna w sterylnym zbuforowanym roztworze soli Hanksa, zawierającym wapń (w stężeniu 1,0–1,8 mM) i niezawierającym czerwieni fenolowej, w stężeniu ≥ 250 mg/ml (jedna dawka powyżej wartości granicznej wynoszącej 100 mg/ml). Jeżeli badana substancja chemiczna jest rozpuszczalna w stężeniu poniżej 100 mg/ml, ale przy tym stężeniu już wywołuje przeciek fluoresceiny na poziomie 20 % (tj. $FL_{20} < 100$ mg/ml), nadal jednak można ją zaklasyfikować do kategorii I wg GHS lub kategorii I wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych.

Zidentyfikowane ograniczenia niniejszej metody badawczej powodują, że z dziedziny zastosowania wykluczone są mocne kwasy i zasady, utrwalacze komórek i wysoce lotne substancje chemiczne. Te substancje chemiczne charakteryzują się mechanizmami, które nie są mierzone w ramach metody badawczej FL, np. znaczną koagulacją, zmydleniem lub szczególnymi właściwościami chemicznymi pod względem reagowania. Inne zidentyfikowane ograniczenia tej metody są oparte na wynikach dotyczących zdolności predykcyjnej w odniesieniu do barwionych i lepkich badanych substancji chemicznych (7). Wyniki te wskazują na to, że oba te rodzaje substancji chemicznych są trudne do usunięcia z jednowarstwowej hodowli komórek po krótkim okresie narażenia i że zdolność predykcyjną tej metody badawczej można byłoby poprawić, gdyby zastosowano większą liczbę etapów przemycania. Stałe substancje chemiczne zawieszony w cieczy mają tendencję do wytrącania się, a stężenie końcowe oddziałujące na komórki może być trudne do ustalenia. Jeżeli z bazy danych wykluczy się substancje należące do tych klas chemicznych i fizycznych, dokładność badania FL w systemach klasyfikacji UE, Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych i GHS znacznie się poprawia (7).

Ze względu na cel niniejszej metody badawczej (tj. zidentyfikowanie wyłącznie substancji żrących/silnie drażniących dla oczu) odsetek wyników fałszywie ujemnych (zob. pkt 13) nie ma decydującego znaczenia, ponieważ takie substancje chemiczne zostaną następnie zbadane za pomocą innych odpowiednio zweryfikowanych badań *in vitro* lub na królikach, w zależności od wymogów regulacyjnych, przy zastosowaniu testów sekwencyjnych zgodnie z podejściem opartym na analizie wagi dowodów (5) (zob. również pkt 3 i 4).

Inne zidentyfikowane ograniczenia metody badawczej FL oparte są na odsetkach wyników fałszywie ujemnych i fałszywie dodatnich. W przypadku wykorzystania metody badawczej FL jako etapu wstępnego w ramach podejścia ogólnego do identyfikacji rozpuszczalnych w wodzie substancji i mieszanin żrących/silnie drażniących dla oczu (kategoria 1 wg GHS ONZ; kategoria 1 wg unijnego rozporządzenia CLP; kategoria I wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych), odsetek wyników fałszywie dodatnich uzyskiwanych przy użyciu metody badawczej FL wynosił od 7 % (7/103; GHS ONZ i unijne rozporządzenie CLP) do 9 % (9/99; Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych), a odsetek wyników fałszywie ujemnych wynosił od 54 % (15/28; Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych) do 56 % (27/48; GHS ONZ i unijne rozporządzenie CLP) w porównaniu z wynikami *in vivo*. W niniejszym dokumencie nie określono grup chemicznych dających wyniki fałszywie dodatnich lub fałszywie ujemne w ramach metody badawczej FL.

Z kulturą komórkową MDCK wiążą się pewne specyficzne ograniczenia techniczne. Połączenia ściśle, które blokują przechodzenie barwnika na bazie soli sodowej fluoresceiny przez jednowarstwową hodowlę komórek, są coraz słabsze wraz ze wzrostem liczby pasażów komórek. Niepełne tworzenie się połączeń ścisłych prowadzi do większego przecieku fluoresceiny w próbie kontrolnej niepoddanej działaniu substancji chemicznej. Istotny jest zatem określony dopuszczalny przeciek maksymalny w próbach kontrolnych niepoddanych działaniu substancji chemicznej (zob. pkt 38: przeciek na poziomie 0 %). Podobnie jak w przypadku badań *in vitro*, komórki mogą z czasem ulec przekształceniu, a zatem konieczne jest określenie przedziałów liczby pasażów na potrzeby badań.

Obecna dziedzina zastosowania może zostać poszerzona w niektórych przypadkach, ale wyłącznie po przeanalizowaniu rozszerzonego zbioru danych dotyczących badanych substancji chemicznych, najlepiej uzyskanych w drodze badań (3). Niniejsza metoda badawcza będzie aktualizowana odpowiednio w miarę uwzględniania nowych informacji i danych.

W każdym laboratorium zaczynającym przeprowadzanie tego badania należy zastosować substancje chemiczne przeznaczone do oceny biegłości wymienione w dodatku 3. Laboratoria mogą stosować te substancje chemiczne w celu wykazania swojej biegłości technicznej w zakresie przeprowadzania metody badawczej FL przed przedstawieniem danych z badania FL do celów regulacyjnej klasyfikacji zagrożeń.

ZASADA BADANIA

Metoda badawcza FL jest badaniem opartym na cytotoksyczności i funkcji komórek *in vitro* przeprowadzanym na zlewającej się jednowarstwowej hodowli rurkowatych komórek nabłonkowych MDCK CB997, które są hodowane na półprzepuszczalnych insertach i stanowią model stanu nierozmnażającego się nabłonka rogówki *in vivo*. Linia komórkowa MDCK jest linią sprawdzoną, która tworzy połączenia ścisłe i desmosomalne podobnych do tych, które znajdują się na stronie szczytowej nabłonka spojówki i rogówki. Połączenia ścisłe i desmosomalne *in vivo* zapobiegają penetracji nabłonka rogówki przez substancje rozpuszczone i materiały obce. Utrata nieprzepuszczalności przez nabłonkową wskutek uszkodzenia połączeń ścisłych i desmosomalnych jest jednym z pierwszych etapów podrażnienia oczu wywołanego przez substancję chemiczną.

Badana substancja chemiczna nanoszona jest na zlewającą się warstwę komórek hodowanych na stronie szczytowej insertu. W celu odzwierciedlenia normalnego klirensu w odniesieniu do narażenia ludzi zwykle stosuje się krótki, jednonumitowy okres narażenia. Zaletą krótkiego okresu narażenia jest to, że substancje i mieszaniny na bazie wody można badać w postaci czystej, jeżeli można je łatwo usunąć po upływie okresu narażenia. Pozwala to na dokonanie bardziej bezpośrednich porównań wyników z wpływem danej substancji chemicznej na ludzi. Następnie badaną substancję chemiczną usuwa się, a na stronie szczytowej jednowarstwowej hodowli komórek наноси się na 30 minut barwnik na bazie soli sodowej fluoresceiny o wysokiej fluorescencji. Uszkodzenie połączeń ścisłych spowodowane badaną substancją chemiczną ustala się na podstawie ilości fluoresceiny, która przecieka przez warstwę komórek w określonym czasie.

Ilość barwnika na bazie soli sodowej fluoresceiny, która przechodzi przez jednowarstwową hodowlę komórek i membranę insertu do określonej objętości roztworu znajdującego się w dołku (do którego przecieka barwnik na bazie soli sodowej fluoresceiny), ustala się poprzez pomiar stężenia fluoresceiny w dołku metodą spektrofлуometryczną. Ilość przecieku fluoresceiny (FL) oblicza się poprzez odniesienie do odczytów intensywności fluorescencji (FI) z dwóch prób kontrolnych: próby ślepej oraz próby kontrolnej z maksymalnym przeciekiem. Wartość procentowa przecieku i w związku z tym wielkość uszkodzenia połączeń ścisłych wyrażana jest względem tych prób kontrolnych w odniesieniu do każdego z określonych stężeń badanej substancji chemicznej. Następnie oblicza się FL₂₀ (tj. stężenie, które powoduje 20-procentowy FL względem wartości odnotowanej w odniesieniu do zlewającej się jednowarstwowej hodowli komórek niepoddanej działaniu substancji chemicznej oraz insertów niezawierających komórek). Wartość FL₂₀ (mg/ml) wykorzystuje się w modelu prognozowania do celów identyfikacji substancji żrących i silnie drażniących dla oczu (zob. pkt 35).

Ustanie działania substancji stanowi ważną część profilu toksyczności badanej substancji chemicznej, którą to część również ocenia się metodą badania drażniącego działania na oczy *in vivo*. Wstępne analizy wykazywały, że dane dotyczące ustania działania substancji (do 72 h po narażeniu na działanie substancji chemicznej) mogłyby zwiększać zdolność predykcyjną protokołu 71 INVITTOX, lecz potrzebna jest dalsza ocena, do której przydatne byłyby dodatkowe dane, najlepiej uzyskane w drodze dalszych badań (6). Niniejsza metoda badawcza będzie aktualizowana odpowiednio w miarę uwzględniania nowych informacji i danych.

PROCEDURA

Przygotowanie jednowarstwowej hodowli komórek

Przygotowuje się jednowarstwową hodowlę komórek MDCK CB 997 przy użyciu częściowo zlewających się komórek rosnących w kolbach do kultury komórkowej w pożywce DMEM/Nutrient Mix F12 (1x koncentrat z L-glutaminą, 15 mM buforu HEPES, wapń (w stężeniu 1,0–1,8 mM) i 10 % inaktywowanego ciepłym FCS/FBS). Co istotne, wszystkie pożywki/roztwory używane w badaniu FL powinny zawierać wapń w stężeniu od 1,8 mM (200 mg/l) do 1,0 mM (111 mg/l), aby zapewnić tworzenie się połączeń ścisłych i ich spójność. Należy kontrolować przedział liczby pasażu komórek, aby zapewnić równomierne i powtarzalne tworzenie się połączeń ścisłych. Najlepiej byłoby, gdyby komórki znajdowały się w przedziale pasażu wynoszącym 3–30 od rozmrożenia, ponieważ komórki w tym przedziale pasażu mają podobną funkcję, co ułatwia zapewnienie odtwarzalności wyników badania.

Przed przeprowadzeniem metody badawczej FL komórki odkleja się od kolby poprzez trypsynizację i odwirowuje się, po czym odpowiednią ilość komórek wysiewa się na insertach umieszczonych w płytkach 24-dółkowych (zob. dodatek 1). Do posiewu komórek należy użyć insertów o średnicy 12 mm z membraną z mieszanych estrów celulozy o grubości 80–150 μm i wielkości porów równej 0,45 μm . W badaniu walidacyjnym użyto insertów Millicell-HA o średnicy 12 mm. Parametry insertu i typ membrany są ważne, ponieważ mogą mieć wpływ na wzrost komórek i wiązanie się substancji chemicznej. Niektóre rodzaje substancji chemicznych mogą wiązać się z membraną insertu Millicell-HA, co mogłoby wpływać na interpretację wyników. W celu wykazania równoważności należy zastosować substancje chemiczne przeznaczone do oceny biegłości (zob. dodatek 3), jeżeli stosowane są inne membrany.

Wiązanie się substancji chemicznej z membraną insertu częściej ma miejsce w przypadku kationowych substancji chemicznych, takich jak chlorek benzalkoniowy, które są przyciągane do naładowanej membrany (7). Wiązanie się substancji chemicznej z membraną insertu może wydłużyć okres narażenia na działanie danej substancji chemicznej, co prowadzi do zawyżenia oceny potencjalnej toksyczności tej substancji chemicznej, ale może również powodować fizyczne ograniczenie przecieku fluoresceiny przez insert poprzez związanie się barwnika z kationowym wiązaniem chemicznym z membraną insertu, co prowadzi do zaniżenia oceny potencjalnej toksyczności tej substancji chemicznej. Można to łatwo monitorować poprzez narażenie samej membrany na maksymalne stężenie badanej substancji chemicznej, a następnie dodanie barwnika na bazie soli sodowej fluoresceiny w normalnym stężeniu na standardowy czas (bez próby kontrolnej komórek). Jeżeli dochodzi do wiązania się barwnika na bazie soli sodowej fluoresceiny, po zmyciu materiału badanego membrana insertu jest żółta. Znajomość właściwości wiązania się badanej substancji chemicznej jest zatem niezbędna do interpretowania wpływu substancji chemicznej na komórki.

Posiew komórek na insertach powinien dać zlewającą się jednowarstwową hodowlę komórek w momencie narażenia na działanie substancji chemicznej. Na każdy insert należy dodać $1,6 \times 10^5$ komórek (400 μl zawiesiny komórek o gęstości 4×10^5 komórek/ml). W tych warunkach zlewająca się jednowarstwową hodowlą komórek uzyskiwana jest zwykle po 96 godzinach hodowli. Przed posiewem inserty należy poddać kontroli wzrokowej w celu zapewnienia, aby przyczyną wszelkich uszkodzeń odnotowanych podczas kontroli wzrokowej opisanej w pkt 30 była obróbka.

Kultury komórkowe MDCK należy trzymać w inkubatorach w wilgotnym środowisku o zawartości CO_2 wynoszącej $5\% \pm 1\%$ oraz temperaturze $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Komórki nie powinny być skażone bakteriami, wirusami, mykoplazmą ani grzybami.

Podawanie badanej i kontrolnej substancji chemicznej

Na potrzeby każdej serii doświadczenia należy przygotować świeży roztwór podstawowy badanej substancji chemicznej i wykorzystać go w ciągu 30 minut od przygotowania. Badaną substancję chemiczną należy przygotować w zbuforowanym roztworze soli Hanksa z dodatkiem wapnia (w stężeniu 1,0–1,8 mM) niezawierającym czerwieni fenolowej, aby uniknąć wiązania białek surowicy krwi. Przed przystąpieniem do badania należy ocenić rozpuszczalność substancji chemicznej przy stężeniu 250 mg/ml w zbuforowanym roztworze soli Hanksa. Jeżeli przy tym stężeniu substancja chemiczna tworzy stabilną zawiesinę lub emulsję (tzn. jest jednorodna i nie osiada ani nie rozdziela się na więcej faz niż jedna) przez 30 minut, można dalej wykorzystywać zbuforowany roztwór soli Hanksa jako rozpuszczalnik. Jeżeli jednak zostanie stwierdzone, że substancja chemiczna w takim stężeniu jest nierozpuszczalna w zbuforowanym roztworze soli Hanksa, należy rozważyć zastosowanie innych metod badawczych zamiast badania przecieku fluoresceiny (metoda FL). W przypadkach, w których zostanie stwierdzone, że substancja chemiczna jest nierozpuszczalna w zbuforowanym roztworze soli Hanksa, należy z ostrożnością podchodzić do zastosowania lekkiego oleju mineralnego charakterze rozpuszczalnika, ponieważ nie są dostępne wystarczające dane, które pozwoliłyby na wyciągnięcie wniosków na temat skuteczności badania FL w takich warunkach.

Wszystkie substancje chemiczne przeznaczone do badania przygotowuje się w pięciu stałych stężeniach rozcieńczonych w stosunku masowo-objętościowym w sterylnym zbuforowanym roztworze soli Hanksa uzyskanym z roztworu podstawowego, zawierającym wapń (w stężeniu 1,0–1,8 mM) i niezawierającym czerwieni fenolowej: 1, 25, 100, 250 mg/ml oraz czysty lub nasycony roztwór. W przypadku badania substancji chemicznej w stanie stałym należy uwzględnić bardzo wysokie stężenie wynoszące 750 mg/ml. W przypadku poddawania komórek działaniu roztworu substancji chemicznej o tak wysokim stężeniu konieczne może być zastosowanie pipety typu D. Jeżeli zostanie stwierdzone, że stężenie toksyczne mieści się w granicach 25–100 mg/ml, należy dwukrotnie zbadać oddziaływanie następujących dodatkowych stężeń: 1, 25, 50, 75, 100 mg/ml. Z tych stężeń należy wyprowadzić wartość FL_{20} , pod warunkiem że zostały spełnione kryteria dopuszczalności.

Badane substancje chemiczne wprowadza się do zlewających się jednowarstwowych hodowli komórek po usunięciu podłoża do hodowli komórkowych i dwukrotnym przemyciu sterylnym, ciepłym (37 °C) zbuforowanym roztworem soli Hanksa z dodatkiem wapnia (w stężeniu 1,0–1,8 mM) niezawierającym czerwieni fenolowej. Poprzednio filtry zostały podane kontroli wzrokowej pod kątem wcześniejszych uszkodzeń, które mogłyby zostać błędnie przypisane potencjalnym niezgodnościom z badanymi substancjami chemicznymi. Należy zastosować co najmniej trzy kontrpróby w odniesieniu do każdego stężenia badanej substancji chemicznej i na potrzeby prób kontrolnych w każdej serii badań. Po upływie 1 minuty narażenia w temperaturze pokojowej substancję chemiczną należy starannie usunąć przez aspirację, dwukrotnie przemycić jednowarstwową hodowlę komórek sterylnym, ciepłym (37 °C) zbuforowanym roztworem soli Hanksa z dodatkiem wapnia (w stężeniu 1,0–1,8 mM) niezawierającym czerwieni fenolowej, i natychmiast zmierzyć przeciek fluoresceiny.

W każdej serii badania należy zastosować jednoczesną kontrolę ujemną (NC) i jednoczesną kontrolę dodatnią (PC), aby wykazać, że spójność jednowarstwowej hodowli komórek (NC) i czułość komórek (PC) mieszczą się w akceptowanym zakresie zdefiniowanym na podstawie danych historycznych. Proponowaną substancją chemiczną służącą do kontroli dodatniej jest Brij 35 (CAS nr 9002-92-0) w stężeniu 100 mg/ml. Przy takim stężeniu powinno się uzyskać przeciek fluoresceiny wynoszący w przybliżeniu 30 % (dopuszczalny zakres wynosi 20–40 % przecieku fluoresceiny, tzn. uszkodzenie warstwy komórek). Proponowaną substancją chemiczną służącą do kontroli ujemnej jest zbuforowany roztwór soli Hanksa z dodatkiem wapnia (w stężeniu 1,0–1,8 mM) niezawierający czerwieni fenolowej (niepoddana działaniu substancji ślepa próba kontrolna). Każda seria badań powinna również obejmować kontrolę maksymalnego przecieku, aby można było obliczyć wartości FL_{20} . Maksymalny przeciek ustala się za pomocą insertu kontrolnego bez komórek.

Oznaczanie przepuszczalności fluoresceiny

Bezwzględnie po usunięciu badanej i kontrolnej substancji chemicznej dodaje się do insertów (np. Millicel-HA) 400 μ l roztworu soli sodowej fluoresceiny o stężeniu 0,1 mg/ml (0,01 % (w/v) w zbuforowanym roztworze soli Hanksa z dodatkiem wapnia [w stężeniu 1,0–1,8 mM] niezawierającym czerwieni fenolowej). Kultury pozostawia się na 30 minut w temperaturze pokojowej. Pod koniec inkubacji z fluoresceiną inserty ostrożnie usuwa się z każdego dołka. Każdy filtr poddaje się kontroli wzrokowej i odnotowuje się wszelkie uszkodzenia, jakie mogły nastąpić podczas obróbki.

Ilość fluoresceiny, która przeciekła przez jednowarstwową hodowlę komórek i insert, określa się ilościowo w roztworze, który pozostał w dołkach po usunięciu insertów. Pomiarów dokonuje się za pomocą spektrofluorymetru przy wzbudzeniu i emisji fal o długości odpowiednio 485 nm i 530 nm. Czułość spektrofluorymetru powinna być ustawiona w taki sposób, aby różnica liczbowa między maksymalną wartością FL (insert bez komórek) i minimalną wartością FL (insert ze zlewającą się jednowarstwową hodowlą komórek z kontrolą ujemną) była największa. Ze względu na różnice w stosowanym spektrofluorymetrze proponuje się, aby ustawić czułość dającą intensywność fluorescencji > 4 000 przy kontroli maksymalnego przecieku fluoresceiny. Maksymalna wartość FL nie powinna przekraczać 9 999. Maksymalna intensywność przecieku fluorescencji powinna mieścić się w granicach liniowego zakresu użytego do badania spektrofluorymetru.

Interpretacja wyników i model prognozowania

Wielkość FL jest proporcjonalna do uszkodzenia połączeń ścisłych wywołanego przez substancję chemiczną. Wyrażony procentowo FL w odniesieniu do każdego badanego stężenia substancji chemicznej oblicza się na podstawie wartości FL uzyskanych w odniesieniu do badanej substancji chemicznej w stosunku do wartości FL z kontroli ujemnej (odczyt dla zlewającej się jednowarstwowej hodowli komórek poddanej działaniu substancji służącej do kontroli ujemnej) i kontroli maksymalnego przecieku (odczyt ilości FL z insertu bez komórek).

Średnia maksymalna intensywność fluorescencji przecieku = x

Średnia wartość intensywności fluorescencji przecieku 0 % (kontrola ujemna) = y

Średni przeciek o wartości 100 % uzyskuje się, odejmując średni przeciek o wartości 0 % od średniego maksymalnego przecieku.

tzn. $x - y = z$

Procentowy przeciek w odniesieniu do każdej stałej dawki uzyskuje się, odejmując przeciek o wartości 0 % od średniej intensywności fluorescencji z odczytów dla trzech kontrprób (m) i dzieląc tę wartość przez przeciek o wartości 100 %, tj. $\% FL = [(m-y) / z] \times 100 \%$, gdzie:

M = średnia intensywność fluorescencji z trzech pomiarów kontrpróby w odniesieniu do danego stężenia,

% FL = odsetek fluoresceiny, która przecieka przez warstwę komórek.

Do obliczenia stężenia substancji chemicznej powodującego 20-procentowy FL należy użyć poniższego równania:

$$FL_D = [(A-B) / (C-B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

gdzie:

D = % inhibicji

A = % uszkodzenia (20-procentowy przeciek fluoresceiny)

B = % przecieku fluoresceiny < A

C = % przecieku fluoresceiny > A

M_C = Stężenie C (mg/ml)

M_B = Stężenie B (mg/ml)

Wartość graniczna FL₂₀ na potrzeby przewidywania, które substancje chemiczne są substancjami żrącymi / silnie drażniącymi dla oczu, jest podana poniżej:

FL ₂₀ (mg/ml)	C&L wg GHS ONZ	C&L wg unijnego rozporządzenia CLP	C&L wg amerykańskiej agencji EPA
≤100	Kategoria 1	Kategoria 1	Kategoria I

C&L: klasyfikacja i oznakowanie

Zaleca się stosowanie metody badawczej FL wyłącznie do celów identyfikacji substancji żrących i silnie drażniących dla oczu rozpuszczalnych w wodzie (kategoria 1 wg GHS ONZ, kategoria 1 wg unijnego rozporządzenia CLP, kategoria I wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych) (zob. pkt 1 i 10).

W celu zidentyfikowania substancji chemicznych rozpuszczalnych w wodzie (substancji i mieszanin) (3) (6) (7) jako „powodujące poważne uszkodzenie oczu” (kategoria 1 wg GHS ONZ / unijnego rozporządzenia CLP) lub jako „żrące lub silnie drażniące dla oczu” (kategoria I wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych) badana substancja chemiczna powinna indukować wartość FL₂₀ ≤ 100 mg/ml.

Dopuszczenie wyników

Średnia wartość maksymalnego przecieku fluoresceiny (x) powinna przekraczać 4 000 (zob. pkt 31), średni przeciek o wartości 0 % powinien być równy lub niższy niż 300, a średni przeciek o wartości 100 % (z) powinien mieścić się w granicach od 3 700 do 6 000.

Badanie uznaje się za dopuszczalne, jeżeli w kontroli dodatniej uzyskano uszkodzenie warstwy komórek w przedziale 20–40 % (miara jako odsetek przecieku fluoresceiny).

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Dane

W odniesieniu do każdej serii badania dane uzyskane z poszczególnych dołków z kontrpróbą (np. wartości intensywności fluorescencji i obliczone procentowe dane FL w odniesieniu do każdej badanej substancji chemicznej, łącznie z klasyfikacją) należy podać w postaci tabeli. Ponadto należy zgłosić średnie ± odchylenia standardowe dla pomiarów poszczególnych kontrprób w każdej serii badań.

Sprawozdanie z badania

Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badane i kontrolne substancje chemiczne

- nazwa systematyczna (nazwy systematyczne), np. nazwa strukturalna używana przez Chemical Abstracts Service (CAS), po której następują inne nazwy, jeżeli są znane;
- numer CAS substancji chemicznej, jeżeli jest znany;
- czystość i skład substancji lub mieszaniny (jako wartość procentowa masy), w zakresie, w jakim te informacje są dostępne;
- właściwości fizykochemiczne istotne dla przebiegu badania, np. stan skupienia, lotność, pH, stabilność, rozpuszczalność w wodzie, klasa chemiczna);
- postępowanie z badaną/kontrolną substancją chemiczną przed rozpoczęciem badań, w stosownych przypadkach (np. podgrzewanie, mielenie);
- warunki przechowywania.

Uzasadnienie zastosowanej metody badawczej i protokołu

- należy wziąć pod uwagę względy związane z dziedziną zastosowania i ograniczenia metody badawczej.

Warunki badania

- opis zastosowanego układu komórek, w tym certyfikat autentyczności i stan linii komórkowej pod względem mykoplazmy;
- szczegółowe dane na temat zastosowanej procedury badawczej;
- zastosowane stężenia badanej substancji chemicznej;
- czas narażenia na działanie badanej substancji chemicznej;
- czas inkubacji z fluoresceiną;
- opis wszelkich modyfikacji procedury badawczej;
- opis zastosowanych kryteriów oceny;
- odniesienie do danych historycznych dotyczących modelu (np. kontrole ujemne i dodatnie, w stosownych przypadkach substancje odniesienia);
- informacje na temat biegłości technicznej wykazanej przez laboratorium.

Wyniki

- tabelaryczne zestawienie danych uzyskanych w odniesieniu do poszczególnych badanych substancji chemicznych i prób kontrolnych w każdej serii badań i dla każdego pomiaru kontrpróby (w tym poszczególne wyniki, średnie i odchylenia standardowe);
- ustalone na tej podstawie klasyfikacje z odniesieniem do modelu prognozowania lub zastosowanych kryteriów podejmowania decyzji;
- opis innych zaobserwowanych skutków.

Omówienie wyników

- powinno obejmować kwestie dotyczące niejednoznacznego rezultatu (pkt 35: FL₂₀ > 100 mg/ml) i dalszych badań.

Wnioski

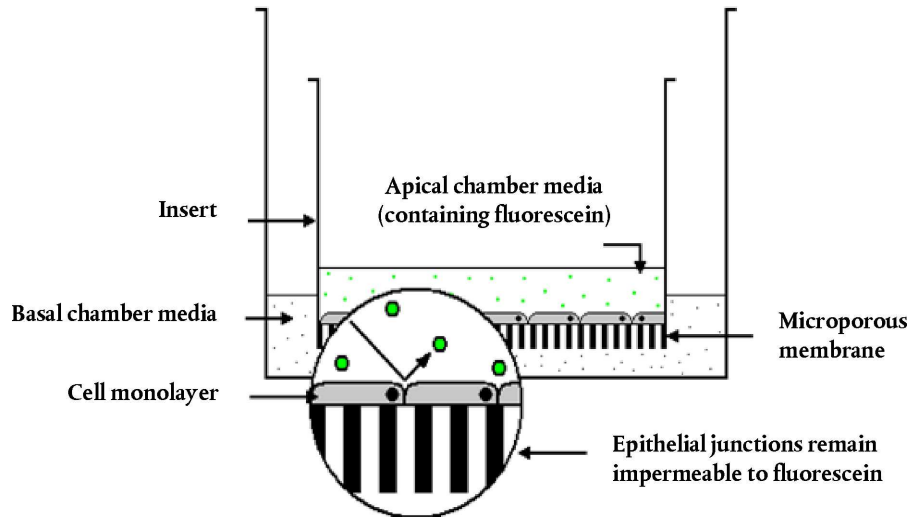
BIBLIOGRAFIA

- (1) ONZ (2009), Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS), wydanie trzecie zmienione, Nowy Jork i Genewa: publikacje Organizacji Narodów Zjednoczonych. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostępne na stronie internetowej: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]
 - (2) Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (1996). Label Review Manual; wyd. II. EPA737-B-96-001. Waszyngton D.C.: Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych.
 - (3) EC-ECVAM (2009), Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based *in vitro* assays for eye irritation testing.
 - (4) 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, s. 1–9.
 - (5) Rozdział B.5 niniejszego załącznika, *Działanie żrące / silnie drażniące na oczy*.
 - (6) EC-ECVAM (1999), INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Włochy: Europejskie Centrum Uznawania Metod Alternatywnych (ECVAM). Dostępne na stronie internetowej: [<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu>]
 - (7) EC-ECVAM (2008), Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing.
 - (8) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, seria OECD dotycząca badań i oceny nr 34. OECD, Paryż.
-

Dodatek 1

SCHEMAT PRZEDSTAWIAJĄCY HODOWLĘ KOMÓREK MDCK NA MEMBRANIE INSERTU DO CELÓW METODY BADAWCZEJ FL

Zlewająca się warstwa komórek MDCK jest hodowana na półprzepuszczalnej membranie insertu. Inserty umieszcza się w dołkach 24-dołkowych płytek.



Rysunek zaczerpnięto z: Wilkinson, P.J. (2006), Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure, praca doktorska, Uniwersytet Nottingham, Zjednoczone Królestwo.

Dodatek 2

DEFINICJE

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

Substancja chemiczna: substancja albo mieszanina.

Kategoria I wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (EPA): substancje chemiczne, które powodują poważne uszkodzenie oka (nieodwracalne uszkodzenie tkanki oka) lub zmiany rogówkowe lub podrażnienie rogówki utrzymujące się dłużej niż 21 dni (2).

Unijne rozporządzenie CLP (rozporządzenie (WE) nr 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin): wdraża w Unii Europejskiej (UE) system GHS ONZ służący do klasyfikacji chemikaliów (substancji i mieszanin).

Odsetek wyników fałszywie ujemnych: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik dodatni fałszywie zidentyfikowanych po zastosowaniu metody badawczej jako dające wynik ujemny. Jest to jeden ze wskaźników efektywności metody badawczej.

Odsetek wyników fałszywie dodatnich: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik ujemny fałszywie zidentyfikowanych po zastosowaniu metody badawczej jako dające wynik dodatni. Jest to jeden ze wskaźników efektywności metody badawczej.

FL₂₀: może być oszacowana na podstawie oznaczenia stężenia, przy którym badana substancja chemiczna powoduje przeciek 20 % fluoresceiny przez warstwę komórek.

Przeciek fluoresceiny: ilość fluoresceiny przechodząca przez warstwę komórek i zmierzona metodą spektrofлуorymetryczną.

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

Kategoria 1 wg GHS: uszkodzenie tkanki oka lub poważne fizyczne pogorszenie widzenia spowodowane zaaplikowaniem badanej substancji chemicznej na przednią powierzchnię oka, które nie jest w pełni odwracalne w ciągu 21 dni po zaaplikowaniu.

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

Mieszanina: pojęcie użyte w kontekście GHS ONZ oznacza mieszaninę lub roztwór, które składają się z co najmniej dwóch substancji niewchodzących ze sobą w reakcję.

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

Niezaklasyfikowane: substancje chemiczne, które nie zostały zaklasyfikowane jako należące do kategorii 1, 2A lub 2B wg GHS ONZ; kategorie 1 lub 2 wg unijnego rozporządzenia CLP; lub kategorie I, II lub III substancji drażniących dla oczu wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych.

Substancja żrąca dla oczu: a) substancja chemiczna powodująca nieodwracalne uszkodzenie tkanki oka; b) substancje chemiczne, które nie zostały zaklasyfikowane do kategorii 1 wg GHS ONZ; kategoria 1 wg unijnego rozporządzenia CLP; lub kategoria I substancji drażniących dla oczu wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych.

Substancja drażniąca dla oczu: a) substancja chemiczna, która powoduje odwracalną zmianę w oku w następstwie jej wprowadzenia na przednią powierzchnię oka; b) substancje chemiczne, które nie zostały zaklasyfikowane do kategorii 2A lub 2B wg GHS ONZ; kategoria 2 wg unijnego rozporządzenia CLP; lub kategorie II lub III substancji drażniących dla oczu wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych.

Substancja silnie drażniąca dla oczu: a) substancja chemiczna powodująca uszkodzenie tkanki oka w następstwie jej wprowadzenia na przednią powierzchnię oka, które nie ustępuje w ciągu 21 dni od podania, lub powodująca poważne fizyczne pogorszenie widzenia; b) substancje chemiczne, które nie zostały zaklasyfikowane do kategorii 1 wg GHS ONZ; kategoria 1 wg unijnego rozporządzenia CLP; lub kategoria I substancji drażniących dla oczu wg Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych.

Kontrola dodatnia: kontrola zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, poddana działaniu substancji chemicznej, o której wiadomo, że wywołuje reakcję dodatnią. Aby zapewnić możliwość oceny zmienności reakcji w pozytywnej próbie kontrolnej w czasie, stopień reakcji dodatniej nie powinien być skrajnie duży.

Substancje chemiczne przeznaczone do oceny biegłości: podzbiór substancji z listy substancji chemicznych odniesienia, który początkujące laboratorium może wykorzystać w celu wykazania biegłości w odniesieniu do zweryfikowanej referencyjnej metody badawczej.

Istotność: opis powiązania badania z oczekiwanym skutkiem oraz czy jest ono znaczące i użyteczne z punktu widzenia określonego celu. Jest to zakres, w jakim badanie pozwala prawidłowo zmierzyć lub przewidzieć oczekiwany skutek biologiczny. Istotność obejmuje uwzględnienie dokładności (zgodności) metody badawczej (8).

Wiarygodność: miary zakresu, w jakim metoda badawcza może być przeprowadzana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami na przestrzeni czasu w przypadku jej przeprowadzania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją, obliczając odtwarzalność wewnątrz- i międzylaboratoryjną oraz powtarzalność wewnątrzlaboratoryjną.

Badanie zastępcze: badanie, które ma na celu zastąpienie badania stosowanego rutynowo i zaakceptowanego do identyfikacji zagrożeń lub oceny ryzyka i w odniesieniu do którego ustalono, że w porównaniu do zaakceptowanego badania zapewnia odpowiednio równoważną lub lepszą ochronę zdrowia ludzi lub zwierząt lub środowiska we wszystkich możliwych warunkach badania i w odniesieniu do wszystkich możliwych substancji chemicznych.

Czułość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik dodatni / aktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą badania. Jest to miara dokładności metody badawczej, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności metody badawczej (8).

Poważne uszkodzenie oczu: uszkodzenie tkanki oka lub poważne fizyczne pogorszenie widzenia spowodowane zaaplikowaniem badanej substancji chemicznej na przednią powierzchnię oka, które nie są w pełni odwracalne w ciągu 21 dni po zaaplikowaniu.

Kontrola z rozpuszczalnikiem/nośnikiem: próbka niepoddana działaniu badanej substancji, zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, w tym rozpuszczalnik lub nośnik, która jest przetwarzana razem z próbkami poddawanymi działaniu badanej substancji oraz z innymi próbkami kontrolnymi w celu określenia wyjściowej reakcji dla próbek poddanych działaniu badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w tym samym rozpuszczalniku lub nośniku. W przypadku badania z jednoczesną kontrolą ujemną próbka ta wykazuje również, czy rozpuszczalnik lub nośnik wchodzi w reakcję z układem badawczym.

Swoistość: odsetek wszystkich substancji chemicznych dających wynik ujemny / nieaktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych za pomocą badania. Jest to miara dokładności metody badawczej, która daje wyniki definitywne i stanowi istotny parametr w ocenie istotności metody badawczej (8).

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

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

Wielopoziomowa strategia badań: strategia badań sekwencyjnych, w ramach której wszystkie istniejące informacje na temat badanej substancji chemicznej są analizowane na każdym poziomie w określonym porządku z zastosowaniem procesu uwzględniającego wagę dowodów w celu określenia, czy dostępna jest wystarczająca ilość informacji do podjęcia decyzji o klasyfikacji zagrożenia, przed przejściem do następnego poziomu. Jeżeli na podstawie dostępnych informacji można przypisać badanej substancji chemicznej potencjał w zakresie wywołania podrażnienia, dodatkowe badania nie są wymagane. Jeżeli na podstawie dostępnych informacji nie można przypisać badanej substancji chemicznej potencjału w zakresie wywołania podrażnień, przeprowadza się procedurę badań sekwencyjnych na zwierzętach do momentu, w którym będzie można dokonać jednoznacznej klasyfikacji.

Zweryfikowana metoda badawcza: metoda badawcza, w odniesieniu do której zakończono badania walidacyjne w celu określenia jej istotności (w tym dokładności) i wiarygodności w odniesieniu do konkretnego celu. Należy zauważyć, że zweryfikowana metoda badawcza może nie wykazywać dostatecznej efektywności z punktu widzenia dokładności i wiarygodności, aby można było ją uznać za dopuszczalną w odniesieniu do danego celu (8).

Waga dowodów: proces analizowania mocnych i słabych stron różnych informacji podczas formułowania wniosku dotyczącego potencjalnego zagrożenia stwarzanego przez daną substancję chemiczną oraz uzasadnienia takiego wniosku.

Dodatek 3

SUBSTANCJE CHEMICZNE PRZEZNACZONE DO OCENY BIEGŁOŚCI W ODNIESIENIU DO METODY BADAWCZEJ FL

Przed przystąpieniem do rutynowego stosowania niniejszej metody badawczej laboratoria powinny wykazać swoją biegłość techniczną, prawidłowo ustalając klasyfikację 8 substancji chemicznych wskazanych w tabeli 1 pod względem działania żrącego na oczy. Wspomniane substancje chemiczne zostały dobrane w taki sposób, by reprezentowały zakres reakcji na miejscowe działanie drażniące/żrące na oczy oparty na wynikach badania na oku królika *in vivo* (wytyczna TG 405, metoda badawcza B.5 (5)) (tj. kategorie 1, 2A, 2B lub brak klasyfikacji zgodnie z GHS ONZ). Biorąc jednak pod uwagę zweryfikowaną użyteczność badania FL (tj. wyłącznie do identyfikowania substancji żrących/silnie drażniących dla oczu), istnieją tylko dwa rezultaty badania na potrzeby klasyfikacji (substancja żrąca/silnie drażniąca albo substancja niewykazująca działania żrącego/silnie drażniącego) do celów wykazania biegłości. Przy wyborze substancji chemicznej kierowano się również następującymi kryteriami: dostępnością handlową tych substancji, dostępnością wysokiej jakości danych referencyjnych z badań *in vivo* oraz istnieniem wysokiej jakości danych uzyskanych dzięki zastosowaniu metody badawczej FL. Z tego względu substancje chemiczne przeznaczone do oceny biegłości zostały wybrane na podstawie dokumentu „Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing” (8), który został wykorzystany do retrospektywnej walidacji metody badawczej FL.

Tabela 1

Substancje chemiczne do zalecanego wykazania biegłości technicznej w odniesieniu do metody badawczej FL

Substancja chemiczna	Nr CAS	Klasa chemiczna ⁽¹⁾	Stan skupienia	Klasyfikacja <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Klasyfikacja <i>in vitro</i> ⁽³⁾
Chlorek benzalkoniowy (5 %)	8001-54-5	Związek onioowy	Ciecz	Kategoria 1	Substancja żrąca/silnie drażniąca dla oczu
Chlorowodorek prometażyny	58-33-3	Amina/amidyna, heterocykliczny organiczny związek siarki	Substancja stała	Kategoria 1	Substancja żrąca/silnie drażniąca dla oczu
Wodorotlenek sodu (10 %)	1310-73-2	Zasada	Ciecz	Kategoria 1	Substancja żrąca/silnie drażniąca dla oczu
Laurylosiarczan sodu (15 %)	151-21-3	Kwas karboksylowy (sól)	Ciecz	Kategoria 1	Substancja żrąca/silnie drażniąca dla oczu
kw. 1,4-benzenodikarboksylowy	619-66-9	Kwas karboksylowy, aldehyd	Substancja stała	Kategoria 2(A)	Substancja niepowodująca poważnego uszkodzenia oka / substancja o słabym działaniu drażniącym
Azotan amonu	6484-52-2	Sól nieorganiczna	Substancja stała	Kategoria 2(A)	Substancja niewykazująca działania żrącego/silnie drażniącego na oczy
2-metyloacetyl-octan etylu	609-14-3	Keton, ester	Ciecz	Kategoria 2(B)	Substancja niewykazująca działania żrącego/silnie drażniącego na oczy
Glicerol	56-81-5	Alkohol	Ciecz	Brak kategorii	Substancja niewykazująca działania żrącego/silnie drażniącego na oczy

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

⁽¹⁾ Klasy chemiczne przypisano do każdej badanej substancji chemicznej, wykorzystując standardowy schemat klasyfikacji oparty o system klasyfikacji Medical Subject Headings (MeSH), opracowany przez National Library of Medicine (dostępny pod adresem <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽²⁾ Na podstawie wyników badania na oku królika *in vivo* (wytyczna OECD TG 405, metoda badawcza B.5) i z zastosowaniem GHS ONZ oraz unijnego rozporządzenia CLP.

⁽³⁾ Na podstawie wyników badania FL (protokół nr 71(6) INVITTOX)

B.62 Test kometowy na ssakach w środowisku zasadowym *in vivo*

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 489 (2016). Test kometowy *in vivo* w środowiskach zasadowych (elektroforeza żelowa pojedynczych komórek) (dalej nazywany po prostu testem kometowym) jest wykorzystywany do wykrywania pęknięć łańcuchów DNA w komórkach lub jądrach komórkowych wyizolowanych z różnych tkanek zwierzęcych, zazwyczaj gryzoni, poddanych działaniu materiałów potencjalnie genotoksycznych. Test kometowy został poddany przeglądowi i różne grupy ekspertów opublikowały zalecenia (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). Niniejsza metoda badawcza stanowi część cyklu metod badawczych dotyczących toksykologii genetycznej. Opracowany został dokument OECD, który zawiera zwięzłe informacje na temat badań w zakresie toksykologii genetycznej oraz przegląd ostatnich zmian, jakie wprowadzono do wytycznych dotyczących badań (11).

Celem testu kometowego jest identyfikacja substancji chemicznych powodujących uszkodzenia DNA. W środowisku zasadowym (>pH 13) test kometowy umożliwia wykrycie jednoniciowych i dwuniciowych pęknięć, spowodowanych na przykład bezpośrednim wzajemnym oddziaływaniem DNA, miejsc nietrwałych w środowisku zasadowym lub na skutek przejściowych pęknięć łańcucha DNA wynikających z procesu naprawy odciętego łańcucha DNA. Wspomniane pęknięcia łańcucha mogą zostać naprawione bez trwałej szkody dla komórki, mogą być śmiertelne dla komórki lub mogą się utrwalić w postaci mutacji prowadzącej do trwałej realnej zmiany. Mogą też prowadzić do aberracji chromosomowej, co wiąże się również z wieloma chorobami ludzkimi, w tym z rakiem.

Formalna próba walidacji testu kometowego *in vivo* na gryzoniach została dokonana w latach 2006–2012 i była koordynowana przez Japońskie Centrum Walidacji Metod Alternatywnych (JaCVAM) we współpracy z Europejskim Centrum Uznawania Metod Alternatywnych (ECVAM), Międzyagencyjnym Komitetem Koordynacyjnym ds. Uznawania Metod Alternatywnych (ICCVAM) oraz NTP Międzyagencyjnego Centrum Oceny Alternatywnych Metod Toksykologicznych (NICEATM) (12). Niniejsza metoda badawcza obejmuje zalecane stosowanie i ograniczenia testu kometowego i jest oparta na końcowym protokole (12) wykorzystanym w próbie walidacyjnej, a także na dodatkowych stosownych opublikowanych i niepublikowanych (stanowiących własność laboratoriów) danych.

Definicje kluczowych terminów zamieszczono w dodatku 1. Należy zauważyć, że do celów tego testu można korzystać z wielu różnych narzędzi (szkiełek mikroskopowych, krążków żelowych, płytek 96-dołkowych itd.) Dla ułatwienia w dalszej części niniejszego dokumentu stosowane będzie pojęcie „szkiełko mikroskopowe”, które obejmuje wszystkie inne narzędzia.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

Test kometowy stanowi metodę pomiaru pęknięć nici łańcucha DNA w komórkach eukariotycznych. Pojedyncze komórki/jądra zatopione w agarozie na szkiełku mikroskopowym poddaje się lizie za pomocą detergentu i roztworu o dużym stężeniu soli. Na tym etapie lizy błony komórki i jądra zostają zniszczone, co umożliwia uwolnienie DNA zwinętego w pętle zwane ogólnie nukleoidami oraz fragmentów DNA. Elektroforeza w środowisku o wysokim pH prowadzi do powstawania struktur podobnych do komet, które, po zastosowaniu odpowiednich barwników fluorescencyjnych, można obserwować pod mikroskopem fluorescencyjnym. Fragmenty DNA migrują od „głowy” do „ogona” w zależności od ich rozmiaru, przy czym „intensywność” ogona komety w stosunku do intensywności całkowitej (głowa plus ogon) odzwierciedla poziom uszkodzenia DNA (13) (14) (15).

Test kometowy w środowisku zasadowym *in vivo* ma szczególne znaczenie dla oceny zagrożenia genotoksycznego ze względu na to, że reakcje występujące w trakcie badania są uzależnione od wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i wydalania *in vivo*, a także od procesu naprawy DNA. Wspomniane procesy mogą przebiegać w różny sposób w zależności od gatunku, tkanki i rodzaju uszkodzenia DNA.

Aby spełnić wymogi w zakresie dobrostanu zwierząt, w szczególności ograniczenia wykorzystania zwierząt (zasada 3R od ang. *replacement, reduction, refinement*, czyli zastąpienie, ograniczenie, udoskonalenie), przedmiotowy test można również łączyć z innymi badaniami toksykologicznymi, np. badaniami toksyczności dawki powtórzonej (10) (16) (17), lub punkt końcowy można łączyć z innymi punktami końcowymi genotoksyczności, takimi jak test mikrojądrowy na erytrocytach ssaków *in vivo* (18) (19) (20). Test kometowy najczęściej przeprowadza się na gryzoniach, chociaż wykorzystuje się w nim także inne gatunki ssaków i gatunki niezaliczane do ssaków. Wykorzystanie gatunków niebędących gryzoniami powinno być naukowo i etycznie uzasadnione w poszczególnych przypadkach, przy czym zdecydowanie zaleca się, aby test kometowy był przeprowadzany na gatunkach innych niż gryzonia tylko w ramach badania toksyczności, a nie jako samodzielny test.

Wyboru drogi narażenia i badanych tkanek należy dokonać na podstawie całej dostępnej/istniejącej wiedzy na temat badanych substancji chemicznych, np. zamierzonej/przewidywanej drogi narażenia człowieka, metabolizmu i dystrybucji, potencjału pod względem skutków w miejscu kontaktu, ostrzeżeń strukturalnych, innych danych dotyczących genotoksyczności lub toksyczności, oraz biorąc pod uwagę cel badania. Zatem w stosownych przypadkach można badać potencjał genotoksyczny badanych substancji chemicznych na tkankach docelowych pod kątem rakotwórczości lub innych efektów toksycznych. Badanie uważa się również za przydatne do celów dalszego badania genotoksyczności stwierdzonej w układzie *in vitro*. Stosowne jest wykonanie testu kometowego *in vivo* na tkance będącej przedmiotem zainteresowania, w przypadku gdy można zasadnie oczekiwać, że badana tkanka będzie odpowiednio narażona.

Test został poddany walidacji w najszerszym zakresie w odniesieniu do tkanek somatycznych samców szczurów w trakcie międzylaboratoryjnych badań porównawczych, takich jak próba JaCVAM (12) i badanie opisane przez Rothfussa *et al.*, 2010 (10). W próbie międzynarodowej walidacji JaCVAM wykorzystano tkanki wątroby i żołądka. Wybrano wątrobę, ponieważ jest to organ biorący najaktywniejszy udział w procesach metabolizmu substancji chemicznych, a także często docelowy organ narażony na rakotwórcze działanie tych substancji. Wybór tkanek żołądka wynikał stąd, że jest to pierwsze miejsce zetknięcia się substancji chemicznych po narażeniu doustnym, jakkolwiek należałoby również uwzględnić inne obszary przewodu pokarmowego, takie jak dwunastnica i jelito czcze, będące miejscami kontaktu, a w przypadku ludzi można je uznać za istotniejsze niż gruczołowy żołądek gryzoni. Należy zapewnić, aby takie tkanki nie były narażone na zbyt wysokie stężenia badanej substancji chemicznej (21). Technika ta ma w zasadzie zastosowanie do każdej tkanki, z której można pozyskać nadającą się do analizy zawiesinę z pojedynczą komórką lub pojedynczym jądrem komórkowym. Dane stanowiące własność wielu laboratoriów wykazują pomyślnie zastosowanie tej techniki w odniesieniu do wielu różnych tkanek i istnieje wiele publikacji przedstawiających możliwość stosowania tej techniki w stosunku do organów lub tkanek innych niż wątroba i żołądek, np. jelito czcze (22), nerki (23) (24), skóra (25) (26) lub pęcherz moczowy (27) (28), komórki płuc i z płukania oskrzelowo-płucnego (istotne w przypadku badań nad wdychanymi substancjami chemicznymi) (29) (30), a także przeprowadzone zostały badania na wielu różnych organach (31) (32).

Chociaż może istnieć zainteresowanie efektami genotoksycznymi w komórkach germinalnych, należy zwrócić uwagę, że standardowy test kometowy w środowisku zasadowym, taki jak opisano w niniejszej metodzie badawczej, nie jest uznawany za odpowiedni do pomiaru pęknięć łańcucha DNA w dojrzałych komórkach germinalnych. Ponieważ w literaturze dotyczącej stosowania testu kometowego pod kątem genotoksyczności w odniesieniu do komórek germinalnych (33) zgłoszono wysokie i zmienne poziomy tła uszkodzeń DNA, wydaje się, że konieczne jest wprowadzenie modyfikacji do protokołu wraz z ulepszoną standaryzacją i badaniami walidacyjnymi, zanim można będzie włączyć test kometowy na dojrzałych komórkach germinalnych (np. spermie) do metody badawczej. Ponadto zalecany schemat narażenia opisany w niniejszej metodzie badawczej nie jest optymalny i konieczne byłyby dłuższe okresy narażenia lub pobierania próbek dla celów uzyskania wymiernej analizy pęknięć łańcucha DNA w dojrzałej spermie. Efekty genotoksyczne zmierzone za pomocą testu kometowego w komórkach jąder na różnych etapach różnicowania zostały opisane w pozycjach (34) (35) bibliografii. Należy jednak zwrócić uwagę że gonady zawierają mieszaninę komórek somatycznych i germinalnych. Z tego względu wyniki dodatnie w całej gonadzie (jądrze) niekoniecznie odzwierciedlają uszkodzenia komórek germinalnych; wskazują one jednak, że badana substancja chemiczna lub badane substancje chemiczne bądź produkty ich metabolizmu dotarły do gonady.

Nie można w sposób wiarygodny wykryć usieciowania w standardowych warunkach doświadczalnych testu kometowego. W pewnych zmodyfikowanych warunkach doświadczalnych można wykryć wzajemne powiązania DNA-DNA i DNA-białka, a także można wykryć inne modyfikacje zasadowe, takie jak utlenione zasady (23) (36) (37) (38) (39). Potrzebne byłyby jednak dalsze prace w celu wystarczającego scharakteryzowania niezbędnych zmian w protokole. Zatem wykrycie związków sieciujących nie stanowi podstawowego celu opisanego tu testu. Test ten nie jest właściwy, nawet po wprowadzeniu zmian, do wykrywania aneugenów.

Ze względu na bieżący stan wiedzy występuje szereg dodatkowych ograniczeń (zob. dodatek 3) związanych z testem kometowym *in vivo*. Należy oczekiwać, że niniejsza metoda badawcza zostanie w przyszłości zweryfikowana i w razie potrzeby zmieniona w świetle zdobytych doświadczeń.

Przed zastosowaniem niniejszej metody badawczej z użyciem mieszaniny w celu zgromadzenia danych na potrzeby założonego celu regulacyjnego należy zastanowić się nad tym, czy zastosowanie niniejszej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak – dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny.

ZASADA METODY

Zwierzęta poddaje się działaniu badanej substancji chemicznej z zastosowaniem odpowiedniej drogi narażenia. Szczegółowy opis dawkowania i pobierania próbek jest podany w pkt 36–40. W wybranych okresach pobierania próbek wycina się tkanki będące przedmiotem zainteresowania i przygotowuje się zawiesiny z pojedynczych komórek/jąder (jeżeli zostanie to uznane za przydatne, można wykonać perfuzję *in situ*, np. wątroby) i zatapia w miękkim agarze w celu unieruchomienia ich na szkiełkach mikroskopowych. Komórki/jądra poddaje się działaniu buforu do przeprowadzania lizy w celu usunięcia błony komórkowej lub błony jądra i wystawia na działanie silnej zasady, np. $\text{pH} \geq 13$, aby spowodować rozwinięcie się łańcucha DNA i uwolnienie rozwiniętych pętli i fragmentów DNA. DNA jądrowy zatopiony w agarze jest następnie poddawany elektroforezie. Normalne molekuly DNA, które nie uległy fragmentacji, pozostają w miejscu, w którym DNA jądrowy został zatopiony w agarze, natomiast pęknięte fragmenty DNA i uwolnione pętle DNA będą migrowały w kierunku anody. Po zakończeniu elektroforezy uwidacznia się DNA z zastosowaniem odpowiedniego barwnika fluorescencyjnego. Preparaty należy analizować za pomocą mikroskopu i w pełni lub częściowo zautomatyzowanych systemów analizy obrazu. Stopień migracji DNA w trakcie elektroforezy i zasięg migracji odzwierciedlają ilość i wielkość fragmentów DNA. Test kometowy ma szereg punktów końcowych. Zaleca się ocenę uszkodzeń DNA na podstawie zawartości DNA w ogonie (procentowa zawartość DNA w ogonie lub procentowa intensywność ogona) (12) (40) (41) (42). Po przeanalizowaniu wystarczającej liczby jąder uzyskane dane analizuje się przy użyciu odpowiednich metod w celu oceny wyników testu.

Należy zwrócić uwagę, że zbadano wpływ zmiany różnych aspektów metodologii, w tym sposobu przygotowania próbki, warunków przebiegu elektroforezy, parametrów analizy wizualnej (np. intensywności zabarwienia, światłość żarówki mikroskopu oraz stosowania filtrów mikroskopowych i dynamiki aparatu fotograficznego) oraz warunków otoczenia (np. podświetlenie), i stwierdzono, że mogą one zakłócać migrację DNA (43) (44) (45) (46).

WERYFIKACJA BIEGŁOŚCI LABORATORIUM

Każde laboratorium powinno ustalić swoje kompetencje laboratoryjne w odniesieniu do testu kometowego, wykazując zdolność do uzyskania zawiesin pojedynczych komórek lub jąder o wystarczającej jakości z każdej tkanki docelowej każdego wykorzystywanego do badań gatunku. Jakość preparatów będzie oceniana w pierwszej kolejności na podstawie procentowej zawartości DNA w ogonie w odniesieniu do zwierząt poddanych działaniu nośnika w odtwarzalnym niskim zakresie. Z obecnie dostępnych danych wynika, że najlepiej byłoby, gdyby średnia grupowa procentowej zawartości DNA w ogonie (na podstawie średniej median – szczegóły tych warunków można znaleźć w pkt 57) w wątrobie szczura nie przekraczała 6 %, co byłoby spójne z wartościami uzyskanymi w próbie walidacyjnej JaCVAM (12) i innymi opublikowanymi i stanowiącymi własność laboratoriów danymi. Obecnie nie istnieją wystarczające dane, aby sformułować zalecenia dotyczące optymalnych lub dopuszczalnych zakresów dla innych tkanek. Nie wyklucza to stosowania innych tkanek w uzasadnionych przypadkach. Sprawozdanie z badania powinno zawierać odpowiedni przegląd efektywności testu kometowego prowadzonego na tych tkankach w porównaniu z opublikowaną literaturą lub danymi stanowiącymi własność laboratoriów. Po pierwsze, pożądany jest niski zakres procentowej zawartości DNA w ogonie w próbach kontrolnych, aby zapewniony został dostateczny zakres oznaczania umożliwiający wykrycie efektu dodatniego. Po drugie, każde laboratorium powinno być w stanie odtworzyć przewidywane reakcje w przypadku mutagenów bezpośrednich i mutagenów pośrednich, wykorzystując różne tryby postępowania zgodnie z propozycjami zawartymi w tabeli 1 (pkt 29).

W stosownych przypadkach można wybrać substancje dające wynik dodatni, na przykład z próby walidacyjnej JaCVAM (12) lub innych opublikowanych danych (zob. pkt 9), wraz z podaniem uzasadnienia, w celu wykazania wyraźnych reakcji dodatnich w badanych tkankach. Należy również wykazać zdolność do wykrywania słabych efektów znanych mutagenów, np. metanosulfonian etylu w niskich dawkach, na przykład ustalając zależność dawka-odpowiedź za pomocą odpowiedniej liczby dawek podawanych w odpowiednich odstępach czasu. W pierwszej kolejności należy skoncentrować się na ustaleniu biegłości w odniesieniu do najczęściej wykorzystywanych tkanek, np. wątroby gryzoni, w przypadku których można dokonać porównań z istniejącymi danymi i oczekiwanymi wynikami (12). Jednocześnie można gromadzić dane pozyskiwane z innych tkanek, np. żołądka/dwunastnicy/jelita czczego, krwi itd. Laboratorium musi wykazać biegłość w odniesieniu do wszystkich poszczególnych tkanek każdego gatunku, które zamierza badać, i będzie musiało wykazać, że można uzyskać z danej tkanki dopuszczalną reakcję dodatnią ze znanym mutagenem (np. metanosulfonianem etylu).

Należy gromadzić dane dotyczące kontroli z nośnikiem / kontroli ujemnej, aby wykazać odtwarzalność danych dotyczących reakcji ujemnych i aby zagwarantować, że techniczne aspekty testu były prawidłowo kontrolowane, lub aby zasugerować konieczność ponownego ustalenia zakresów danych historycznych dotyczących kontroli (zob. pkt 22).

Należy zwrócić uwagę, że chociaż wiele tkanek można pobrać w trakcie sekcji zwłok i przygotować do testu kometowego, laboratorium musi wykazywać biegłość w pobieraniu wielu tkanek od jednego zwierzęcia, zapewniając tym samym, że nie zostaną utracone żadne potencjalne zmiany patologiczne DNA i test kometowy nie zostanie zakłócony. Czas, jaki upływa od uśmiercenia zwierzęcia do pobrania tkanek do testu, może mieć decydujące znaczenie (zob. pkt 44).

W toku rozwijania biegłości w wykonywaniu tego testu należy mieć na uwadze dobrostan zwierząt, w związku z tym można wykorzystywać tkanki zwierząt użytych do innych badań w trakcie rozwijania kompetencji w zakresie różnych aspektów testu. Ponadto przeprowadzenie pełnego badania w trakcie etapów wprowadzania nowej metody badawczej w laboratorium może okazać się niepotrzebne i w związku z tym, rozwijając niezbędne umiejętności, można użyć mniejszej liczby zwierząt lub badanych stężeń.

Dane historyczne dotyczące kontroli

W toku badania biegłości laboratorium powinno stworzyć bazę danych historycznych w celu ustalenia zakresów i rozkładów wyników kontroli dodatniej i ujemnej dla odpowiednich tkanek i gatunków. Zalecenia dotyczące sposobu gromadzenia i wykorzystywania danych historycznych (tj. kryteria włączania danych do zbioru danych historycznych i wykluczania danych z tego zbioru oraz kryteria dopuszczalności dla danego doświadczenia) można znaleźć w literaturze (47). Różne tkanki i różne gatunki, a także różne nośniki i drogi podawania, mogą prowadzić do różnych wartości procentowej zawartości DNA w ogonie w kontroli ujemnej. W związku z tym istotne jest, aby ustalić zakresy wyników kontroli ujemnej dla każdej tkanki i każdego gatunku. Laboratoria powinny stosować metody kontroli jakości, takie jak karty kontrolne (np. karty C lub karty X-średnie (48)) w celu określania stopnia zmienności gromadzonych przez nie danych oraz w celu wykazania, że stosowana przez nie metodologia jest „pod kontrolą”. Konieczna może być również optymalizacja wyboru odpowiednich substancji służących do kontroli dodatniej, zakresów dawek i warunków doświadczalnych (np. warunków elektroforezy) na potrzeby wykrywania słabych efektów (zob. pkt 17).

Wszelkie zmiany w protokole doświadczalnym należy rozpatrywać pod kątem ich spójności z dotychczas prowadzonymi przez laboratorium bazami danych historycznych dotyczących kontroli. Wszelkie poważne niespójności powinny skutkować utworzeniem nowej bazy danych historycznych dotyczących kontroli.

OPIS METODY

Przygotowania

Wybór gatunku zwierząt

Zazwyczaj wykorzystuje się popularne laboratoryjne szczepy zdrowych, młodych, dorosłych gryzoni (w wieku 6–10 tygodni na początku podawania substancji toksycznej, chociaż dopuszcza się również używanie nieco starszych zwierząt). Wybór gatunku gryzoni powinien odbywać się na podstawie (i) gatunku użytego w innych badaniach toksyczności (aby można było skorelować dane i umożliwić badania łączone), (ii) gatunku, u którego rozwinęły się guzy w badaniu działania rakotwórczego (w przypadku badania mechanizmu rakotwórczego) lub (iii) gatunków, których metabolizm ma największe znaczenie dla ludzi, jeżeli jest znany. Zazwyczaj w tym badaniu wykorzystywane są szczury. Można jednak użyć innego gatunku, jeżeli jest to uzasadnione z etycznego i naukowego punktu widzenia.

Warunki utrzymywania i karmienia

W przypadku gryzoni temperatura w pomieszczeniu ze zwierzętami doświadczalnymi powinna wynosić 22 °C (\pm 3 °C). Najlepiej byłoby, gdyby wilgotność względna wynosiła 50–60 %, przy czym powinna wynosić co najmniej 30 % i najlepiej byłoby, gdyby nie przekraczała 70 % poza okresami czyszczenia pomieszczenia. Oświetlenie powinno być sztuczne z zachowaniem cyklu 12 godzin światła i 12 godzin ciemności. Do karmienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne oraz należy zapewnić zwierzętom nieograniczony dostęp do wody do picia. Wybór paszy może zależeć od potrzeby zapewnienia odpowiedniej domieszki badanej substancji chemicznej, jeżeli jest ona podawana tą drogą. Gryzoni należy trzymać w małych grupach (nie więcej niż pięć sztuk) składających się ze zwierząt tej samej płci, jeżeli nie przewiduje się, że mogłyby dojść do agresywnego zachowania. Zwierzęta można utrzymywać pojedynczo tylko wtedy, gdy ma to uzasadnienie naukowe. Jeśli to tylko możliwe, należy stosować pełne podłogi, ponieważ podłogi z siatki mogą powodować poważne obrażenia (49). Należy zapewnić urozmaicenie warunków bytowania.

Przygotowanie zwierząt

Należy losowo przydzielić zwierzęta do grup kontrolnych i grup poddawanych działaniu badanej substancji. Zwierzęta zostają indywidualnie oznakowane i aklimatyzowane do warunków laboratoryjnych przez co najmniej 5 dni, zanim zostaną poddane działaniu badanej substancji. W celu indywidualnego oznakowania zwierząt należy stosować najmniej inwazyjną metodę. Właściwe metody obejmują obrączkowanie, kolczykowanie, wszczepianie mikroukładów i identyfikację biometryczną. Znakowanie przez przycinanie palców u nóg i uszu nie jest naukowo uzasadnione w przypadku tych badań. Klatki należy rozmieścić w taki sposób, aby zminimalizować potencjalny wpływ ich układu. W momencie rozpoczęcia badania różnice w masie ciała zwierząt powinny być minimalne i nie powinny przekraczać $\pm 20\%$.

Przygotowanie dawek

Badane substancje chemiczne w stanie stałym należy rozpuszczać lub przygotowywać w postaci zawiesiny w odpowiednich nośnikach lub dodawać do paszy lub wody do picia przed podaniem dawki zwierzętom. Badane substancje chemiczne w stanie ciekłym mogą być dawkowane bezpośrednio lub można je rozcieńczać przed dawkowaniem. W przypadku narażenia inhalacyjnego badane substancje chemiczne można podawać w postaci gazu, pary lub stałych/ciekłych aerozoli, w zależności od ich właściwości fizykochemicznych (50) (51).

Należy stosować świeże preparaty badanej substancji chemicznej, chyba że z danych dotyczących stabilności wynika, iż przechowywanie tych preparatów jest dopuszczalne, i chyba że w danych tych określono warunki prawidłowego przechowywania takich preparatów.

Warunki badania

Nośnik

Nośnik w stosowanych objętościach dawek nie powinien wywoływać efektów toksycznych oraz nie powinno istnieć ryzyko, że wejdzie on w reakcję chemiczną z badanymi substancjami chemicznymi. Jeśli wykorzystywane są inne niż dobrze znane nośniki, ich włączenie do doświadczenia powinno być poparte danymi wskazującymi ich zgodność pod względem zwierząt doświadczalnych, drogi podawania i punktu końcowego. Zaleca się, aby w miarę możliwości w pierwszej kolejności rozważyć zastosowanie wodnego rozpuszczalnika/nośnika. Należy zwrócić uwagę, że niektóre nośniki (zwłaszcza nośniki o lepkiej konsystencji) mogą powodować stan zapalny i podwyższone poziomy pęknięć łańcucha DNA w miejscu kontaktu, w szczególności w przypadku wielokrotnego podawania.

Kontrolne

Kontrolne dodatnie

Na tym etapie do każdego badania należy zazwyczaj dołączyć grupę co najmniej 3 nadających się do poddania analizie zwierząt jednej płci lub każdej płci, jeżeli wykorzystuje się zwierzęta obu płci (zob. pkt 32), której to grupie podaje się substancję służącą do kontroli dodatniej. W przyszłości może to dać możliwość wykazania odpowiedniej biegłości w celu zmniejszenia zapotrzebowania na próby kontrolne dodatnie. W przypadku wielokrotnego pobierania próbek (np. w przypadku protokołu z jednorazowym podaniem) konieczne jest jedynie włącznie kontroli dodatniej przy jednym z pobrań próbek, należy jednak zapewnić zrównoważony plan doświadczenia (zob. pkt 48). Nie ma konieczności podawania substancji służących do jednoczesnej kontroli dodatniej tą samą drogą, którą podano badaną substancję chemiczną, chociaż istotne jest, aby zastosować tę samą drogę podawania w przypadku pomiaru efektów w miejscu kontaktu. Należy wykazać, że substancje służące do kontroli dodatniej indukują pęknięcia łańcuchów DNA we wszystkich tkankach będących przedmiotem zainteresowania w przypadku badanej substancji chemicznej, w związku z czym prawdopodobnie najlepszy wybór stanowi metanosulfonian etylu, ponieważ powodował pęknięcia łańcucha DAN we wszystkich badanych tkankach. Dawki substancji służących do kontroli dodatniej należy dobrać w taki sposób, aby wywoływały umiarkowane efekty, które pozwalają na krytyczną ocenę efektywności i czułości badania, i aby można było je oprzeć na krzywej dawka-efekt ustalonej przez laboratorium w toku wykazywania biegłości. Procentowa zawartość DNA w ogonie u zwierząt służących do jednoczesnej kontroli dodatniej powinna być spójna z ustalonym wcześniej przez laboratorium zakresem w odniesieniu do poszczególnych tkanek i okresu pobierania próbek od tego gatunku (zob. pkt 16). Przykładowe substancje służące do kontroli dodatniej i niektóre z tkanek docelowych (u gryzoni) dla tych substancji są przedstawione w tabeli 1. Substancje inne niż wymienione w tabeli 1 można wybrać, jeżeli jest to uzasadnione naukowo.

Tabela 1

Przykładowe substancje służące do kontroli dodatniej i niektóre z tkanek docelowych dla tych substancji

Substancje i nry CAS
Metanosulfonian etylu (nr CAS 62-50-0) dla każdej tkanki
Etylnitrozomocznik (nr CAS 759-73-9) dla wątroby i żołądka, dwunastnicy lub jelita czczego
Metanosulfonian metylu (nr CAS 66-27-3) dla wątroby, żołądka, dwunastnicy lub jelita czczego, komórek płuc i z płukania oskrzelowo-płucnego, nerek, pęcherza moczowego, płuc, jąder i szpiku kostnego/krwi
N-metylo-N'-nitro-N-nitrozoguanidyna (nr CAS:70-25-7) w odniesieniu do żołądka, dwunastnicy lub jelita czczego
1,2-dimetylohydrazyna 2HCl (CAS RN 306-37-6) dla wątroby i jelita
N-metylo-N-nitrozomocznik (nr CAS 684-93-5) dla wątroby, szpiku kostnego, krwi, nerek, żołądka, jelita czczego i mózgu.

Kontrole ujemne

Do każdego badania w odniesieniu do każdego okresu pobierania próbek i każdej tkanki należy włączyć grupę zwierząt służących do kontroli ujemnej, którym podawany jest sam nośnik, a poza tym traktowanych w taki sam sposób jak grupy poddawane działaniu substancji. Procentowa zawartość DNA w ogonie u zwierząt służących do kontroli ujemnej powinna mieścić się w granicach ustalonego wcześniej przez laboratorium zakresu w odniesieniu do poszczególnych tkanek i okresu pobierania próbek od tego gatunku (zob. pkt 16). W przypadku braku historycznych lub opublikowanych danych dotyczących kontroli wskazujących, że wybrany nośnik nie powoduje żadnego szkodliwego ani genotoksycznego efektu w odniesieniu do liczby aplikacji substancji lub drogi podawania, należy wykonać badania wstępne przed przystąpieniem do pełnego badania w celu ustalenia dopuszczalności stosowania kontroli z nośnikiem.

PROCEDURA**Liczba i płeć zwierząt**

Chociaż istnieje mało danych na temat samic, na podstawie których można dokonać porównania między płciami w odniesieniu do testu kometowego, na ogół reakcje genotoksyczne *in vivo* są podobne u samców i u samic, w związku z czym większość badań można prowadzić na zwierzętach dowolnej płci. Dane wskazujące na występowanie istotnych różnic między samcami i samicami (np. różnice w toksyczności ogólnoustrojowej, metabolizmie, biodostępności itd., w tym np. w badaniu ustalającym zakres dawkowania) stanowią przesłankę przemawiającą za przeprowadzaniem badań na zwierzętach obu płci. W takim przypadku właściwe może być przeprowadzenie badania na zwierzętach obu płci, np. w ramach badania toksyczności dawki powtórzonej. Zastosowanie planu czynnikowego może być właściwe, jeżeli do badania używa się zwierząt obu płci. Szczegółowe informacje dotyczące sposobu analizy danych z wykorzystaniem tego planu można znaleźć w dodatku 2.

Na początku badania (i w toku ustalania biegłości) należy ustalić liczebność grup w celu zapewnienia w każdej grupie co najmniej 5 nadających się do poddania analizie zwierząt jednej płci lub każdej płci, jeżeli wykorzystuje się zwierzęta obu płci (mniej w grupie jednoczesnej kontroli dodatniej – zob. pkt 29). Jeżeli narażenie człowieka na działanie substancji chemicznych może mieć charakter uzależniony od płci, jak to na przykład ma miejsce w przypadku niektórych produktów leczniczych, badanie należy przeprowadzić na zwierzętach odpowiedniej płci. Wskazówka odnośnie do maksymalnych typowych wymagań w zakresie liczby zwierząt – w przypadku prowadzonego zgodnie z parametrami ustalonymi w pkt 33 z trzema grupami otrzymującymi dawki i jednoczesną kontrolą ujemną i dodatnią (każda grupa złożona z pięciu zwierząt jednej płci) wymagane byłoby użycie 25–35 zwierząt.

HARMONOGRAM PODAWANIA SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

Zwierzętom należy codziennie podawać badaną substancję chemiczną przez co najmniej 2 dni (tj. dwa lub więcej podań w odstępach około 24 godzin) i należy pobrać próbki raz po 2–6 godzinach (lub po T_{maks}) od ostatniego podania substancji (12). Dopuszczalne są próbki uzyskane w wyniku przedłożonych schematów dawkowania (np. dawka podawana codziennie przez 28 dni). Wykazano dobre wyniki połączenia testu kometowego z testem mikrojądrowym na erytrocytach (10) (19). Należy jednak starannie rozważyć kwestie logistyczne związane z pobieraniem próbek tkanki do celów testu kometowego i jednoczesnym spełnieniem wymagań w zakresie pobierania próbek tkanki do celów innych rodzajów ocen toksykologicznych. Pobranie próbek po upływie 24 godzin od podania ostatniej dawki, co jest typowe dla ogólnego badania toksyczności, nie jest właściwe w większości przypadków (zob. pkt 40 dotyczący okresu pobierania próbek). Zastosowanie innych schematów podawania substancji i pobierania próbek należy uzasadnić (zob. dodatek 3). Można na przykład zastosować pojedyncze dawki substancji i wielokrotne pobranie próbek, należy jednak zauważyć, że do badania polegającego na jednorazowym podaniu substancji wymagana będzie większa liczba zwierząt ze względu na potrzebę wielokrotnego pobierania próbek, chociaż czasami rozwiązanie to może być preferowane, np. jeżeli badana substancja chemiczna powoduje podwyższoną toksyczność w wyniku powtarzanego podawania.

Niezależnie od tego, jaki jest sposób wykonywania badania, jest on dopuszczalny, o ile badana substancja chemiczna pozwala uzyskać reakcję dodatnią lub, w przypadku badania ujemnego, o ile dostarczył on bezpośredniego lub pośredniego dowodu potwierdzającego narażenie tkanki docelowej lub toksyczność dla tkanki docelowej bądź została osiągnięta dawka graniczna (zob. pkt 36).

Badane substancje chemiczne mogą być również podawane jako dawka dzielona, tj. dwa podania tego samego dnia w odstępie czasu nie większym niż 2–3 godziny, aby łatwiej było podawać substancję w dużej objętości. W takich okolicznościach okres pobierania próbek powinien zostać zaplanowany w oparciu o czas podania ostatniej dawki (zob. pkt 40).

Poziomy dawek

W przypadku przeprowadzenia wstępnego badania ustalającego zakres dawkowania ze względu na brak dostępnych odpowiednich danych z innych odpowiednich badań umożliwiających dobranie dawki, badanie takie należy wykonać w tym samym laboratorium z wykorzystaniem tego samego gatunku, szczepu, płci i schematu podawania substancji chemicznej, jakie mają być stosowane w głównym badaniu zgodnie z obecnie stosowanymi podejściami do wykonywania badań ustalających zakres dawkowania. Celem badania powinno być określenie maksymalnej tolerowanej dawki (MTD) zdefiniowanej jako dawka powodująca niewielkie efekty toksyczne w stosunku do czasu trwania badania (na przykład wyraźne kliniczne objawy, takie jak nietypowe zachowanie lub reakcje, niewielki spadek masy ciała lub cytotoksyczność tkanek docelowych), ale niepowodująca śmierci lub objawów bólu, cierpienia albo stresu, które wiązałyby się z koniecznością uśmiercenia zwierzęcia. W przypadku badanej substancji chemicznej niemającej właściwości toksycznych z okresem podawania wynoszącym co najmniej 14 dni, maksymalna (graniczna) dawka wynosi 1 000 mg/kg masy ciała na dobę. W przypadku okresów podawania poniżej 14 dni maksymalna (graniczna) dawka wynosi 2 000 mg/kg masy ciała na dobę. Wspomniane wartości graniczne mogą różnić się w przypadku niektórych rodzajów badanych substancji chemicznych (np. produktów leczniczych przeznaczonych dla ludzi), które są objęte przepisami szczególnymi.

Substancje chemiczne wykazujące intensywne parametry toksykokinetyczne lub wywołujące procesy detoksykacji, które mogą prowadzić do zmniejszenia narażenia po długim okresie podawania substancji chemicznej, mogą stanowić wyjątki w odniesieniu do kryteriów ustalania dawki i powinny być oceniane na zasadzie jednostkowych przypadków.

W przypadku testu kometowego zarówno ostrej, jak i podostrej toksyczności poza maksymalną dawką (MTD, maksymalną osiągalną dawką, maksymalnym narażeniem lub dawką graniczną) dla każdego okresu pobierania próbek należy dobrać malejącą sekwencję co najmniej dwóch dodatkowych poziomów dawek, między którymi jest odpowiedni odstęp (najlepiej różniących się o mniej niż 10) w celu wykazania zależności dawka-odpowiedź. Najlepiej byłoby, gdyby zastosowane poziomy dawek obejmowały również zakres od dawki maksymalnej do dawki wywołującej toksyczność w niewielkim stopniu lub dawki niewywołującej toksyczności. W przypadku zaobserwowania toksyczności w tkance docelowej przy wszystkich badanych poziomach dawek zaleca się dalsze badania z wykorzystaniem dawek nietoksycznych (zob. pkt 54–55). W przypadku badań przeprowadzanych w celu bardziej szczegółowego zbadania przebiegu krzywej dawka-efekt konieczne może okazać się utworzenie dodatkowych grup otrzymujących dawki.

Podawanie dawek

Planując badanie, należy wziąć pod uwagę przewidywaną drogę narażenia ludzi. W związku z tym można wybrać jako uzasadnione takie drogi podawania jak: z paszą, z wodą do picia, miejscowe, podskórne, dożylnie, ustne (przez sondę), przez wdychanie, dotchawicze lub przez implantację. W każdym razie drogę narażenia należy dobrać w taki sposób, aby zapewnić odpowiednie narażenie tkanek docelowych. Nie zaleca się na ogół dokonywania wstrzyknięć dootrzewnowych, ponieważ nie jest to typowa istotna droga narażenia ludzi, i należy je stosować wyłącznie ze szczegółowym uzasadnieniem (np. niektóre substancje służące do kontroli dodatniej, do celów badawczych lub w przypadku niektórych produktów leczniczych podawanych dootrzewnowo). Maksymalna objętość płynu, jaką można podać przez sondę lub wstrzyknąć jednorazowo, zależy od wielkości zwierzęcia doświadczalnego. Objętość ta nie powinna przekraczać 1 ml/100 g masy ciała, oprócz roztworów wodnych, w przypadku których można zastosować 2 ml/100 g masy ciała. Wykorzystanie objętości wyższych niż podane (jeżeli są dopuszczone przepisami dotyczącymi dobrostanu zwierząt) musi być uzasadnione. W miarę możliwości różne poziomu dawek należy uzyskać, dostosowując stężenie dawkowanej postaci użytkowej substancji w celu zapewnienia stałej objętości w stosunku do masy ciała przy wszystkich poziomach dawek.

Okres pobierania próbek

Okres pobierania próbek jest kluczową zmienną, ponieważ jest uwarunkowany czasem potrzebnym do osiągnięcia maksymalnego stężenia przez badane substancje chemiczne w tkance docelowej i doprowadzenia do pęknięcia łańcuchów DNA, ale zanim te pęknięte fragmenty zostaną usunięte, naprawione lub doprowadzą do śmierci komórki. Trwałość niektórych zmian patologicznych prowadzących do pęknięć łańcuchów DNA wykrytych w teście kometowym może być bardzo krótka, przynajmniej w przypadku niektórych substancji chemicznych badanych *in vitro* (52) (53). Jeżeli zatem zachodzi podejrzenie wystąpienia takich przejściowych zmian DNA, należy zastosować środki mające na celu ograniczenie strat uszkodzonego DNA poprzez zapewnienie dostatecznie wczesnego pobrania próbek tkanek, nawet wcześniejszego niż podane poniżej standardowe wartości czasu. Optymalny okres pobierania próbek może być zależny od substancji chemicznej lub drogi jej podawania skutkującej na przykład szybkim narażeniem tkanek w wyniku podawania dożylnego lub narażenia inhalacyjnego. Dlatego też należy, w miarę możliwości, określić okres pobierania próbek na podstawie danych kinetycznych (np. czasu (T_{maks}), w którym zostaje osiągnięte szczytowe stężenie (C_{maks}) w osoczu lub tkance lub stan równowagi w przypadku wielokrotnego podania). W przypadku braku danych kinetycznych kompromisowe rozwiązanie kwestii pomiaru genotoksyczności polega na pobraniu próbek po upływie 2–6 godzin od ostatniego podania substancji w przypadku dwóch lub większej liczby podań albo po upływie zarówno 2–6, jak i 16–26 godzin po jednokrotnym podaniu, należy jednak zadbać, aby sekcja wszystkich zwierząt nastąpiła w tym samym czasie po ostatnim (lub jedynym) podaniu dawki. Informacje na temat wystąpienia efektów toksycznych w organach docelowych (o ile są dostępne) można również wykorzystać do ustalenia odpowiedniego okresu pobierania próbek.

Obserwacje

Ogólne obserwacje kliniczne pod kątem stanu zdrowia zwierząt powinny być przeprowadzane i rejestrowane co najmniej raz dziennie, najlepiej każdego dnia o tej samej porze z uwzględnieniem szczytowego okresu przewidywanych skutków po dawkowaniu (54). Co najmniej dwa razy dziennie wszystkie zwierzęta powinny być obserwowane pod kątem zachorowalności i upadkowości. W przypadku badań trwających przez dłuższy czas wszystkie zwierzęta powinny być ważone co najmniej raz w tygodniu oraz po zakończeniu okresu badania. Przy każdej zmianie pokarmu i co najmniej raz w tygodniu należy zmierzyć spożycie pokarmu. Jeżeli badana substancja chemiczna jest podawana w wodzie do picia, należy mierzyć spożycie wody przy każdej zmianie wody i co najmniej raz w tygodniu. Zwierzęta, u których stwierdzono oznaki podwyższonej toksyczności nieprowadzące do śmierci, należy uśmiercić przed zakończeniem okresu badania i zasadniczo nie wykorzystuje się ich do testu kometowego.

Pobieranie tkanek

Ponieważ możliwe jest zbadanie indukowania pęknięć łańcucha DNA (komet) na praktycznie dowolnej tkance, uzasadnienie wyboru tkanek, które mają zostać pobrane, powinno być jasne i oparte na przyczynie przeprowadzenia badania oraz na wszelkich istniejących danych dotyczących wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i wydalania, genotoksyczności, rakotwórczości lub innych danych dotyczących toksyczności w odniesieniu do badanych substancji chemicznych. Do istotnych czynników, które należy rozważyć, należą: droga podawania (w oparciu o prawdopodobną drogę lub prawdopodobne drogi narażenia ludzi), przewidywana dystrybucja i wchłanianie w tkankach, rola metabolizmu oraz możliwy mechanizm działania badanych substancji chemicznych. Najczęściej badaną tkanką, w odniesieniu do której istnieje najwięcej danych, jest tkanka wątroby. W związku z tym w przypadku braku informacji ogólnych oraz jeżeli nie określono konkretnych tkanek będących przedmiotem

zainteresowania, pobranie próbek wątroby będzie uzasadnione, ponieważ jest to podstawowy organ, w którym zachodzi metabolizm ksenobiotyczny i który jest często bardzo narażony zarówno na działanie substancji macierzystych, jak i metabolitów. W niektórych przypadkach najodpowiedniejsze może być badanie miejsca bezpośredniego kontaktu (na przykład części gruczołowej żołądka lub dwunastnicy/jelita czczego w przypadku doustnie podawanych substancji chemicznych lub płuc w przypadku substancji chemicznych podawanych drogą inhalacji). Dodatkowe lub alternatywne tkanki należy wybierać w oparciu o określone powody wykonywania badania, ale może okazać się przydatne zbadanie wielu tkanek u tych samych zwierząt, pod warunkiem że laboratorium wykazało biegłość w badaniu tych tkanek i kompetencje w jednoczesnym badaniu wielu tkanek.

Przygotowanie próbek

W odniesieniu do procesów opisanych w poniższych punktach (44–49) ważne jest, aby wszystkie roztwory lub stabilne zawiesiny były stosowane przed upływem terminu ich ważności lub w razie potrzeby świeżo przygotowywane. Również w kolejnych punktach poruszona została kwestia czasu poświęconego na (i) pobranie każdej tkanki po wykonaniu sekcji, (ii) przetworzenie każdej tkanki na zawiesinę komórek/jąder oraz (iii) przetworzenie zawiesiny i przygotowanie szkiełek mikroskopowych z preparatami, przy czym są to wszystkie kluczowe zmienne (zob. definicje, dodatek 1) i w związku z tym na etapie ustalania metody i wykazywania biegłości należy określić dopuszczalny czas, który należy przeznaczyć na wykonanie każdej z tych czynności.

Po upływie odpowiedniego czasu od ostatniego podania badanej substancji chemicznej zwierzęta zostają uśmiercone zgodnie z obowiązującymi przepisami dotyczącymi dobrostanu zwierząt i zasadą 3R. Usuwa się i rozkłada enzymatycznie wybrane tkanki, których pewna część zostaje pobrana do testu kometowego, a jednocześnie należy pobrać wycinek tej samej tkanki i umieścić w roztworze formaldehydu lub odpowiednim roztworze utrwalającym w celu ewentualnego wykonania analizy histopatologicznej (zob. pkt 55) zgodnie ze standardowymi metodami (12). Tkanekę przeznaczoną do wykonania testu kometowego umieszcza się w roztworze buforowym do rozdrabniania w celu usunięcia pozostałości krwi i przechowuje w silnie schłodzonym roztworze buforowym do rozdrabniania do czasu jej przetworzenia. Można również wykonać perfuzję *in situ*, np. w przypadku wątroby lub nerek.

Istnieje wiele opublikowanych metod izolowania komórek/jąder. Do tych metod należy rozdrabnianie tkanek, takich jak wątroba i nerki, zeszkrobywanie powierzchni śluzówki w przypadku przewodu pokarmowego, homogenizacja i rozkład enzymatyczny. W ramach próby walidacyjnej JaCVAM badano jedynie wyizolowane komórki i w związku z tym pod względem ustalania metody i możliwości odniesienia się do danych z próby JaCVAM w celu wykazania biegłości preferowane są wyizolowane komórki. Wykazano jednak, że nie ma zasadniczej różnicy między wynikami testu bez względu na to, czy używa się komórek czy jąder (8). Również inne metody izolowania komórek/ jąder (np. homogenizacja, rozdrabnianie, rozkład enzymatyczny i filtracja na filtrze siatkowym) dają porównywalne wyniki (55). W świetle powyższego można stosować wyizolowane komórki albo wyizolowane jądra. Laboratorium powinno dokładnie ocenić i poddać walidacji metody izolowania pojedynczych komórek/jąder stosownie do określonej tkanki. Jak omówiono w pkt 40, trwałość niektórych zmian patologicznych prowadzących do pęknięć łańcuchów DNA wykrytych w teście kometowym może być bardzo krótka (52) (53). W związku z tym, bez względu na zastosowaną metodę przygotowania zawiesiny pojedynczej komórki/jądra, istotne jest, aby tkanki zostały przetworzone bezzwłocznie po uśmierceniu zwierząt i umieszczone w warunkach, w których zanikanie zmian patologicznych jest ograniczone (np. dzięki przechowywaniu tkanek w niskiej temperaturze). Zawiesiny komórek należy przechowywać w stanie silnie schłodzonym do momentu ich użycia, aby zapewnić jak najmniejsze zmiany temperatur wewnątrz próbki i możliwość wykazania odpowiednich reakcji w kontroli dodatniej i ujemnej.

PRZYGOTOWANIE PREPARATÓW

Preparaty należy przygotować jak najszybciej (najlepiej w ciągu godziny) po przygotowaniu pojedynczej komórki/jądra, przy czym należy ściśle kontrolować i poddać walidacji w warunkach laboratoryjnych temperaturę i czas między uśmierceniem zwierzęcia a przygotowaniem preparatów. Objętość zawiesiny komórek dodana do agarozы o niskiej temperaturze topnienia (zazwyczaj 0,5–1,0 %) w celu sporządzenia preparatów nie powinna obniżyć procentowej objętości agarozы o niskiej temperaturze topnienia do mniej niż 0,45 %. Optymalne zagęszczenie komórek zostanie oznaczone za pomocą systemu analizy obrazu wykorzystywanego do zliczania komet.

Liza

Warunki lizy są również kluczową zmienną i mogą prowadzić do zakłócenia procesu pęknięcia łańcuchów DNA na skutek określonych rodzajów modyfikacji DNA (niektóre alkilacje i zasadowe addukty DNA). W związku z tym zaleca się utrzymanie warunków lizy na maksymalnie stałym poziomie w odniesieniu do wszystkich preparatów w ramach doświadczenia. Po przygotowaniu preparatów należy je zanurzyć w schłodzonym roztworze lizującym na co najmniej godzinę (lub na całą noc) w temperaturze 2–8 °C w stonowanym oświetleniu, np. w żółtym świetle (lub zasłonięte przed dostępem światła), które pozwala uniknąć narażenia na dostęp światła białego, które może zawierać składowe UV. Po tym okresie inkubacji, przed przystąpieniem do etapu rozwijania łańcucha DNA w środowisku zasadowym, należy opłukać szkiełka mikroskopowe w celu usunięcia pozostałości detergentu i soli. Do płukania można użyć oczyszczonej wody, zubożającego roztworu buforowego lub buforu fosforanowego. Można również zastosować roztwór buforowy używany do elektroforezy. Pozwoli to zachować warunki środowiska zasadowego w komorze do elektroforezy.

Rozwijanie łańcucha DNA i elektroforeza

Należy losowo rozmieścić szkiełka mikroskopowe na platformie aparatu do elektroforezy typu zanurzeniowego zawierającego dostateczną ilość roztworu do elektroforezy, tak aby powierzchnie szkiełek mikroskopowych zostały całkowicie przykryte (głębokość warstwy roztworu na szkiełku powinna być również spójna w kolejnych seriach badań). W innego rodzaju aparatach do elektroforezy stosowanych w teście kometowym, tj. wyposażonych w układy aktywnego chłodzenia, obiegu i zasilanie o dużej mocy, grubsza warstwa roztworu na szkiełkach spowoduje przepływ prądu o wyższym natężeniu przy stałym napięciu. Należy rozmieścić szkiełka mikroskopowe w zbiorniku do elektroforezy w sposób zrównoważony, aby osłabić wpływ różnych tendencji lub efektów styku ze zbiornikiem i ograniczyć do minimum zmienność między partiami, tj. w każdej serii badania metodą elektroforezy powinna występować ta sama liczba szkiełek mikroskopowych z preparatami z każdego zwierzęcia objętego badaniem oraz powinny być uwzględnione próbki z różnych grup dawkowania, a także z kontroli ujemnej i dodatniej. Należy pozostawić szkiełka na co najmniej 20 minut, aby łańcuchy DNA rozwinęły się, a następnie poddać je elektroforezie w kontrolowanych warunkach, co zwiększy czułość i zakres oznaczania testu (tj. doprowadzi do dopuszczalnych poziomów procentowej zawartości DNA w ogonie w kontroli ujemnej i dodatniej, które zwiększają czułość). Poziom migracji DNA jest liniowo powiązany z czasem trwania elektroforezy, a także z potencjałem elektrycznym (V/cm). Na podstawie próby JaCVAM może on wynosić 0,7 V/cm przez co najmniej 20 minut. Czas trwania elektroforezy uważa się za kluczową zmienną i należy ustalić czas elektroforezy w celu optymalizacji zakresu oznaczania. Wydłużenie czasu elektroforezy (np. do 30 lub 40 minut w celu zmaksymalizowania czułości) prowadzi zazwyczaj do silniejszych reakcji dodatnich ze znanymi mutagenami. Wydłużenie czasu elektroforezy może jednak również prowadzić do nadmiernej migracji w próbkach kontrolnych. W trakcie każdego doświadczenia napięcie musi być utrzymywane na stałym poziomie, a zmienność pozostałych parametrów powinna mieścić się w wąskim i określonym zakresie, na przykład w próbie JaCVAM potencjał 0,7 V/cm był wytwarzany przy początkowym natężeniu prądu 300 mA. Głębokość roztworu buforowego powinna być skorygowana, aby można było uzyskać wymagane warunki i utrzymać je przez cały czas trwania doświadczenia. Należy zarejestrować wartości natężenia prądu na początku i na końcu procesu elektroforezy. W związku z tym na wstępnym etapie wykazywania bieguności w danym laboratorium należy określić optymalne warunki w odniesieniu do każdej badanej tkanki. Temperaturę roztworu użytego do elektroforezy należy utrzymywać na etapie rozwijania łańcucha DNA i procesu elektroforezy na niskim poziomie – zazwyczaj 2–10 °C (10). Należy zarejestrować temperaturę roztworu użytego do elektroforezy na początku rozwijania się łańcucha DNA, na początku elektroforezy i po zakończeniu elektroforezy.

Po zakończeniu elektroforezy szkiełka mikroskopowe należy na co najmniej 5 minut zanurzyć lub przez taki czas płukać w zubożającym roztworze buforowym. Żele można barwić i zliczać w stanie „świeżym” (np. w ciągu 1–2 dni) lub można odwoźnić do celów późniejszego zliczania (np. w ciągu 1–2 tygodni po barwieniu) (56). Należy jednak dokonać walidacji warunków w trakcie wykazywania bieguności oraz uzyskać dane historyczne, które należy zachować oddzielnie w odniesieniu do każdego z tych warunków. W tym ostatnim przypadku szkiełka mikroskopowe należy odwoźnić przez zanurzenie w czystym etanolu na co najmniej 5 minut, pozostawić do wyschnięcia na powietrzu, a następnie przechowywać w temperaturze pokojowej lub w pojemniku w lodówce do momentu zliczania.

Metody pomiaru

Komety należy oceniać ilościowo, wykorzystując do tego celu automatyczny lub półautomatyczny system analizy obrazu. Szkiełka mikroskopowe będą barwione za pomocą odpowiedniego barwnika fluorescencyjnego, np. SYBR Gold, Green I, jodku propidyny lub bromku etydyny, i mierzone przy odpowiednim powiększeniu (np. 200x) pod mikroskopem fluorescencyjnym wyposażonym w odpowiednie czujniki lub kamerę cyfrową (np. CCD).

Komórki można zaklasyfikować do trzech kategorii zgodnie z opisami w atlasie obrazów komet (57), mianowicie komórki zliczalne, komórki niezliczalne oraz „komórki cieniowe” (dodatkowe wyjaśnienia można znaleźć w pkt 56). Aby uniknąć artefaktów, należy zliczyć tylko komórki zliczalne (z wyraźnie wykształconą głową i ogonem, nieoddziałujące na sąsiednie komórki) pod kątem procentowej zawartości DNA w ogonie. Nie ma potrzeby zgłaszania częstości występowania komórek niezliczalnych. Częstość występowania „komórek cieniowych” należy określić wizualnie (ponieważ brak wyraźnego obrazu głowy będzie oznaczać, że nie jest łatwo je wykryć za pomocą analizy obrazu) przez zliczenie co najmniej 150 komórek na próbkę (dodatkowe wyjaśnienia można znaleźć w pkt 56) i udokumentować oddzielnie.

Wszystkie preparaty, w tym te służące do kontroli dodatniej i ujemnej, należy indywidualnie zakodować i zrandomizować, tak aby osoba zliczająca nie знаła warunków podawania substancji chemicznej. W przypadku każdej próbki (na tkankę danego zwierzęcia) należy poddać analizie co najmniej 150 komórek (z wyłączeniem komórek cieniowych – zob. pkt 56). Zliczenie 150 komórek w odniesieniu do zwierzęcia u co najmniej 5 zwierząt na dawkę (mniej w próbie jednoczesnej kontroli dodatniej – zob. pkt 29) zapewnia dostateczną moc testu statystycznego, jak wynika z analizy w Smith *et al.*, 2008 (5). Jeżeli stosowane są szkiełka mikroskopowe, mogłoby to odpowiadać wynikowi uzyskanym z 2 lub 3 szkiełek na próbkę w przypadku wykorzystania pięciu zwierząt na każdą grupę. Należy poddać obserwacji szereg obszarów szkiełka o zagęszczeniu gwarantującym, że nie występują nakładające się ogony. Należy unikać zliczania na krawędziach szkiełek mikroskopowych.

Pęknięcia łańcuchów DNA w teście kometowym można mierzyć, wykorzystując w tym celu niezależne punkty końcowe, takie jak procentowa zawartość DNA w ogonie, długość ogona i moment ogonowy. W przypadku użycia systemu analizy obrazu z odpowiednim oprogramowaniem można dokonać wszystkich trzech pomiarów. Zaleca się jednak, aby do oceny i interpretacji wyników stosować procentową zawartość DNA w ogonie (zwaną też procentową intensywnością ogona) (12) (40) (41) (42), którą wyznacza się przez intensywność fragmentu DNA w ogniu wyrażoną jako procentowa część całkowitej intensywności komórki (13).

Uszkodzenia tkanek i cytotoksyczność

Ustalenia potwierdzające toksyczność w teście kometowym mogą wynikać nie tylko z samej genotoksyczności – toksyczność tkanki docelowej może być również efektem nasilonej migracji DNA (12) (41). I odwrotnie – niska lub umiarkowana cytotoksyczność jest często powodowana przez znane genotoksyny (12), co wskazuje, że sam w sobie test kometowy nie pozwala odróżnić migracji DNA spowodowanej genotoksycznością od migracji spowodowanej cytotoksycznością. Jednak w przypadkach, w których obserwuje się wzrastającą migrację DNA, zaleca się zbadanie jednego wskaźnika cytotoksyczności lub większej ich liczby, ponieważ może to być pomocne w interpretacji wyników. Wzrastającą migrację DNA w obecności wyraźnego występowania cytotoksyczności należy interpretować z zachowaniem ostrożności.

Proponowano wiele miar cytotoksyczności i spośród nich zmiany histopatologiczne uznano za odpowiednią miarę toksyczności tkankowej. Obserwacje takie jak stan zapalny, nacieki komórkowe, zmiany apoptotyczne lub nekrotyczne były kojarzone ze wzrostem migracji DNA, jednak jak wykazano w próbie walidacyjnej JaCVAM (12) nie jest dostępna ostateczna lista zmian histopatologicznych zawsze kojarzonych ze zwiększoną migracją DNA. Zmiany w pomiarach dokonywanych w chemii klinicznej (np. AST, ALT) również mogą stanowić źródło przydatnych informacji na temat uszkodzeń tkanek i można również brać pod uwagę dodatkowe wskaźniki, takie jak aktywacja kaspaz, test TUNEL, test w obecności Aneksyny V itd. Istnieje jednak ograniczona liczba opublikowanych danych, które dotyczą wykorzystania tych ostatnich wskaźników w badaniach *in vivo*, a niektóre z nich mogą być mniej wiarygodne niż inne.

Komórki cieniowe (zwane również chmurami, ang. *hedgehog*) są to komórki, na których mikroskopowy obraz składa się mała lub nieistniejąca głowa oraz długie rozmyte ogony i które uważa się za bardzo poważnie uszkodzone komórki, chociaż ich etiologia nie jest dokładnie znana (zob. dodatek 3). Ze względu na ich wygląd pomiary procentowej zawartości DNA w ogonie za pomocą analizy obrazu są zawodne i w związku z tym komórki cieniowe powinny być oceniane oddzielnie. Należy odnotować i zgłosić obecność komórek cieniowych, zaś każdy wzrost ich liczby, który uznaje się za spowodowany badaną substancją chemiczną, należy zbadać i dokonać interpretacji wyników z zachowaniem ostrożności. Znajomość potencjalnego trybu działania badanych substancji chemicznych może być pomocna w takich rozważaniach.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

Zwierzę jest jednostką doświadczalną i w związku z tym zarówno dane dotyczące poszczególnych zwierząt, jak i podsumowanie wyników należy przedstawić w postaci tabeli. Ze względu na hierarchiczność danych zaleca się określenie mediany procentowej zawartości DNA w ogonie w odniesieniu do każdego szkiełka mikroskopowego i obliczenie średniej z wartości median w odniesieniu do każdego zwierzęcia (12). Następnie należy wyznaczyć średnią ze wszystkich średnich dla poszczególnych zwierząt w celu uzyskania średniej grupowej. Wszystkie te wartości należy uwzględnić w sprawozdaniu. Można zastosować alternatywne podejścia (zob. pkt 53), jeżeli jest to uzasadnione z naukowego i statystycznego punktu widzenia. Analizę statystyczną można wykonywać, stosując szereg podejść (58) (59) (60) (61). Jak przedstawiono w powyższych źródłach, dobierając metodę statystyczną, która zostanie zastosowana, należy zastanowić się nad potrzebą transformacji danych (np. w postaci logarytmiczną lub pierwiastka kwadratowego) lub dodaniem małej liczby (np. 0,001) do wszystkich (nawet różnych od zera) wartości w celu ograniczenia wpływu zerowych wartości komórek. Szczegóły analizy interakcji pomiędzy podawaniem substancji chemicznej a płcią w przypadku wykorzystania w badaniu obu płci i późniejszej analizy danych w przypadku stwierdzenia różnic lub ich braku podano w dodatku 2. Należy także zgłosić dane dotyczące ce toksyczności i objawów klinicznych.

Kryteria dopuszczalności

Dopuszczalność testu ocenia się na podstawie następujących kryteriów:

- a. uznaje się, że dopuszczalne jest włączenie danych dotyczących jednoczesnej kontroli ujemnej do prowadzonej przez laboratorium bazy danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej, jak opisano w pkt 16;
- b. jednoczesne kontrole dodatnie (zob. pkt 29) powinny wywoływać reakcje zgodne z reakcjami odnotowanymi w bazie danych historycznych dotyczących kontroli dodatniej i wykazywać statystycznie istotny wzrost w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną;
- c. poddano analizie wystarczające liczby komórek i dawek (pkt 52 i 36–38);
- d. kryteria wyboru najwyższej dawki są spójne z kryteriami opisanymi w pkt 36.

Ocena i interpretacja wyników

O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie dodatni, jeżeli:

- a. co najmniej jedna badana dawka wykazuje statystycznie istotny wzrost w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną,
- b. ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu tendencji pokazuje, że wzrost jest powiązany z dawką,
- c. którykolwiek wynik znajduje się poza rozkładem danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej dla danego gatunku, nośnika, drogi podawania, tkanki i liczby podań.

W przypadku gdy wszystkie wspomniane kryteria są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna jest w stanie wywołać pęknięcia łańcucha DNA w tkankach badanych w danym układzie badawczym. Jeżeli spełnione jest tylko jedno lub tylko dwa spośród powyższych kryteriów, zob. pkt 62.

O ile wszystkie kryteria dopuszczalności są spełnione, uznaje się, że badana substancja chemiczna daje wynik wyraźnie ujemny, jeżeli:

- a. żadne z badanych stężeń nie wykazuje statystycznie istotnego wzrostu w porównaniu z jednoczesną kontrolą ujemną,
- b. ocena przeprowadzona z zastosowaniem odpowiedniego testu tendencji pokazuje, że wzrost nie jest powiązany ze stężeniem.
- c. wszystkie wyniki mieszczą się w obrębie rozkładu danych historycznych dotyczących kontroli ujemnej w odniesieniu do danego gatunku, nośnika, drogi podawania, tkanki i liczby podań;
- d. przedstawiono bezpośredni lub pośredni dowód potwierdzający narażenie tkanki docelowej bądź toksyczność dla tkanki docelowej.

Badaną substancję chemiczną uznaje się następnie za niezdolną do wywołania pęknięcia łańcucha DNA w tkankach badanych w danym układzie badawczym.

Weryfikacja wyraźnie dodatniej lub ujemnej reakcji nie jest wymagana.

Jeżeli reakcja nie jest ani wyraźnie ujemna, ani wyraźnie dodatnia (tj. nie wszystkie kryteria wymienione w pkt 59 lub 60 są spełnione) oraz aby ułatwić ustalenie biologicznego znaczenia wyniku, dane powinny zostać ocenione w oparciu o opinię eksperta lub wyniki dalszych przeprowadzonych badań, jeżeli jest to uzasadnione z naukowego punktu widzenia. Przydatne może być zliczenie dodatkowych komórek (w stosownych przypadkach) lub powtórne przeprowadzenie doświadczenia, potencjalnie z zastosowaniem zoptymalizowanych warunków doświadczalnych (np. odstępów czasu między dawkami, innych dróg podawania, innych okresów pobierania próbek lub innych tkanek).

W rzadkich przypadkach nawet po przeprowadzeniu dalszych badań uzyskany zbiór danych uniemożliwi uznanie wyników za dodatnie lub ujemne i w takiej sytuacji zostanie uznany za niejednoznaczny.

W celu dokonania oceny biologicznego znaczenia wyniku dodatniego lub niejednoznacznego muszą być dostępne informacje dotyczące cytotoksyczności w tkance docelowej (zob. pkt 54–55). W przypadku uzyskania dodatnich lub niejednoznacznych wyników wyłącznie w obecności oczywistego dowodu na cytotoksyczność, badanie zostanie uznane za niejednoznaczne w odniesieniu do genotoksyczności, chyba że istnieje dostatecznie dużo pomocniczych informacji do celów sformułowania ostatecznego wniosku. W razie ujemnego wyniku badania w przypadku występowania objawów toksyczności przy wszystkich badanych dawkach zalecane byłoby dalsze badanie z wykorzystaniem dawek nietoksycznych.

Sprawozdanie z badania

Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna:

- źródło, numer partii (jeżeli dostępny);
- stabilność badanej substancji chemicznej, data graniczna do użytku lub data ponownej analizy, jeżeli są znane.

Substancja jednoskładnikowa:

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

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:

- opisane w miarę możliwości poprzez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

Kontrola z rozpuszczalnikiem/nośnikiem:

- uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika/nośnika;
- rozpuszczalność oraz stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku/nośniku, jeżeli są znane;
- przygotowanie postaci użytkowych dawek;
- oznaczenie analityczne postaci użytkowych (np. stabilność, jednorodność, stężenianominalne).

Zwierzęta doświadczalne:

- wykorzystany gatunek/szczep oraz uzasadnienie ich wyboru,
- liczba, wiek i płeć zwierząt;

- źródło, warunki utrzymywania, pasza, urozmaicenie warunków bytowania itp.;
- masa ciała poszczególnych zwierząt na początku i na końcu badania, w tym zakres masy ciała, średnia i odchylenie standardowe dla każdej grupy.

Warunki badania:

- dane dotyczące kontroli dodatnich i ujemnych (z rozpuszczalnikiem/nośnikiem);
- dane uzyskane w ramach badania ustalającego zakres dawkowania (jeżeli zostało przeprowadzone);
- uzasadnienie wyboru poziomu dawkowania;
- szczegółowe informacje dotyczące przygotowania badanej substancji chemicznej;
- szczegółowe informacje dotyczące podawania badanej substancji chemicznej;
- uzasadnienie drogi podawania;
- miejsce wstrzyknięcia (w odniesieniu do podawania drogą podskórną lub dożylną);
- metody przygotowania próbek, o ile są dostępne, analizy histopatologiczne, w szczególności w przypadku substancji chemicznej dającej wynik dodatni w teście kometowym;
- uzasadnienie wyboru tkanek;
- metody sprawdzania, czy badana substancja chemiczna dotarła do tkanki docelowej lub do krwiobiegu w przypadku otrzymania wyników ujemnych;
- dawka faktyczna (mg/kg masy ciała na dobę) obliczona na podstawie stężenia badanej substancji chemicznej (ppm) w paszy/wodzie do picia (ppm) i spożycie, w stosownych przypadkach;
- szczegółowe informacje dotyczące jakości paszy i wody;
- szczegółowy opis harmonogramów podawania substancji chemicznej i pobierania próbek oraz ich uzasadnienie (np. dane toksykokinetyczne, o ile są dostępne);
- metoda uśmierzania bólu, analgezja;
- metoda uśmiercenia;
- procedury izolowania i konserwacji tkanek;
- metody przygotowywania zawiesiny pojedynczych komórek/jąder;
- źródło i numery partii wszystkich odczynników (o ile to możliwe);
- metody oceny cytotoksyczności;
- warunki elektroforezy;
- zastosowane techniki barwienia; oraz
- metody zliczania i pomiaru komet.

Wyniki:

- ogólne obserwacje kliniczne, o ile miały miejsce, przed badaniem i podczas całego okresu badania w odniesieniu do każdego zwierzęcia;
- dowody na wystąpienie cytotoksyczności, o ile była badana;
- w przypadku badań trwających dłużej niż jeden tydzień: masa poszczególnych zwierząt w trakcie badania, w tym zakres masy ciała, średnia i odchylenie standardowe dla każdej grupy. spożycie pokarmu;

- zależność dawka-odpowiedź, jeżeli jest oczywista;
- w odniesieniu do każdej tkanki/zwierzęcia procentowa zawartość DNA w ogonie (lub inna miara, o ile została wybrana) i wartości mediany dla każdego szkiełka mikroskopowego, wartości średniej dla każdego zwierzęcia i wartości średniej dla każdej grupy;
- dane dotyczące jednoczesnych i historycznych kontroli ujemnych wraz z zakresami, średnimi i odchyleniami standardowymi w odniesieniu do każdej tkanki poddanej ocenie;
- dane dotyczące jednoczesnych oraz historycznych kontroli dodatnich;
- w przypadku tkanek innych niż wątroba wykres krzywej dawka-efekt na podstawie kontroli dodatniej. Można go sporządzić na podstawie danych zebranych podczas procedury wykazywania biegłości (zob. pkt 16–17) i dołączyć do niego uzasadnienie wraz z cytatami z aktualnych pozycji literatury przedmiotu w odniesieniu do poziomu i rozproszenia reakcji na substancje kontrolne w tej tkance;
- zastosowane analizy i metody statystyczne; oraz kryteria uznawania reakcji za dodatnią, ujemną lub niejednoznaczną,
- częstość występowania komórek cieniowych w każdej grupie i u poszczególnych zwierząt.

Omówienie wyników

Wniosek

Bibliografia

BIBLIOGRAFIA

- (1) Kirkland, D., G. Speit (2008), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo*, *Mutation Research*, t. 654/2, s. 114–132.
- (2) Brendler-Schwaab, S. *et al.*(2005), The *in vivo* Comet assay:use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, t. 20/4, s. 245–254.
- (3) Burlinson, B. *et al.* (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing:result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, t. 627/1, s. 31–35.
- (4) Burlinson, B. (2012), The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, t. 817, s. 143–163.
- (5) Smith, C.C. *et al.*(2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, t. 23/3, s. 233–240.
- (6) Hartmann, A. *et al.*(2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, t. 18/1, s. 45–51.
- (7) McKelvey-Martin, V.J.*et al.* (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay):a European review, *Mutation Research*, t. 288/1, s. 47–63.
- (8) Tice, R.R.*et al.* (2000), Single cell gel/Comet assay:guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 35/3, s. 206–221.
- (9) Singh, N.P.*et al.*(1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, t. 175/1, s. 184–191.
- (10) Rothfuss, A. *et al.*(2010), Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, t. 702/1, s. 40–69.
- (11) OECD (2015), Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015, publikacje OECD na temat środowiska, seria dotycząca badań i oceny, nr 234, OECD, Paryż.

- (12) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, seria dotycząca badań i oceny nry 195 i 196, OECD Publishing, Paryż.
- (13) Olive, P.L., J.P. Banath, R.E.Durand (1990), Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the „Comet” assay, *Radiation Research*, t. 122/1, s. 86–94.
- (14) Tice, R.R., G.H. Strauss (1995), The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells*, t. 13/1, s. 207–14.
- (15) Collins, A.R (2004), The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, t. 26/3, s. 249–61.
- (16) Rothfuss, A. *et al.*(2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, t. 723/2, s. 108–120.
- (17) Kushwaha, S. *et al.* (2010), Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, t. 58/1, s. 145–54.
- (18) Vasquez, M.Z. (2010), Combining the *in vivo* Comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation, *Mutagenesis*, t. 25/2, s. 187–199.
- (19) Bowen, D.E.(2011), Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, *Mutation Research*, t. 722/1, s. 7–19.
- (20) Recio, L. *et al.*(2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *The Journal of Toxicological Science*, t. 35/2, s. 149–162.
- (21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract, *Mutagenesis*, t. 28/6, s. 621–623.
- (22) Hartmann, A. (2004), **Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations**, *Mutagenesis*, t. 19/1, s. 51–59.
- (23) Nesslany, F. (2007), *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, t. 630/1, s. 28–41.
- (24) Brendler-Schwaab, S.Y., B.A. Herbold (1997), A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, t. 393/1-2, s. 175–178.
- (25) Toyozumi, T. *et al.*(2011), Use of the *in vivo* skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, t. 726/2, s. 175–180.
- (26) Struwe, M. *et al.*(2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, t. 7/2, s. 240–249.
- (27) Wada, K. *et al.*(2012), A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, t. 742/1–2, s. 26–30.
- (28) Wang, A. *et al.* (2007), Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, t. 634/1–2, s. 51–59.

- (29) Burlinson, B. *et al.* (2007), *In Vivo Comet Assay Workgroup*, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, t. 627/1, s. 31–5.
- (30) Jackson, P. *et al.* (2012), Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, t. 6/5, s. 486–500.
- (31) Sasaki, Y.F. *et al.* (2000), The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, t. 30/6, s. 629–799.
- (32) Sekihashi, K. *et al.* (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, t. 517/1–2, s. 53–74.
- (33) Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009), **The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity**, *Mutation Research*, t. 681/1, s. 3–12.
- (34) Zheng, H., P.L.Olive (1997), Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice, *International Journal of Radiation Biology*, t. 71/3, s. 275–282.
- (35) Cordelli, E. *et al.* (2003), Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, t. 160/4, s. 443–451.
- (36) Merk, O., G. Speit (1999), Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 33/2, s. 167–172.
- (37) Pfuhrer, S., H.U.Wolf (1996), Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 27/3, s. 196–201.
- (38) Wu, J.H., N.J.Jones (2012), Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay, *Methods in Molecular Biology*, t. 817, s. 165–181.
- (39) Spanswick, V.J., J.M.Hartley, J.A.Hartley (2010), **Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay**, *Methods in Molecular Biology*, t. 613, s. 267–282.
- (40) Kumaravel, T.S., A.N.Jha (2006), Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, t. 605(1–2), s. 7–16.
- (41) Burlinson, B. *et al.* (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, t. 627/1, s. 31–5.
- (42) Kumaravel, T.S. *et al.* (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, t. 25/1, s. 53–64.
- (43) Ersson, C., L. Möller (2011), The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments, *Mutagenesis*, t. 26/6, s. 689–695.
- (44) Møller, P. *et al.* (2010), Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, t. 25/2, s. 109–111.
- (45) Forchhammer, L. *et al.* (2010), Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, t. 25/2, s. 113–123.
- (46) Azqueta, A. *et al.* (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, t. 724/1–2, s. 41–45.

- (47) Hayashi, M. *et al.*(2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research*, t. 723/2, s. 87–90.
- (48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, John Wiley and Sons, Nowy Jork, wyd. II.
- (49) Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123)
- (50) Rozdział B.8 niniejszego załącznika: *Subacute Inhalation Toxicity:28-Day Study*.
- (51) Rozdział B.29 niniejszego załącznika: *Subchronic Inhalation Toxicity:90-day Study*.
- (52) Blakey, D.H., G.R.Douglas (1984), Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, t. 140/2–3, s. 141–145.
- (53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, t. 140/2–3, s. 35–41.
- (54) OECD (2002), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation”, Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria OECD dotycząca badań i oceny nr 19, OECD Publishing, Paryż.
- (55) Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, t. 34/1, s. 50–54.
- (56) Hartmann, A. *et al.*(2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, t. 18/1, s. 45–51.
- (57) Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co., Ltd., Tokio, Japonia.
- (58) Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, t. 19/2, s. 109–119.
- (59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, t. 18/2, s. 167–75.
- (60) Bright, J. *et al.*(2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, t. 10/6, s. 485–493.
- (61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, t. 23/3, s. 171–182.
-

Dodatek 1

DEFINICJE

Elektroforeza żelowa pojedynczych komórek w środowisku alkalicznym: Czuła technika wykrywania uszkodzenia podstawowego DNA na poziomie poszczególnych komórek/jąder.

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

Kometa: kształt przybierany przez nukleoidy pod wpływem pola elektroforetycznego z powodu podobieństwa do komet: głową komety jest jądro komórki, a ogon zostaje utworzony przez DNA migrujące z jądra w polu elektrycznym.

Kluczowa zmienna / kluczowy parametr: jest to zmienna protokołu, która na skutek niewielkiej zmiany może mieć bardzo duży wpływ na wnioski wynikające z testu. Kluczowe zmienne mogą być charakterystyczne dla danej tkanki. Nie należy modyfikować kluczowych zmiennych, w szczególności w trakcie testu, bez uprzedniego rozważenia, w jaki sposób modyfikacja może wpłynąć na zamianę wyniku testu, na przykład na podstawie wielkości i zmienności reakcji w kontroli dodatniej i ujemnej. Sprawozdanie z badania powinno zawierać listę modyfikacji kluczowych zmiennych wprowadzonych w trakcie testu lub w porównaniu ze standardowym protokołem danego laboratorium, wraz z podaniem uzasadnienia każdej modyfikacji.

Intensywność ogona lub procentowa zawartość DNA w ogonie: jest to odpowiednik intensywności ogona komety w stosunku do całkowitej intensywności (głowa + ogon). Odzwierciedla ilość pęknięć DNA wyrażoną w procentach.

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

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

Dodatek 2

**PLAN CZYNNIKOWY MAJĄCY NA CELU USTALENIE RÓŻNIC PŁCIOWYCH W TEŚCIE KOMETOWYM
IN VIVO****Plan czynnikowy i jego analiza**

W ramach takiego planu poddaje się badaniu co najmniej 5 samców i 5 samic przy każdym poziomie stężenia, co oznacza wykorzystanie co najmniej 40 zwierząt (20 samców i 20 samic oraz odpowiednie kontrole dodatnie).

Plan ten, będący jednym z prostszych planów czynnikowych, jest równoważny dwukierunkowej analizie wariancji, w której płeć i poziom stężenia stanowią efekty główne. Dane te można analizować, stosując wiele standardowych pakietów oprogramowania statystycznego, takich jak SPSS, SAS, STATA i Genstat, a także wykorzystując R.

W ramach analizy dokonuje się podziału zmienności w zbiorze danych na zmienność pomiędzy płciami, zmienność pomiędzy stężeniami oraz na zmienność zależną od interakcji pomiędzy płciami i stężeniami. Każdy z członów porównuje się z szacunkową zmiennością pomiędzy zwierzętami z kontrpróby w ramach grup zwierząt tej samej płci, którym podaje się substancję chemiczną w takim samym stężeniu. Szczegółowe informacje na temat metodyki przeprowadzania tego doświadczenia można znaleźć w wielu standardowych podręcznikach statystycznych (zob. bibliografia) oraz w narzędziach pomocowych dostarczanych razem z pakietami oprogramowania statystycznego.

Analizę rozpoczyna się od sprawdzenia członu interakcji płci ze stężeniem w tabeli ANOVA (¹). W przypadku braku członu istotnej interakcji połączone wartości dla poszczególnych płci lub dla poszczególnych poziomów stężeń mogą posłużyć jako ważne testy statystyczne pomiędzy poziomami na podstawie członu zmienności wewnątrzgrupowej w tabeli ANOVA.

Kolejnym etapem analizy jest podział szacunku zmienności pomiędzy stężeniami na kontrasty do celów przeprowadzenia testu reakcji pod kątem kontrastów liniowych i kwadratowych przy poszczególnych poziomach stężeń. W przypadku wystąpienia istotnej interakcji pomiędzy płcią a stężeniem człon ten można również podzielić na kontrasty interakcji pomiędzy efektem liniowym a płcią oraz pomiędzy efektem kwadratowym a płcią. Człony te umożliwiają zbadanie, czy zależność stężenie-odpowiedź przebiega równoległe dla obydwu płci, czy też otrzymuje się różne odpowiedzi dla obu płci.

Szacunek zmienności wewnątrzgrupowej można wykorzystać do przeprowadzenia testów parami w odniesieniu do różnicy między średnimi. Tego rodzaju porównania można przeprowadzać pomiędzy średnimi dla obydwu płci oraz pomiędzy średnimi dla poszczególnych poziomów stężeń, np. w celu porównania z poziomami odnotowanymi w kontrolach ujemnych. W przypadkach, w których występuje istotna interakcja, można dokonać porównań pomiędzy średnimi dla poszczególnych stężeń w ramach danej płci lub pomiędzy średnimi dla poszczególnych płci w ramach danego stężenia.

Bibliografia

Istnieje wiele podręczników statystycznych poświęconych teorii, planowaniu, metodyce, analizie i interpretacji planów czynnikowych – począwszy od najprostszyc analiz dwuczynnikowych po bardziej złożone formy wykorzystywane w metodyce planowania doświadczeń. Poniższa lista nie jest wyczerpująca. Niektóre publikacje zawierają praktyczne przykłady porównywalnych planów, niekiedy razem z kodem niezbędnym do przeprowadzenia analiz przy wykorzystaniu różnych pakietów oprogramowania.

- (1) Box, G.E.P, Hunter, W.G. i Hunter, J.S.(1978).Statistics for Experimenters.An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building.Nowy Jork:John Wiley & Sons.
- (2) Box G.E.P. i Draper, N.R. (1987) Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.
- (3) Doncaster, C.P.i Davey, A.J.H.(2007) Analysis of Variance and Covariance:How to choose and Construct Models for the Life Sciences.Cambridge University Press.

(¹) Statystycy stosujący podejście modelowe, np. ogólne modele liniowe, mogą przeprowadzić analizę w inny, choć porównywalny, sposób, ale niekoniecznie muszą wyprowadzać tradycyjną tabelę ANOVA, która wywodzi się z algorytmicznych podejść do obliczania danych statystycznych opracowanych przed pojawieniem się komputerów.

- (4) Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.
 - (5) Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.
 - (6) Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.
 - (7) Wu, C.F.J i Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.
-

Dodatek 3

OBECNE OGRANICZENIA TESTU

Ze względu na bieżący stan wiedzy występuje szereg ograniczeń związanych z testem kometowym *in vivo*. Należy oczekiwać, że ograniczenia te zostaną częściowo wyeliminowane lub zdefiniowane w węższym zakresie, ponieważ zdobyto większe doświadczenie w zakresie stosowania testu do celów rozwiązywania problemów w kontekście regulacyjnym.

1. Niektóre rodzaje uszkodzeń DNA mogą być krótkotrwałe, tj. zostać naprawione zbyt szybko, aby można było je zaobserwować w ciągu 24 godzin lub po upływie dłuższego okresu od ostatniej dawki. Nie istnieje żadna znana lista tych rodzajów krótkotrwałych uszkodzeń ani substancji chemicznych, które mogą powodować tego rodzaju uszkodzenia, ani też nie wiadomo, na przestrzeni jakiego okresu można takie uszkodzenia wykryć. Optymalne okresy pobierania próbek mogą również zależeć od substancji chemicznej lub drogi podawania, należy zatem określić okresy pobierania próbek na podstawie danych kinetycznych (np. czasu, T_{maks} , w którym zostaje osiągnięte szczytowe stężenie (C_{maks}) w osoczu lub tkance), ilekroć tego rodzaju dane są dostępne. W przypadku większości badań walidacyjnych wykonywanych jako wsparcie niniejszej metody badawczej określano czas sekcji na 2 lub 3 godziny po podaniu ostatniej dawki. W przypadku większości badań w publikowanej literaturze jest mowa o podawaniu ostatniej dawki na 2–6 godzin przed uśmierceniem. W związku z tym doświadczenia te były wykorzystywane jako podstawa zalecenia dotyczącego przedmiotowej metody badawczej, zgodnie z którym w razie braku innych danych, ostatnią dawkę należy podać w ściśle określonym momencie na 2–6 godzin przed sekcją.
2. W przeciwieństwie do podawania przez sondę nie istnieją znane dane badawcze, które określają czułość testu na wykrycie krótkotrwałego uszkodzenia DNA po podaniu substancji w paszy lub wodzie do picia. Uszkodzenia DNA wykrywano po podaniu substancji w karmie i wodzie do picia, ale istnieje stosunkowo mało takich zgłoszeń w porównaniu ze znacznie większym doświadczeniem w tym względzie z podawaniem przez sondę i podaniem dootrzewnowym. Zatem czułość testu może być mniejsza w przypadku substancji chemicznych, które wywołują krótkotrwałe uszkodzenia, podawanych w karmie lub wodzie do picia.
3. Nie prowadzono żadnych międzylaboratoryjnych badań na tkankach innych niż tkanki wątroby i żołądka, w związku z tym nie sformułowano żadnego zalecenia w odniesieniu do sposobu, w jaki należy uzyskać czułą i odtwarzalną reakcję w tkankach innych niż wątroba, takich jak przewidywane zakresy kontroli dodatniej i ujemnej. W przypadku wątroby nie można było również osiągnąć porozumienia w sprawie ustalenia dolnej wartości granicznej kontroli ujemnej.
4. Chociaż istnieje szereg publikacji potwierdzających mylący efekt badania cytotoksyczności *in vitro*, opublikowano bardzo mało danych na temat badań *in vivo* i w związku z tym nie można zalecić żadnej pojedynczej miary cytotoksyczności. Zjawiska histopatologiczne takie jak stan zapalny, nacieki komórkowe, zmiany apoptotyczne lub nekrotyczne były kojarzone ze wzrostem migracji DNA, jednak jak wykazano w próbie walidacyjnej JaCVAM (OECD, 2014) zmiany te nie zawsze prowadzą do wykrycia komet i w związku z tym nie jest dostępna ostateczna lista zmian histopatologicznych zawsze kojarzonych ze zwiększoną migracją DNA. W przeszłości sugerowano, że obecność komórek cieniowych (lub chmur) jest wskaźnikiem cytotoksyczności, jednak etiologia tych komórek nie jest dokładnie znana. Istnieją dane, z których wynika, że ich powstawanie może być spowodowane cytotoksycznością związaną z substancją chemiczną, uszkodzeniem mechanicznym / spowodowanym przez działanie enzymów, które zostało zainicjowane podczas przygotowywania próbki (Guerard *et al.*, 2014), lub bardziej ekstremalnym skutkiem genotoksyczności substancji chemicznej. Inne dane wydają się wskazywać, że zostały uzyskane w wyniku rozległych, ale być może dających się naprawić, uszkodzeń DNA (Lorenzo *et al.*, 2013).
5. Tkanki lub jądra komórkowe były z powodzeniem zamrażane na potrzeby późniejszej analizy. Zazwyczaj powoduje to wymierny wpływ na reakcję na kontrolę z nośnikiem i kontrolę dodatnią (Recio *et al.*, 2010; Recio *et al.*, 2012; Jackson *et al.*, 2013). W przypadku zastosowania laboratorium powinno wykazać biegłość w technikach zamrażania i potwierdzić dopuszczalne dolne zakresy procentowej zawartości DNA w ogniu w tkankach docelowych zwierząt, którym podawano nośnik, oraz możliwość wykrycia w dalszym ciągu reakcji dodatnich. W literaturze opisano zamrażanie tkanek różnymi metodami. Obecnie nie ma jednak zgody co do najlepszego sposobu zamrażania i rozmrażania tkanek oraz sposobu oceny, czy potencjalna zmiana w reakcji może mieć wpływ na czułość badania.
6. Ostatnie prace badawcze dowodzą, że należy spodziewać się dalszego skracania listy kluczowych zmiennych i precyzyjniejszego definiowania parametrów kluczowych zmiennych (Guerard *et al.*, 2014).

Bibliografia

- (1) Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 55/2, s. 114–121.
- (2) Jackson, P. et al.(2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, t. 28/6, s. 699–707.
- (3) Lorenzo, Y. et al.(2013), **The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead**, *Mutagenesis*, t. 28/4, s. 427–432.
- (4) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, seria dotycząca badań i oceny nry 195 i 196, OECD Publishing, Paryż.
- (5) Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *J. Toxicol. Sci.* 35:149–62.
- (6) Recio, L. et al.(2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, t. 53/2, s. 101–13.”;

16) w części C rozdział C.13 otrzymuje brzmienie:

„C.13 Bioakumulacja u ryb: narażenie drogą wodną i pokarmową

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 305 (2012). Główny cel przeglądu niniejszej metody badawczej ma dwojaki charakter: Po pierwsze, ma na celu wprowadzenie badania bioakumulacji pokarmowej⁽¹⁾ nadającego się do oznaczenia potencjału bioakumulacji substancji o bardzo słabej rozpuszczalności w wodzie. Po drugie, ma na celu opracowanie metody badawczej, dzięki której w stosownych okolicznościach będzie wykorzystywana mniejsza liczba ryb ze względu na dobrostan zwierząt i która będzie bardziej racjonalna pod względem kosztów.

Na przestrzeni lat, które upłynęły od momentu przyjęcia skonsolidowanej metody badawczej C.13 (1), poddano badaniom wiele substancji i zarówno laboratoria, jak i organy regulacyjne zdobyły znaczne doświadczenie w tym zakresie. W związku z tym nabrano przekonania, że można zmniejszyć złożoność badania, jeżeli zostaną spełnione określone kryteria (por. pkt 88), oraz że podejście zintegrowane jest możliwe. Zdobyte doświadczenie pokazuje również, że czynniki biologiczne, takie jak wzrost i zawartość lipidów w rybach, mogą mieć duży wpływ na wyniki i że w związku z tym konieczne może być ich uwzględnienie. Ponadto uznano, że badanie substancji bardzo słabo rozpuszczalnych w wodzie może być niewykonalne z technicznego punktu widzenia. Dodatkowo, w przypadku substancji słabo rozpuszczalnych w wodzie, narażenie za pośrednictwem wody w środowisku wodnym może mieć małe znaczenie w porównaniu z drogą pokarmową. Doprowadziło to do opracowania metody badawczej, zgodnie z którą ryby są narażane za pośrednictwem pokarmu (por. pkt 7–14 oraz 97 i nast.). Walidacja (badanie międzylaboratoryjne) narażenia drogą pokarmową została przeprowadzona w 2010 r. (51).

Najważniejsze zmiany obejmują:

- można uznać badanie tylko jednego badanego stężenia za wystarczające, jeżeli istnieje prawdopodobieństwo, że współczynnik biokoncentracji (BCF) nie zależy od badanego stężenia;
- możliwe jest wdrożenie planu badania obejmującego ograniczone do minimum narażenie drogą wodną ze zmniejszoną liczbą punktów pobierania próbek, jeżeli spełnione są określone kryteria;

⁽¹⁾ Definicje i jednostki można znaleźć w dodatku 1

- należy zmierzyć zawartość lipidów w rybie, aby można było określić BCF, przyjmując za podstawę 5-procentową zawartość tłuszczu;
- większy nacisk na ocenę kinetycznego BCF (jeżeli istnieje taka możliwość) poza oceną BCF w stanie równowagi;
- w przypadku niektórych grup substancji proponowane będzie badanie narażenia drogą pokarmową, jeżeli uważa się takie rozwiązanie za odpowiedniejsze niż badanie narażenia drogą wodną;
- należy dokonać pomiaru masy ryby, aby można było skorygować BCF_k pod kątem rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu.

Przed rozpoczęciem badań na bioakumulację, należy uzyskać dostęp do następujących informacji o substancji badanej:

- a) czułość techniki analitycznej do celów pomiaru stężenia w tkance i w wodzie lub w pokarmie zarówno substancji badanej, jak i możliwych metabolitów (por. pkt 65).
- b) rozpuszczalność w wodzie [metoda badawcza A.6; (2)]; w celu uzyskania wiarygodnej wartości ten parametr należy oznaczyć zgodnie z metodą, która jest właściwa dla (szacowanego) zakresu rozpuszczalności. W przypadku substancji hydrofobowych będzie to na ogół metoda wymywania;
- c) współczynnik podziału n-oktanol/woda, K_{OW} ⁽¹⁾ [metody badawcze A.8 (4), A.24 (5), A.23 (6)]; lub inne odpowiednie informacje dotyczące zachowania substancji pod względem podziału (e.g. sorpcja w lipidach, K_{OC}); w celu uzyskania wiarygodnej wartości ten parametr należy oznaczyć zgodnie z metodą, która jest właściwa dla (szacowanego) zakresu K_{OW} . W przypadku substancji hydrofobowych będzie to na ogół metoda powolnego mieszania [metoda badawcza A.23 (6)];
- d) stabilność substancji w wodzie (hydroliza [metoda badawcza C.7 (7)]);
- e) stabilność substancji w pokarmie (w szczególności w przypadku wybrania badania narażenia drogą pokarmową);
- f) informacje na temat fototransformacji w związku z warunkami napromieniowania podczas badania (8);
- g) napięcie powierzchniowe (tj. w przypadku substancji, których $\log K_{OW}$ nie można oznaczyć) metoda badawcza A.5 (9)];
- h) Prężność par [metoda badawcza A.4 (10)];
- i) w stosownych przypadkach wszelkie informacje na temat biotycznego lub abiotycznego rozpadu w wodzie, takie jak (między innymi) szybka biodegradowalność [metoda badawcza C.4 części II–VII (11), metoda badawcza C.29 (12)];
- j) informacja na temat metabolitów: struktura, $\log K_{OW}$, powstawanie i rozkład, w stosownych przypadkach;
- k) Stała dysocjacji w środowisku kwaśnym (pK_a) w przypadku substancji, które mogą jonizować. W stosowanych okolicznościach należy skorygować pH wody użytej do badania, aby mieć pewność, że substancja występuje w zjonizowanej postaci w trakcie badania, jeżeli jest to zgodne z wymaganiami gatunku ryb.

Niezależnie od wybranej metody narażenia lub systemu pobierania próbek, niniejsza metoda badawcza obejmuje opis procedury wykorzystywanej do scharakteryzowania potencjału bioakumulacyjnego substancji u ryb. Chociaż zdecydowanie preferowane są systemy badania przepływowego, dopuszczalne są systemy półstatyczne, pod warunkiem że spełnione są kryteria ważności (por. pkt 24 i 113). W przypadku narażenia drogą pokarmową system przepływowy nie jest konieczny do utrzymania stężeń badanej substancji w wodzie, ale przyczyni się do utrzymania odpowiednich stężeń rozpuszczonego tlenu i utrzymania wody w czystości oraz eliminowania np. wpływu produktów wydalania.

⁽¹⁾ Niekiedy używane jest oznaczenie P_{OW} ; oznaczany metodą wytrząsania w kolbie w ramach metody badawczej A.8 (4), metodą HPLC w ramach metody badawczej A.24 (5) i metodą powolnego mieszania w ramach metody badawczej A.23 (6). Niekiedy do oznaczania $\log K_{OW}$ stosowana jest metoda desorbera kolumnowego. Niewiele badań wykonano z wykorzystaniem tej metody, głównie w odniesieniu do bifenyli chlorowanych i dibenzodioxyn (np. Li i Doucette, 1993) (3). W przypadku substancji, które mogą ulegać rozpadowi na jony $\log K_{OW}$ powinien odnosić się do formy zjonizowanej.

Niezależnie od wybranej metody badawczej opis niniejszej metody badawczej zawiera dostatecznie dużo szczegółowych informacji umożliwiających wykonanie badania jednocześnie dając dostatecznie dużo swobody na dostosowanie układu doświadczalnego do warunków poszczególnych laboratoriów i różnych cech charakterystycznych substancji badanych. Badanie narażenia drogą wodną jest najodpowiedniejsze w przypadku substancji organicznych, których wartości $\log K_{ow}$ wynoszą 1,5–6,0 (13), ale może też być stosowane w przypadku silnie hydrofobowych substancji (o wartości $\log K_{ow} > 6,0$), jeżeli można wykazać uzyskanie stabilnego stężenia całkowicie rozpuszczonej substancji badanej w wodzie. Jeżeli nie można wykazać uzyskania stabilnego stężenia substancji badanej w wodzie, badanie narażenia drogą wodną nie będzie właściwe, a zatem konieczne będzie wykorzystanie narażenia drogą pokarmową w celu zbadania zawartości substancji w tkankach ryb (choć interpretacja i wykorzystanie wyników badania narażenia drogą pokarmową mogą zależeć od ram regulacyjnych). Wstępne szacunkowe wartości współczynnika biokoncentracji (BCF, oznaczanego niekiedy jako K_p) w odniesieniu do substancji organicznych wykazujących wartości $\log K_{ow}$ około 9,0 można uzyskać z równania Binteina *et al.* (14). Wstępna szacunkowa wartość współczynnika biokoncentracji dla tak silnie hydrofobowych substancji może być wyższa niż wartość współczynnika biokoncentracji w stanie równowagi (BCF_{ss}), jakiej można byłoby oczekiwać w przypadku doświadczeń laboratoryjnych, zwłaszcza w przypadku stosowania prostego liniowego modelu do wstępnego oszacowania. Parametry charakteryzujące potencjał bioakumulacyjny obejmują stałą szybkości wchłaniania (k_1), stałe wartości wskaźnika utraty, w tym stałą szybkości wydalania (k_2), współczynnik biokoncentracji w stanie równowagi (BCF_{ss}), kinetyczny współczynnik biokoncentracji (BCF_k) oraz pokarmowy współczynnik biomagnifikacji (BMF) ⁽¹⁾.

Znakowane izotopem substancje badane mogą ułatwić analizę wody, paszy i próbek ryb oraz mogą być wykorzystane do ustalenia, czy konieczne będzie zidentyfikowanie i ilościowe oznaczenie metabolitów. Jeżeli mierzony jest ogół pozostałości radioaktywnych (np. przez spalenie lub rozpuszczenie tkanki), wartość BCF lub BMF oparta jest na łącznej ilości substancji macierzystej, wszelkich wychwyconych metabolitach, a także na asymilowanym węglu. Z tego względu wartości BCF lub BMF oparty na łącznej ilości pozostałości radioaktywnych nie może być bezpośrednio porównywalny z BCF lub BMF uzyskiwanych w drodze szczegółowej analizy chemicznej samej tylko substancji macierzystej. Przed analizą w ramach badań substancji znakowanych izotopem w celu oznaczenia BCF lub BMF na podstawie substancji macierzystej można stosować procedury oddzielania, takie jak TLC, HPLC lub GC ⁽²⁾. W przypadku zastosowania technik oddzielania należy dokonać identyfikacji i oznaczenia ilościowego substancji macierzystej i odpowiednich metabolitów ⁽³⁾ (por. pkt 65), jeżeli podstawą do oznaczenia BCF lub BMF ma być stężenie substancji macierzystej w rybach, a nie łączne znakowane izotopem pozostałości. Istnieje również możliwość połączenia badania metabolizmu ryb lub badania rozkładu substancji *in vivo* z badaniem bioakumulacji na podstawie analizy i identyfikacji pozostałości w tkankach. Możliwość metabolizmu można prognozować za pomocą odpowiednich narzędzi (np. zestawu narzędzi OECD QSAR (15) i zamkniętych programów QSAR).

Decyzja dotycząca tego, czy przeprowadzić badanie narażenia drogą wodną czy pokarmową i w jakiej konfiguracji, powinna opierać się na czynnikach określonych w pkt 3, rozpatrywanych łącznie z odpowiednimi ramami regulacyjnymi. Na przykład w przypadku substancji, które mają wysoką wartość $\log K_{ow}$ ale wykazują pomimo to znaczną rozpuszczalność w wodzie w odniesieniu do czułości dostępnych technik analitycznych, w pierwszej kolejności należy rozważyć badanie narażenia drogą wodną. Istnieje jednak możliwość, że informacje dotyczące rozpuszczalności w wodzie nie są całkowicie pewne w odniesieniu do takich hydrofobowych substancji, więc przed podjęciem decyzji, która metoda badawcza ma być zastosowana, należy zbadać możliwość przygotowania stabilnych mierzalnych stężeń roztworu wodnego (stabilne emulsje są niedozwolone) dających się zastosować w badaniu narażenia drogą wodną (16). Nie można udzielić dokładnych normatywnych wskazówek na temat metody, jaka ma być zastosowana, na podstawie kryteriów rozpuszczalności w wodzie i współczynnika podziału n-oktanol/woda, ponieważ inne czynniki (techniki analityczne, rozkład, adsorpcja itp.) mogą mieć istotny wpływ na zastosowanie którejs z metod ze względów przedstawionych powyżej. Wartość $\log K_{ow}$ powyżej 5 i rozpuszczalność w wodzie poniżej ~0,01–0,1 mg/l wyznaczają jednak zbiór substancji, w przypadku których badanie narażenia drogą wodną staje się zbyt trudne.

Należy wziąć pod uwagę inne czynniki, które mogą mieć wpływ na wybór rodzaju badania, w tym adsorpcyjny potencjał substancji w odniesieniu do naczyń badawczych i aparatury laboratoryjnej, jej stabilność w roztworze wodnym w stosunku do stabilności w paszy dla ryb (17) (18) itd.

⁽¹⁾ Definicje i jednostki można znaleźć w dodatku 1

⁽²⁾ TLC: chromatografia cienkowarstwowa; HPLC: wysokosprawną chromatografię cieczową; GC: chromatografia gazowa.

⁽³⁾ W świetle niektórych ram regulacyjnych analiza metabolitów może być obowiązkowa, jeżeli są spełnione określone warunki (por. pkt 65).

Informacje na temat tych praktycznych aspektów można uzyskać z innych wykonanych już badań nad środowiskiem wodnym. Dalsze informacje na temat oceny aspektów efektywności badań bioakumulacyjnych można znaleźć w literaturze (np. (19)).

W odniesieniu do substancji, w przypadku których rozpuszczalność lub utrzymanie stężenia roztworu wodnego oraz analiza tych stężeń nie stwarza żadnych przeszkód dla zastosowania metody narażenia drogą wodną, metoda ta jest preferowana celem oznaczenia potencjału biokoncentracji substancji. W każdym przypadku należy sprawdzić, czy stężenia ekspozycyjne używane do narażenia drogą wodną, które mają być użyte w badaniu, mieszczą się w zakresie rozpuszczalności w wodzie w ośrodkach użytych do badania. W celu utrzymania stabilnego stężenia rozpuszczonej substancji badanej można stosować różne metody, na przykład stosować roztwory podstawowe lub systemy pasywnego dawkowania (np. metodę wymywania), o ile można wykazać, że możliwe jest utrzymanie stałych stężeń oraz że ośrodki użyte do badania nie ulegają zmianom w stosunku do zaleceń określonych w pkt 27.

W przypadku substancji o silnych właściwościach hydrofobowych ($\log K_{ow} > 5$ i rozpuszczalność w wodzie poniżej $\sim 0,01\text{--}0,1$ mg/l) badanie narażenia drogą wodną stać się zbyt trudne. Przyczyny ograniczeń mogą wynikać stąd, że nie można utrzymać stężenia substancji w wodzie na poziomie, który uznaje się za dostatecznie stały (np. na skutek sorpcji na szkło pojemników służących do badania narażenia lub szybkiego wchłaniania przez ryby), lub stąd, że stężenia substancji w wodzie, które mają być zastosowane w badaniu, są tak niskie, że mieszczą się w tym samym zakresie co granica oznaczalności lub poniżej tej granicy⁽¹⁾. W odniesieniu do tych silnie hydrofobowych substancji zaleca się stosowanie badania narażenia drogą pokarmową, pod warunkiem że badanie jest zgodne z odpowiednimi ramami regulacyjnymi i potrzebami w zakresie oceny ryzyka.

W przypadku środków powierzchniowo czynnych należy zastanowić się, czy możliwe jest zbadanie biokoncentracji w środowisku wodnym, biorąc pod uwagę właściwości substancji, ponieważ w przeciwnym razie badanie narażenia drogą pokarmową jest prawdopodobnie właściwsze. Środki powierzchniowo czynne to substancje, które obniżają napięcie międzyfazowe na granicy faz dwóch cieczy. Ich amfifilowy charakter (tzn. składają się one jednocześnie z części hydrofilowej i hydrofobowej) sprawia, że gromadzą się na powierzchniach takich jak granica woda–powietrze, woda–pokarm i ścianki szklanych naczyń, co utrudnia oznaczenie ich stężenia w wodzie.

Badanie narażenia drogą pokarmową pozwala ominąć niektóre aspekty narażenia w przypadku złożonych mieszanin zawierających składniki o różnej rozpuszczalności granicznej w wodzie, ponieważ porównywalne narażenie na wszystkie składniki mieszaniny jest bardziej prawdopodobne niż w metodzie narażenia drogą wodną (por. (20)).

Należy jednak zwrócić uwagę, że w podejściu polegającym na podawaniu substancji z pokarmem uzyskuje się pokarmowy współczynnik biomagnifikacji (BMF), nie zaś współczynnik biokoncentracji (BCF)⁽²⁾. Istnieją metody szacowania kinetycznego współczynnika biokoncentracji (BCF_k) na podstawie danych uzyskanych w badaniu narażenia drogą pokarmową (o czym była mowa w dodatku 8), ale należy zachowywać ostrożność przy stosowaniu takich metod. Na ogół założeniem wspomnianych metod jest kinetyka pierwszego rzędu i metody te mają zastosowanie wyłącznie do niektórych grup związków chemicznych. Mało prawdopodobne jest, aby można było zastosować takie metody do środków powierzchniowo czynnych (zob. pkt 12).

Zminimalizowana konfiguracja badania narażenia drogą wodną z mniejszą liczbą punktów pobierania próbek w celu ograniczenia liczby zwierząt lub zasobów (por. pkt 83 i nast.) powinna być stosowana wyłącznie do tych substancji, w przypadku których istnieje powód, aby oczekiwać, że wchłanianie i wydalanie będą przebiegały zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu (tj. na ogół w przypadku substancji organicznych nieulegających dysocjacji jonowej, por. pkt 88).

⁽¹⁾ Na ogół stężenia mierzone w wodzie w fazie wchłaniania powinny być co najmniej rząd wielkości powyżej granicy oznaczalności, aby można było zmierzyć więcej niż jeden okres półtrwania skażenia organizmu w fazie wydalania.

⁽²⁾ Definicje i jednostki można znaleźć w dodatku 1

C.13 – I: Badanie biokoncentracji u ryb przez narażenie drogą wodną**ZASADA BADANIA**

Badanie składa się z dwóch etapów: fazy narażenia (wchłanianie) i fazy po narażeniu (wydalanie). W fazie wchłaniania grupa ryb należących do tego samego gatunku jest narażona na działanie substancji badanej w jednym stężeniu lub w kilku stężeniach w zależności od właściwości substancji badanej (por. pkt 49). Następnie zostają one przeniesione do osrodka wolnego od substancji badanej na czas trwania fazy wydalania. Faza wydalania jest zawsze niezbędna, chyba że wchłanianie substancji w fazie wchłaniania było nieznaczne. Stężenie substancji badanej w/na rybach (lub ich określonych tkankach) śledzi się w obu fazach badania. Poza grupą narażoną na działanie substancji przetrzymuje się w identycznych warunkach, z wyjątkiem obecności substancji badanej, grupę kontrolną w celu powiązania ewentualnych niekorzystnych skutków zaobserwowanych w badaniu biokoncentracji z odpowiednią grupą kontrolowaną oraz w celu uzyskania stężeń tła substancji badanej ⁽¹⁾.

W badaniu narażenia drogą wodną faza wchłaniania trwa zazwyczaj 28 dni. Jej czas trwania można w razie potrzeby wydłużyć (por. pkt 18) lub skrócić, jeżeli zostanie wykazane, że stan równowagi został osiągnięty wcześniej (por. dodatek 1, definicje i jednostki). Prognozowany czas trwania fazy wchłaniania i czas do osiągnięcia stanu równowagi można obliczyć z równań podanych w dodatku 5. Następnie rozpoczyna się okres wydalania, gdy ryby nie są już narażone na działanie substancji badanej, co polega na przeniesieniu ryb do takiego samego osrodka niezawierającego substancji badanej w czystym naczyniu. W miarę możliwości współczynnik biokoncentracji oblicza się jako wskaźnik stężenia substancji zarówno u ryb (C_f), jak i w wodzie (C_w) w stanie równowagi (BCF_{SS} ; zob. dodatek 1, definicja) i jako kinetyczny współczynnik biokoncentracji (BCF_K ; zob. dodatek 1, definicje i jednostki), który szacuje się jako stosunek stałej wartości szybkości wchłaniania (k_1) i wydalania (k_2) przy założeniu kinetyki pierwszego rzędu ⁽²⁾.

Jeżeli stan równowagi nie zostanie osiągnięty w ciągu 28 dni, wówczas albo oblicza się BCF metodą modelu kinetycznego (por. pkt 38), albo można przedłużyć fazę wchłaniania. Gdyby w związku z tym faza wchłaniania na potrzeby osiągnięcia stanu równowagi stała się zbyt długa (por. pkt 37 i 38, dodatek 5), ze względów praktycznych preferowana jest metoda kinetyczna. Natomiast w przypadku silnie hydrofobowych substancji należy wziąć pod uwagę przeprowadzenie badania narażenia drogą pokarmową, ⁽³⁾ pod warunkiem że badanie takie jest zgodne z odpowiednimi ramami regulacyjnymi.

Stała szybkości wchłaniania, stała szybkości wydalania (utrata) (lub stałe w przypadku bardziej złożonych modeli), współczynnik biokoncentracji (w stanie równowagi lub kinetyczny) oraz, w miarę możliwości, granice ufności każdego z tych parametrów oblicza się w oparciu o model, który najlepiej opisuje mierzone stężenia substancji badanej w rybach i wodzie (por. dodatek 5)

Wzrost masy ciała ryb w toku badania będzie powodował spadek stężenia substancji badanej w rosnących rybach (tzw. rozcieńczenie wynikające ze wzrostu), a zatem kinetyczna wartość BCF będzie niedoszacowana, jeżeli nie zostanie skorygowana pod kątem wzrostu (por. pkt 72 i 73).

Wartość BCF jest oparta na całkowitym stężeniu substancji u ryb (tj. w przeliczeniu na łączną mokrą masę ryb). Jednak do szczególnych celów można wykorzystać określone tkanki lub organy (np. mięśnie, wątroba), jeżeli ryby są wystarczająco duże, lub można podzielić ryby na części jadalne (filet) i niejadalne (wnętrznosci). Ponieważ w przypadku wielu substancji organicznych istnieje wyraźna zależność między potencjałem biokoncentracji i hydrofobowością, istnieje również odpowiednia zależność między zawartością lipidów u ryb doświadczalnych i zaobserwowaną biokoncentracją takich substancji. Zatem w celu ograniczenia wpływu tej przyczyny zmienności na wyniki badania w przypadku substancji o wysokiej lipofilowości (tj. wykazujących $\log K_{OW} > 3$), oprócz biokoncentracji uzyskanej bezpośrednio na podstawie badania biokoncentrację należy wyrażać w znormalizowanej postaci jako odsetek ryb o zawartości lipidów wynoszącej 5 % (na podstawie mokrej masy całego ciała). Jest to niezbędne w celu stworzenia podstawy do porównywania ze sobą wyników uzyskanych w odniesieniu do różnych substancji lub gatunków doświadczalnych. Wartość 5-procentowej zawartości lipidów była powszechnie stosowana ponieważ odpowiada ona średniej zawartości lipidów u ryb powszechnie wykorzystywanych na potrzeby niniejszej metody badawczej (21).

⁽¹⁾ W przypadku większości substancji badanych byłoby najlepiej, gdyby nie zostały wykryte w wodzie próby kontrolnej. Stężenia tła powinny mieć znaczenie wyłącznie w przypadku naturalnie występujących materiałów (np. niektórych metali) i substancji wszechobecnych w środowisku.

⁽²⁾ Jeśli model kinetyki pierwszego rzędu wyraźnie nie ma zastosowania, wówczas należy zastosować modele bardziej złożone (zob. odniesienia w dodatku 5) i zasięgnąć rady specjalisty ds. biostatystyki.

⁽³⁾ Wchłanianie może być ograniczone na skutek niskich stężeń ekspozycyjnych wynikających ze słabej rozpuszczalności w wodzie w badaniu biokoncentracji, podczas gdy znacznie wyższe stężenia ekspozycyjne można uzyskać w badaniu narażenia drogą pokarmową.

INFORMACJE DOTYCZĄCE SUBSTANCJI BADANEJ

Poza właściwościami substancji badanych podanymi we wprowadzeniu (pkt 3) inną wymaganą informacją jest toksyczność dla gatunków ryb, które mają zostać wykorzystane w badaniu, najlepiej asymptotyczne LC_{50} (tj. zależne od czasu) lub toksyczność szacowana na podstawie długoterminowych badań z udziałem ryb (np. metody badawcze C.47 (22), C.15 (23), C.14 (24)).

Dostępna musi być odpowiednia metoda analizy o znanej dokładności, precyzji i czułości na potrzeby oznaczenia ilościowego badanej substancji w roztworach do badań i materiale biologicznym wraz ze szczegółami dotyczącymi przygotowania i składowania próbek. Powinna być również znana analityczna granica oznaczalności substancji badanej zarówno w wodzie, jak i w tkankach ryb. W przypadku zastosowania substancji badanej znakowanej izotopem powinna ona mieć jak najwyższą czystość (np. najlepiej 98 %) i powinna być znana procentowa wartość radioaktywności wynikającej z zanieczyszczeń.

WAŻNOŚĆ BADANIA

Aby badanie było ważne, spełnione muszą być następujące warunki:

zmiany temperatury wody nie mogą przekraczać ± 2 °C, ponieważ duże odchylenia mogą wpłynąć na parametry biologiczne istotne dla wchłaniania i wydalania, a także powodować stres u zwierząt;

stężenie rozpuszczonego tlenu nie może spaść poniżej 60 % nasycenia;

stężenie substancji badanej w komorach utrzymuje się w przedziale ± 20 % średniej zmierzonych wartości w trakcie fazy wchłaniania;

stężenie substancji badanej powinno być mniejsze niż jej graniczna rozpuszczalność w wodzie, biorąc pod uwagę wpływ, jaki może mieć woda użyta do badania na efektywną rozpuszczalność⁽¹⁾;

upadkowość lub inne niekorzystne skutki / choroby, zarówno wśród ryb w próbie kontrolnej, jak i wśród badanych ryb, jest mniejsza niż 10 % po zakończeniu badania; w przypadku gdy badanie trwa kilka tygodni lub miesięcy, upadkowość lub inne niekorzystne skutki w obydwu grupach ryb powinny być niższe niż 5 % na miesiąc i nie powinny przekraczać 30 % przez cały okres. Znaczne różnice w średnim wzroście między grupą badaną a grupą kontrolną ryb, od których pobierano próbki, mogą wskazywać na wystąpienie efektu toksycznego substancji badanej.

SUBSTANCJE ODNIESIENIA

W razie potrzeby do sprawdzenia procedury doświadczalne przydatne byłoby zastosowanie substancji odniesienia o znanym potencjale biokoncentracji i słabo metabolizowane (np. w przypadku gdy laboratorium nie miało wcześniej do czynienia z badaniem lub zmianie uległy warunki doświadczalne).

OPIS METODY

Aparatura

Należy unikać wykorzystywania materiałów – przy czym dotyczy to wszystkich części sprzętu – które mogą ulegać rozpuszczeniu, sorpcji lub ługowaniu i wywoływać niekorzystne skutki u ryb. Można stosować standardowe, prostokątne lub cylindryczne zbiorniki, wykonane z materiałów chemicznie obojętnych i o odpowiedniej pojemności zgodnie ze wskaźnikiem obciążenia (por. pkt 43). Należy maksymalnie ograniczyć stosowanie przewodów rurowych z miękkich tworzyw sztucznych. Należy stosować przewody rurowe wykonane z politetrafluoroetyleny, stali nierdzewnej lub szkła. Doświadczenie pokazało, że w przypadku substancji badanych o wysokich współczynnikach adsorpcji, np. syntetycznych pyretroidów, może być wymagane stosowanie szkła silanizowanego. W takich sytuacjach sprzęt będzie musi zostać wyrzucony po wykorzystaniu. Przed wprowadzeniem organizmów doświadczalnych zaleca się poddanie układów badawczych działaniu substancji badanej w stężeniach, które mają być zastosowane w badaniu, przez okres konieczny do wykazania utrzymania stabilnych stężeń ekspozycyjnych.

⁽¹⁾ W przypadku substancji wieloskładnikowych, UVCB i mieszanin należy wziąć pod uwagę rozpuszczalność w wodzie każdego istotnego składnika w celu oznaczenia odpowiednich stężeń ekspozycyjnych.

Woda

Zwykle do badania wykorzystywana jest woda naturalna, która należy pozyskać z niezanieczyszczonego źródła o jednolitej jakości. Mimo to lepiej może nadawać się woda regenerowana (tj. woda demineralizowana z dodatkiem znanych ilości określonych składników odżywczych), która gwarantuje niezmienną w czasie jednolitą jakość. Jakość wody rozcieńczającej, która ma być wymieszana z substancją badaną, przed wprowadzeniem do naczynia badawczego (por. pkt 30), powinna umożliwiać przetrwanie wybranego gatunku ryb przez okres aklimatyzacji i badań bez występowania u nich oznak nieprawidłowego wyglądu lub zachowania. W idealnym przypadku należy wykazać, że gatunek doświadczalny może przeżyć, rosnąć i rozmnażać się w wodzie rozcieńczającej (np. w badaniu laboratoryjnym lub badaniu na toksyczność w cyklu życia). Wodę rozcieńczającą należy scharakteryzować, podając co najmniej pH, twardość, całkowitą zawartość substancji stałych, całkowity węgiel organiczny (TOC ⁽¹⁾) oraz w miarę możliwości również zawartość amonu, azotynu oraz zasadowość, a w odniesieniu do gatunków morskich – zasolenie. Parametry, które są ważne dla optymalnego dobrostanu ryb, nie są w pełni znane, ale w dodatku 2 podano zalecane najwyższe stężenia szeregu parametrów w odniesieniu do wody słodkiej i morskiej użytej do badania.

W czasie trwania badania jakość wody rozcieńczającej powinna być stała. Na początku badania pH wody powinno mieścić się w zakresie 6,0–8,5, lecz w trakcie danego badania powinno mieścić się w granicach $\pm 0,5$ jednostek pH. Aby mieć pewność, że woda rozcieńczająca nie będzie wpływała zbyt mocno na wyniki badania (np. na skutek kompleksowania substancji badanej) lub nie będzie wywierała szkodliwego wpływu na parametry ryb, należy co pewien czas pobierać próbki do analizy, a przynajmniej na początku i po zakończeniu badania. Jeżeli wiadomo, że woda rozcieńczająca ma względnie stałą jakość, należy oznaczać, np. co trzy miesiące, zawartość metali ciężkich (np. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd i Ni), głównych anionów i kationów (np. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- i SO_4^{2-}), pestycydów (np. całkowitą zawartość pestycydów fosforoorganicznych i chloroorganicznych), całkowity węgiel organiczny i zawiesinę ogólną. Jeśli można wykazać, że jakość wody rozcieńczającej była stała przez co najmniej rok, oznaczeń można dokonywać rzadziej i w większych odstępach czasu (np. co sześć miesięcy).

Naturalna zawartość cząstek oraz całkowity węgiel organiczny w wodzie rozcieńczającej powinny być jak najniższe, aby zapobiec adsorpcji substancji badanej na częściach organicznych, co może zmniejszyć jej biodostępność i prowadzić do niedoszacowania BCF. W przypadku cząstek stałych najwyższa dopuszczalna wartość wynosi 5 mg/l (sucha masa nieprzechodząca przez filtr o rozmiarze porów 0,45 μm), a w przypadku całkowitego węgla organicznego – 2 mg/l (por. dodatek 2). W razie potrzeby wodę rozcieńczającą należy przefiltrować przed użyciem. Udział zawartości węgla organicznego w wodzie użytej do badania pochodzącego od ryb doświadczalnych (odchody) oraz z pozostałości pokarmu powinien być jak najniższy (por. pkt 46).

Roztwory do badań

Przygotować roztwór podstawowy substancji badanej w odpowiednim stężeniu. Roztwór podstawowy najlepiej jest przygotowywać mieszając lub wstrząsając substancję badaną z wodą rozcieńczającą. Alternatywnym rozwiązaniem, które w niektórych przypadkach może okazać się odpowiednie, jest zastosowanie systemu dozowania z desorpcją substancji do fazy stałej. Zasadniczo stosowanie rozpuszczalników i środków dyspergujących (środków rozpuszczających) nie jest zalecane (por. (25)); zastosowanie tych materiałów może jednak być dopuszczalne w celu wytworzenia roztworu podstawowego o odpowiednim stężeniu, należy jednak dokładać wszelkich starań, aby ograniczyć stosowanie takich materiałów do minimum i nie wolno przekraczać ich krytycznego stężenia micelizacji (w stosownych przypadkach). Do rozpuszczalników, których można używać, należą: aceton, etanol, metanol, dimetyloformamid i glikol trietylenowy; dopuszczalne środki dyspergujące to Tween 80, metylceluloza 0,01 % i HCO-40. Stężenie rozpuszczalnika w końcowym ośrodku użytym do badania powinno być jednakowe dla wszystkich podań substancji badanej (tj. bez względu na stężenie substancji badanej) i nie powinno przekraczać oznaczonych dla rozpuszczalnika odpowiednich progowych wartości toksyczności w warunkach badania. Maksymalny poziom odpowiada stężeniu 100 mg/l (lub 0,1 ml/l). Jest mało prawdopodobne, aby stężenie rozpuszczalnika na poziomie 100 mg/l w spowodowało znaczącą zmianę w maksymalnym stężeniu rozpuszczonej substancji badanej, jakie można uzyskać w badanym ośrodku (25). Udział rozpuszczalnika (łącznie z substancją badaną) w całkowitej zawartości węgla organicznego w wodzie użytej do badania powinien być znany. Przez cały okres badania stężenie całkowitego węgla organicznego w naczyniach badawczych nie powinno przekraczać stężenia węgla organicznego pochodzącego z substancji badanej i – jeżeli jest wykorzystywany – rozpuszczalnika lub środka zwiększającego rozpuszczalność ⁽²⁾ o więcej niż 10 mg/l (± 20 %). Zawartość części organicznych może

⁽¹⁾ Całkowity węgiel organiczny obejmuje węgiel organiczny zawarty w cząsteczkach i rozpuszczalny węgiel organiczny (RWO), tj. całkowity węgiel organiczny = węgiel organiczny zawarty w cząsteczkach + RWO.

⁽²⁾ Chociaż na ogół nie jest to zalecane, jeżeli stosuje się rozpuszczalnik lub środek zwiększający rozpuszczalność, węgiel organiczny pochodzący z tego środka należy dodać do węgla organicznego pochodzącego z substancji badanej, aby ocenić stężenie węgla organicznego w naczyniach badawczych.

mieć znaczący wpływ na ilość wolnej rozpuszczonej substancji badanej w badaniach ryb metodą przepływową, zwłaszcza w przypadku substancji wysoce lipofilowych. Mikroekstrakcja do fazy stałej (por. pkt 60) może stanowić źródło ważnych informacji na temat proporcji związanych i wolnych rozpuszczonych związków, z których te ostatnie z założenia reprezentują część biodostępną. Stężenie substancji badanej nie powinno przekraczać granicy rozpuszczalności substancji badanej w ośrodkach użytych do badania nawet w przypadku użycia rozpuszczalnika lub środka zwiększającego rozpuszczalność. Wykorzystując łatwo biodegradowalne rozpuszczalniki, należy zachować ostrożność, ponieważ mogą one powodować problemy ze wzrostem bakterii w badaniach przepływowych. Jeżeli przygotowanie roztworu podstawowego bez użycia środka zwiększającego rozpuszczalność jest niemożliwe, należy zastanowić się nad stosownością badania narażenia drogą wodną w odróżnieniu od badania narażenia drogą pokarmową.

W przypadku badań przepływowych wymagany jest system, który nieprzerwanie dozuje i rozcieńcza roztwór podstawowy substancji badanej (np. pompa dozująca, rozcieńczalnik proporcjonalny, sytnik), lub system dozowania z desorpcją do fazy stałej w celu doprowadzenia badanych stężeń do komór badawczych. Najlepiej jest umożliwić co najmniej pięć wymian objętości na dobę w każdej komorze badawczej. Preferowana ma być technika przepływowa, ale w przypadkach gdy jej zastosowanie nie jest możliwe (np. gdy wywiera niekorzystny wpływ na organizmy doświadczalne), można stosować technikę półstatyczną, pod warunkiem że spełnione są kryteria ważności (por. pkt 24). Natężenia przepływu roztworów podstawowych i wody rozcieńczającej powinny być sprawdzane przez 48 godzin przed badaniem, a potem co najmniej raz dziennie w trakcie badania. Kontrola ta obejmuje określenie natężenia przepływu przez każdą komorę badawczą i pozwala zapewnić, aby różniło się ono w obrębie komór albo pomiędzy nimi o więcej niż 20 %.

Wybór gatunku

Przy wyborze gatunku ważnymi kryteriami są: łatwa dostępność gatunku, możliwość pozyskania w odpowiednich rozmiarach i łatwe utrzymywanie w warunkach laboratoryjnych. Innymi kryteriami wyboru gatunku ryb są jego znaczenie rekreacyjne, komercyjne i ekologiczne oraz porównywalna czułość, wcześniejsze skuteczne zastosowanie itp. Zalecane gatunki doświadczalne są wymienione w dodatku 3. Mogą być też wykorzystywane inne gatunki, ale może to wiązać się koniecznością dostosowania procedury badawczej w celu zapewnienia odpowiednich warunków badania. W takim przypadku należy podać uzasadnienie wyboru gatunku i metody doświadczalnej. Na ogół wykorzystywanie mniejszych gatunków ryb pozwala skrócić czas do osiągnięcia stanu równowagi, ale może być potrzebna większa liczba ryb (próbek) w celu odpowiedniego przeanalizowania zawartości lipidów i stężeń substancji badanej u ryb. Ponadto różnice w tempie oddychania i metabolizmie między młodymi i starszymi osobnikami mogą utrudniać porównanie wyników różnych badań i różnych gatunków doświadczalnych. Należy zauważyć, że w przypadku gatunku ryb badanego w stadium (młodocianym) szybkiego wzrostu, interpretacja danych może stać się skomplikowana.

utrzymywanie ryb (istotne w odniesieniu do narażenia drogą wodną i pokarmową)

Podstawową populację ryb należy aklimatyzować przez co najmniej dwa tygodnie w wodzie (por. pkt 28) w temperaturze badania i podawać przez cały czas wystarczającą ilość paszy (por. pkt 45). Woda i pokarm powinny być tego samego rodzaju, jaki zostanie zastosowany w toku badania.

Po 48-godzinnym okresie adaptacji odnotowuje się upadkowość i zastosowanie mają następujące kryteria:

- upadkowość przekraczająca 10 % populacji w ciągu siedmiu dni: należy odrzucić całą partię;
- upadkowość 5–10 % populacji w ciągu siedmiu dni: aklimatyzacja przez dodatkowe siedem dni – jeżeli upadkowość będzie większa niż 5 % w ciągu tych siedmiu dni, odrzucić całą partię;
- upadkowość poniżej 5 % populacji w ciągu siedmiu dni: dopuścić partię.

U ryb wykorzystanych do badania nie powinny występować widoczne oznaki chorób i anomalie. Wszystkie chore ryby należy odrzucić. Ryby nie powinny być leczone przez dwa tygodnie poprzedzające badanie ani w jego trakcie.

PRZEPROWADZENIE BADANIA

Badanie wstępne

Przeprowadzenie wstępnego doświadczenia może być przydatne w zoptymalizowaniu warunków badania ostatecznego, np. wyboru stężeń substancji badanej, czasu trwania fazy wchłaniania i wydalania, lub w ustaleniu, czy konieczne jest przeprowadzenie pełnego badania. Plan badania wstępnego należy opracować w taki sposób, aby można było uzyskać wymagane informacje. Można rozważyć, czy badanie zminimalizowane wystarczy do uzyskania wartości BCF czy też potrzebne jest pełne badanie (por. pkt 83–95 dotyczące badania zminimalizowanego).

Warunki narażenia na działanie substancji*Czas trwania fazy wchłaniania*

Czas trwania fazy wchłaniania można przewidzieć w oparciu o doświadczenie praktyczne (np. z poprzedniego badania lub badania akumulacji strukturalnie powiązanej substancji) lub na podstawie pewnych empirycznych związków, wykorzystując znajomość rozpuszczalności w wodzie albo współczynnika podziału n-oktanol/woda substancji badanej (pod warunkiem że wchłanianie przebiega według zasady kinetyki pierwszego rzędu, por. dodatek 5).

Faza wchłaniania powinna trwać 28 dni, chyba że można wykazać, iż stan równowagi został osiągnięty wcześniej (zob. dodatek 1, definicje i jednostki). Stan równowagi zostaje osiągnięty na wykresie stężenia substancji badanej u ryb (C_f) w stosunku do czasu, w momencie gdy krzywa zaczyna biec równoległe do osi czasu, a wyniki trzech kolejnych analiz poziomu C_f przeprowadzonych na próbkach pobranych w co najmniej dwudniowych odstępach będą odbiegały od siebie najwyżej o $\pm 20\%$ oraz między pierwszą a ostatnią analizą nie nastąpi istotny wzrost poziomu C_f . W przypadku próbek zbiorczych należy przeprowadzić co najmniej cztery następujące po sobie analizy. W przypadku substancji badanych o wolnym tempie wchłaniania odstęp czasu pomiędzy analizami powinny wynosić odpowiednio siedem dni. Jeżeli stan równowagi nie zostanie osiągnięty w ciągu 28 dni, wówczas albo oblicza się BCF wyłącznie z zastosowaniem podejścia kinetycznego, które nie jest zależne od osiągnięcia stanu równowagi, albo można przedłużyć fazę wchłaniania, wykonując dalsze pomiary aż do osiągnięcia stanu równowagi albo przez 60 dni, w zależności od tego, których z tych okresów jest krótszy. Również stężenie substancji badanej u ryb pod koniec fazy wchłaniania musi być dostatecznie wysokie, aby można było oszacować w wiarygodny sposób k_2 z fazy wydalania. Jeżeli po upływie 28 dni nie występuje widoczne wchłanianie, badanie można wstrzymać.

Czas trwania fazy wydalania

W przypadku substancji zachowujących się zgodnie z zasadą kinetyki pierwszego rzędu zazwyczaj okres równy połowie trwania fazy wchłaniania wystarczy do odpowiedniego (np. 95-procentowego) obniżenia poziomu skażenia organizmu substancją (wyjaśnienie oszacowania można znaleźć w dodatku 5). Jeżeli czas wymagany do osiągnięcia utraty na poziomie 95 % jest zbyt długi z praktycznego punktu widzenia i przekracza przykładowo dwukrotnie normalny czas trwania fazy wchłaniania (tj. więcej niż 56 dni), można zastosować krótszy okres (np. trwający do momentu, w którym stężenie substancji badanej będzie niższe niż 10-procentowe stężenie w stanie równowagi). Jednak w odniesieniu do substancji, w przypadku których wzorce wchłaniania i wydalania są bardziej złożone niż ma to miejsce w jednokomorowym modelu badania ryb, które odpowiada kinetyce pierwszego rzędu, może być niezbędna dłuższa faza wydalania. Jeżeli obserwowane lub prognozowane są także złożone schematy, zaleca się zasięgnięcie rady specjalisty ds. biostatystyki lub farmakokinetyki w celu prawidłowego skonfigurowania badania. Z chwilą wydłużenia okresu wydalania liczba ryb do pobierania próbek może zacząć stwarzać ograniczenia, a różnice wzrostu między poszczególnymi rybami mogą wpłynąć na wyniki. Okres ten będzie również jednak uwarunkowany okresem, w trakcie którego stężenie substancji badanej w rybach pozostaje na poziomie powyżej analitycznej granicy oznaczalności.

Liczba ryb doświadczalnych

Wybrać taką liczbę ryb przypadającą na każde badanie stężenia, aby w każdym punkcie pobierania próbek dostępne były co najmniej cztery ryby. Ryby powinno się łączyć się tylko wówczas, gdy nie można wykonać analizy analiza pojedynczego osobnika. Jeżeli w zamierzeniu krzywa (i parametry pochodne) ma być dokładniej dopasowana lub wymagane są badania metabolizmu (np. w celu odróżnienia metabolitów od substancji macierzystej w przypadku zastosowania substancji badanych znakowanych izotopem), niezbędna będzie większa liczba ryb w każdym punkcie pobierania próbek. Zawartość lipidów powinna być oznaczana w takim samym materiale biologicznym, jaki jest wykorzystywany dla określania stężenia substancji badanej. W przypadku gdyby okazało się to niemożliwe, mogą być potrzebne dodatkowe ryby (por. pkt 56 i 57).

Jeżeli wykorzystuje się dorosłe ryby (tj. dojrzałe płciowo), nie mogą one być w stanie reprodukcyjnym lub bezpośrednio po tarle (tj. już po złożeniu ikry) ani przed badaniem, ani w jego trakcie. Należy również zgłosić, czy samiec lub samica, lub osobniki obu płci są wykorzystywane w doświadczeniu. W przypadku wykorzystania osobników obu płci przed rozpoczęciem narażania należy udokumentować, że różnice w wielkości i zawartości lipidów są nieistotne, w szczególności jeżeli przewiduje się, że niezbędne będzie łączenie samców i samic, aby zapewnić uzyskanie oznaczalnych stężeń substancji lub oznaczalnej zawartości lipidów.

W każdym badaniu wybiera się ryby o podobnej masie, tak aby masa najmniejszych nie była mniejsza niż dwie trzecie masy największych. Wszystkie ryby powinny należeć do tej samej klasy wiekowej i pochodzić z tego samego źródła. Ponieważ masa i wiek ryby mogą mieć istotny wpływ na wartości BCF (12), te szczegółowe informacje należy precyzyjnie odnotować. Zaleca się zważenie próbki ryb bezpośrednio przed rozpoczęciem badania w celu oszacowania średniej masy (por. pkt 61).

Obciążenie

Należy stosować wysokie odsetki objętości wody do masy ryb, aby ograniczyć do minimum spadek stężenia badanego związku chemicznego w wodzie na skutek dodania ryb na początku badania, a także aby uniknąć obniżenia stężenia rozpuszczonego tlenu. Ważne jest, aby wskaźnik obciążenia był odpowiedni dla zastosowanych gatunków doświadczalnych. W każdym przypadku zaleca się, aby wskaźnik obciążenia pod względem masy ryb do objętości wody wynosił zwykle 0,1–1,0 g ryb (mokra masa) na litr wody na dobę. Zastosowanie wyższych wskaźników obciążenia pod względem masy ryb do objętości wody jest możliwe, jeżeli zostanie wykazane, że wymagane stężenie substancji badanej można utrzymać w granicach $\pm 20\%$ oraz że stężenie rozpuszczonego tlenu nie spada poniżej 60 % nasycenia (por. pkt 24).

Wybierając odpowiednie systemy obciążenia, należy brać pod uwagę normalne siedlisko danego gatunku ryb. Na przykład w porównaniu z rybami pelagicznymi ryby denne mogą wymagać większej powierzchni dna akwarium przy tej samej objętości wody.

Karmienie

W okresach aklimatyzacji i badania należy podawać rybom odpowiedni pokarm o znanej zawartości lipidów i całkowitej zawartości białek ilości wystarczającej do utrzymania ich w dobrym stanie i zachowania masy ciała (dopuszczalny jest pewien wzrost masy ciała). Pokarm należy podawać codziennie przez cały okres aklimatyzacji i badania w ustalonej ilości w zależności od gatunku użytego do badania, warunków doświadczalnych i wartości kalorycznej pokarmu (na przykład w przypadku pstrąga tęczowego w przybliżeniu 1–2 % masy ciała dziennie). Częstotliwość karmienia powinna zostać dobrana w taki sposób, aby nie dopuścić do szybkiego wzrostu i dużego zwiększenia zawartości lipidów. W celu utrzymania takiej samej częstotliwości karmienia ilość pokarmu należy odpowiednio przeliczać – na przykład raz w tygodniu. Do celów takiego przeliczenia masę ciała ryb w każdej komorze badawczej można oszacować na podstawie masy ciała próbki ryb ostatnio pobranej z tej komory. Nie należy ważyć ryb pozostających w komorze.

Paşa, która nie została spożyta, oraz ekskrementy są wybierane metodą syfonowania z komór badawczych bezpośrednio po karmieniu (od 30 minut do 1 godziny). Komory należy utrzymywać w maksymalnej czystości przez okres trwania badania, aby stężenie części organicznych pozostawało na jak najniższym poziomie (por. pkt 29), ponieważ obecność węgla organicznego może ograniczać biodostępność substancji badanej (12).

Ponieważ wiele rodzajów pokarmów wytwarzane jest na bazie mączki rybnej, należy upewnić się, czy pokarm nie będzie miał wpływu na wyniki badania lub nie będzie powodował niekorzystnych skutków, np. na skutek zawartości (śladowych ilości) pestycydów, metali ciężkich lub samej substancji badanej.

Światło i temperatura

Zaleca się fotoperiod wynoszący 12–16 godzin i dostosowanie temperatury ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) do wymagań gatunku doświadczalnego (por. dodatek 3). Rodzaj oraz właściwości oświetlenia powinny być znane. Należy zwrócić uwagę na ewentualną fototransformację substancji badanej w wyniku napromieniowania w warunkach badania. Należy stosować odpowiednie oświetlenie, unikając narażania ryb na działanie nienaturalnych fotoproduktów. W niektórych przypadkach właściwe może być zastosowanie filtra w celu odfiltrowania promieniowania UV poniżej 290 nm.

Badane stężenia

Badanie zostało pierwotnie zaprojektowane pod kątem niepolarnych substancji organicznych. W przypadku substancji tego rodzaju można oczekiwać, że narażenie ryb na pojedyncze stężenie jest wystarczające, ponieważ nie są przewidywane żadne skutki stężenia, chociaż w świetle odnośnych ram regulacyjnych mogą być wymagane dwa stężenia. W przypadku badania substancji nienależących do tej grupy lub jeżeli znane są inne wskazania ewentualnej zależności od stężeń, należy wykonać badanie z wykorzystaniem dwóch lub większej liczby stężeń. W przypadku badania tylko jednego stężenia należy przedstawić uzasadnienie dla zastosowania jednego stężenia (por. pkt 79). Również badane stężenie powinno być, na ile to możliwe w praktyce lub z technicznego punktu widzenia, jak najniższe (tj. niezbliżone do granicy rozpuszczalności).

W niektórych przypadkach można przewidzieć, że biokoncentracja substancji zależy od stężenia w wodzie (np. w przypadku metali, których wchłanianie przez ryby może być co najmniej częściowo regulowane). W takich przypadkach niezbędne jest zbadanie co najmniej dwóch, a najlepiej większej liczby stężeń (por. pkt 49), które są istotne dla środowiska. Również w przypadku substancji, których badane stężenia muszą być zbliżone do granicy rozpuszczalności ze względów praktycznych, zaleca się zbadanie co najmniej dwóch stężeń, ponieważ może to umożliwić uzyskanie wiedzy na temat wiarygodności stężeń ekspozycyjnych. Wybór badanych stężeń powinien obejmować stężenie, które ma realne szanse wystąpienia w środowisku oraz stężenie, które jest istotne dla celu konkretnej oceny.

Stężenia substancji badanej powinny być dobierane w taki sposób, aby nie przekraczały poziomu powodującego długoterminowy wpływ lub 1 % stężenia powodującego asymptotyczne LC_{50} , mieściły się w zakresie realnego występowania w środowisku i były co najmniej jeden rząd wielkości powyżej granicy oznaczalności w wodzie w przypadku zastosowanej metody analitycznej. Najwyższe dopuszczalne badane stężenie można również ustalić, dzieląc 96-godzinne LC_{50} przez odpowiedni stosunek stężenia powodującego ostry stan do stężenia powodującego przewlekły stan (np. odpowiednie wartości tego stosunku w przypadku niektórych substancji wynoszą około trzech, ale w kilku przypadkach przekraczają 100). W przypadku zastosowania drugiego stężenia powinno ono różnić się od podanego powyżej dziesięciokrotnie. Jeżeli nie jest to możliwe ze względu na kryterium toksyczności (które wyznacza górną granicę badanego stężenia) i granicę analityczną (która wyznacza dolną granicę badanego stężenia), można zastosować współczynnik niższy niż dziesięć i wziąć pod uwagę użycie substancji badanej (najwyższej czystości, np. najlepiej > 98 %) znakowanej izotopem. Należy zadbać, aby żadne zastosowane stężenie nie przekraczało granicy rozpuszczalności substancji badanej w ośrodku użytym do badania.

Kontrola

Do serii badań dodatkowo musi być włączona jedna próba kontrolna z wodą rozcieńczającą (por. pkt 30 i 31) lub, w stosownych przypadkach, jedna próba kontrolna z rozpuszczalnikiem.

Częstotliwość pomiarów jakości wody

W trakcie badania należy dokonywać pomiarów rozpuszczonego tlenu, całkowitego węgla organicznego, pH i temperatury we wszystkich naczyniach do badania i naczyniach z próbkami kontrolnymi. W próbach kontrolnych i w jednym naczyniu należy oznaczyć całkowitą twardość i zasadowość (w stosownych przypadkach). W przypadku badania dwóch lub większej liczby stężeń te parametry należy oznaczać przy wysokim (lub najwyższym stężeniu). Poziom rozpuszczonego tlenu oraz zasolenie (w stosownych przypadkach) należy oznaczać co najmniej trzykrotnie – na początku, mniej więcej w połowie i pod koniec fazy wchłaniania – oraz raz w tygodniu w fazie wydalania. Całkowity węgiel organiczny należy oznaczyć na początku badania (24 godziny i 48 godzin przed rozpoczęciem fazy wchłaniania), przed wpuszczeniem ryb oraz co najmniej raz w tygodniu w fazie wchłaniania i wydalania. Temperatura powinna być mierzona codziennie, pH na początku i na końcu każdego okresu, a twardość – raz w ciągu każdego badania. Zaleca się ciągle monitorowanie temperatury co najmniej w jednym pojemniku.

Pobieranie próbek oraz analiza ryb i wody

harmonogram pobierania próbek ryb i wody

Należy pobrać próbkę wody z komór badawczych do oznaczania stężenia substancji badanej przed wpuszczeniem ryb i w trakcie faz wchłaniania i wydalania. Próbkę wody należy pobrać przed podaniem pokarmu jednocześnie z pobraniem próbki ryb. Przydatna może być większa częstotliwość pobierania próbek w celu upewnienia się co do stabilności stężenia po wpuszczeniu ryb. W fazie wchłaniania należy oznaczać stężenia substancji badanej w celu sprawdzenia zgodności z kryteriami ważności (pkt 24). Jeżeli analiza próbki wody na początku fazy wydalania wskazuje, że substancja badana nie została wykryta, można ten wynik wykorzystać jako uzasadnienie dla rezygnacji z pomiarów pod kątem substancji badanej w wodzie użytej do badania i w wodzie próby kontrolnej przez pozostałą część okresu wydalania.

Próbki ryb na potrzeby badania na obecność substancji badanej należy pobrać co najmniej pięciokrotnie w fazie wchłaniania i co najmniej czterokrotnie w fazie wydalania. Ponieważ czasami trudno będzie obliczyć dostatecznie dokładne szacunkowe wartości BCF w oparciu o tę liczbę próbek (zwłaszcza jeśli wskazane są rodzaje kinetyki inne niż prosta kinetyka wchłaniania i wydalania pierwszego rzędu), zalecane byłoby pobieranie próbek w obu fazach z większą częstotliwością (por. dodatek 4).

Zawartość lipidów należy oznaczać co najmniej na początku i na końcu fazy wchłaniania oraz na końcu fazy wydalania w takim samym materiale biologicznym, jaki jest wykorzystywany dla określania stężenia substancji badanej. W przypadku gdyby okazało się to niemożliwe, należy pobrać trzy oddzielne próbki ryb w celu oznaczenia zawartości lipidów w każdym z tych samych trzech punktów czasowych. Stosownie do okoliczności należy skorygować liczbę ryb w zbiorniku na początku doświadczenia ⁽¹⁾. Natomiast w przypadku gdy nie zostaną wykryte istotne ilości substancji badanej w rybach kontrolnych (tj. rybach z populacji podstawowej), ryby kontrolne z badania można poddać analizie tylko na zawartość lipidów i analizę substancji badanej w grupach badanych (oraz powiązaną stałą szybkości wchłaniania, stałą szybkości wydalania i wartości BCF) można korygować pod kątem zmian w trakcie badania zgodnie z zawartością lipidów w grupie kontrolnej ⁽²⁾.

Martwe lub śnięte ryby nie powinny być analizowane pod kątem substancji badanej lub stężenia lipidów.

Przykład dopuszczalnego harmonogramu pobierania próbek jest podany w dodatku 4. Inne plany można łatwo utworzyć na podstawie obliczeń z wykorzystaniem innych wartości K_{ow} przyjmowanych do obliczenia czasu narażenia dla wchłaniania 95 % (obliczenia można znaleźć w dodatku 5).

Pobieranie próbek należy kontynuować w fazie wchłaniania do momentu uzyskania stanu równowagi (zob dodatek 1, definicje i jednostki) lub w przeciwnym razie faza wchłaniania zostaje zakończona (po upływie 28 lub 60 dni, por. pkt 37 i 38). Przed rozpoczęciem fazy wydalania ryby należy przenieść do czystych naczyń.

Pobieranie i przygotowywanie próbek

Próbki wody do analizy należy pobierać na przykład metodą syfonowania przez przewód rurowy z obojętnego chemicznie materiału w centralnym punkcie komory badawczej. Nie zawsze można oddzielić część substancji badanej, która nie jest biodostępna, od części biodostępnej w drodze filtrowania albo odwirowywania. W razie trudności z biodostępnością w przypadku danej techniki oddzielania należy zawsze podać w sprawozdaniu z badania uzasadnienie techniki oddzielania lub jej walidację (25). W szczególności w odniesieniu do substancji hydrofobowych (tj. substancji o $\log KOW > 5$) (12) (26), w przypadku których mogłaby występować adsorpcja na materiale filtracyjnym lub w pojemniku wirówki, nie należy poddawać próbek takiej obróbce. Zamiast tego należy prowadzić pomiary w celu utrzymania zbiorników w jak największej czystości (por. pkt 46) i monitorować całkowity węgiel organiczny w fazach wchłaniania i wydalania (por. pkt 53). W celu uniknięcia ewentualnych problemów z obniżoną biodostępnością można, w przypadku substancji o słabej rozpuszczalności i wysokiej hydrofobowości, zastosować techniki mikroekstrakcji do fazy stałej.

⁽¹⁾ Jeżeli zawartość lipidów nie jest oznaczana u tych samych ryb co substancja badana, ryby powinny mieć co najmniej podobną masę ciała i być tej samej płci (w stosownych przypadkach).

⁽²⁾ To drugie rozwiązanie jest ważne tylko w przypadku gdy ryby we wszystkich grupach badanych są trzymane w grupach osobników o podobnych wymiarach, są usuwane według tego samego wzorca i karmione w taki sam sposób. W ten sposób zapewnia się podobny wzrost ryb we wszystkich grupach badanych, jeżeli badane stężenie jest niższe od zakresu toksyczności. W przypadku podobnego wzrostu masy ciała można oczekiwać, że zawartość lipidów również będzie podobna. Inny wzrost masy ciała w grupie kontrolnej wskazywałby na wpływ substancji i powodowałby nieważność badania.

Ryby, z których pobiera się próbki, należy bezzwłocznie uśmiercić, stosując najodpowiedniejszą metodę (w przypadku mierzenia ryby w całości nie należy wykonywać żadnych innych czynności poza opłukaniem w wodzie (por. pkt 28) i osuszeniem na bibule). Należy zważyć ryby i zmierzyć ich długość całkowitą⁽¹⁾. Dane dotyczące masy i długości każdej ryby należy powiązać ze stężeniem analizowanej substancji (i w stosownych przypadkach zawartością lipidów), na przykład przy użyciu indywidualnego kodu identyfikacyjnego w odniesieniu każdej ryby z próby.

Preferowane jest wykonanie analizy ryby i wody bezzwłocznie po pobraniu próbek, aby zapobiec degradacji lub innym stratom oraz aby obliczyć średnie stałe szybkości wchłaniania i wydalania w miarę upływu czasu badania. Bezpośrednia analiza pozwala również uniknąć opóźnień w osiągnięciu plateau (stanu równowagi).

Jeśli analizy nie wykonuje się bezzwłocznie, próbki należy przechowywać z zastosowaniem odpowiedniej metody. Przed przystąpieniem do badania należy uzyskać informacje na temat właściwej metody przechowywania danej substancji badanej – na przykład stosując głębokie mrożenie, przechowywanie w temperaturze 4 °C, ekstrakcję itd.. Czas przechowywania należy dobrać w taki sposób, aby substancja nie uległa rozkładowi w trakcie przechowywania.

Jakość metody analitycznej

Ze względu na to, że cała procedura jest uzależniona głównie od dokładności, precyzji i czułości metody analitycznej wykorzystywanej w odniesieniu do substancji badanej, należy doświadczalnie sprawdzić, czy dokładność, precyzja oraz odtwarzalność analizy substancji, jak również odzysk substancji badanej zarówno z wody, jak i z ryb są wystarczające w przypadku danej metody. Należy to wykonać w ramach badań wstępnych. Należy również sprawdzić, czy substancja badana nie jest wykrywalna w użytej wodzie rozcieńczającej. W razie potrzeby należy skorygować wartości stężenia substancji badanej w wodzie i rybach uzyskanych w badaniu pod kątem odzysku i wartości tła prób kontrolnych. Przez ten czas z próbkami ryb i wody należy postępować w taki sposób, aby zminimalizować zanieczyszczenie i utratę (np. wynikające z adsorpcji przez urządzenie do pobierania próbek).

Analiza próbek ryb

Jeżeli w badaniu wykorzystywane są substancje znakowane izotopem, można wykonać analizę pod kątem całkowitego znakowania izotopem (np. substancja macierzysta i metabolity) lub można oczyścić próbki, tak aby wykonać analizę substancji macierzystej oddzielnie. Jeżeli BCF ma być oparte na substancji macierzystej, należy scharakteryzować główne metabolity przynajmniej pod koniec fazy wchłaniania (por. pkt 6). Do głównych metabolitów zaliczane są te metabolity, które stanowią $\geq 10\%$ całkowitych pozostałości w tkance ryb, metabolity, które stanowią $\geq 5\%$ w dwóch kolejnych punktach pobierania próbek, metabolity, których poziomy wzrastają w trakcie fazy wchłaniania, oraz metabolity, których znane toksyczne działanie budzi niepokój. Jeżeli BCF dla całej ryby pod względem całkowitych pozostałości znakowanych izotopem jest ≥ 500 , zalecane byłoby – a w przypadku niektórych kategorii substancji, takich jak pestycydy, zdecydowanie zalecane – zidentyfikowanie i oznaczenie ilościowe głównych metabolitów. Niektóre organy regulacyjne mogą wymagać ilościowego oznaczenia takich metabolitów. Jeżeli w tkance ryby zidentyfikowano i oznaczono ilościowo produkty rozpadu stanowiące $\geq 10\%$ całkowitych pozostałości znakowanych izotopem, zaleca się wówczas również identyfikację i oznaczenie ilościowe produktów rozpadu w wodzie użytej do badania. Jeżeli nie jest to wykonalne, należy podać wyjaśnienie w sprawozdaniu.

Stężenie substancji badanej powinno zazwyczaj być oznaczane w odniesieniu do każdej indywidualnie ważonej ryby. Jeśli nie jest to możliwe, można połączyć wszystkie próbki podczas każdego pobierania próbek, ale ogranicza to procedury statystyczne, które mogą mieć zastosowanie do danych, w związku z czym badanie musi obejmować odpowiednią liczbę ryb, aby uwzględnić żądane połączenie, procedurę statystyczną i moc statystyczną. Jako wprowadzenie do odpowiednich procedur łączenia mogą posłużyć pozycje (27) i (28) bibliografii.

⁽¹⁾ Poza masą ciała należy rejestrować całkowitą długość, ponieważ porównanie zakresu wzrostu długości, jaki miał miejsce w trakcie badania, stanowi dobry wskaźnik wystąpienia niekorzystnego skutku.

Poza BCF uzyskanym bezpośrednio na podstawie badania (por. pkt 21) BCF należy wyrażać w znormalizowanej postaci w stosunku do ryby o zawartości lipidów wynoszącej 5 % (na podstawie mokrej masy), chyba że można przyjąć, że substancja badana nie akumuluje się głównie w lipidach. Jeżeli jest to możliwe, zawartość lipidów należy oznaczać przy każdym pobraniu próbki, najlepiej w tym samym ekstrakcie, którego użyto do analizy badanej substancji chemicznej, ponieważ lipidy często muszą być usuwane z ekstraktu przed jego analizą chromatograficzną. Analiza substancji badanych często jednak wymaga stosowania specjalnych procedur ekstrakcji, które mogą być sprzeczne w metodami badawczymi pod kątem oznaczania lipidów. W takim przypadku (dopóki nie staną się dostępne nieniszczące metody instrumentalne) zaleca się stosowanie innej strategii do oznaczania zawartości lipidów w rybach (por. pkt 56). Do oznaczenia zawartości lipidów należy zastosować odpowiednie metody (20). Można zalecić technikę ekstrakcji chloroformem/metanolem (29) jako standardową (30), ale jako technikę alternatywną zaleca się stosowanie metody Smedesa (31). Ta metoda charakteryzuje się porównywalną skutecznością ekstrakcji, wysoką dokładnością, stosowaniem mniej toksycznych rozpuszczalników organicznych i łatwością wykonania. Można stosować inne metody o dokładności porównywalnej do zalecanych metod, jeżeli zostaną odpowiednio uzasadnione. Ważne jest podanie szczegółowych informacji na temat zastosowanej metody.

Pomiar wzrostu ryb

Na początku badania należy zważyć oddzielnie pięć do dziesięciu ryb z populacji i zmierzyć ich długość. Mogą to być te same ryby, które zostaną użyte do analizy lipidów (por. pkt 56). Przed wykonaniem analizy chemicznej lub analizy lipidów należy zmierzyć masę i długość of ryb użytych do każdego pobrania próbek z grup badanych i kontrolnych. Pomiar tych próbek ryb można wykorzystać do oszacowania masy i długości ryb pozostających w zbiornikach badawczych i kontrolnych (por. pkt 45).

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

Należy wykreślić krzywą wchłaniania substancji badanej, nanosząc na wykresie jej stężenia w/na rybach (lub określonych tkankach) w fazie wchłaniania w stosunku do czasu na skali arytmetycznej. Jeśli krzywa osiągnęła *plateau*, tj. stała się w przybliżeniu asymptotyczna do osi czasu, BCF w stanie równowagi (BCF_{ss}) należy obliczyć ze wzoru:

$$\frac{C_f \text{ w stanie równowagi (średnie)}}{C_w \text{ w stanie równowagi (średnie)}}$$

Na zwiększenie się C_f może mieć wpływ wzrost ryb (por. pkt 72 i 73). Na średnie stężenie ekspozycyjne (C_w) ma wpływ zmienność w czasie. Można oczekiwać, średnia ważona stężenia w czasie będzie odpowiedniejsza i precyzyjniejsza do celów badań bioakumulacji, nawet jeżeli zmienność mieści się w odpowiednim zakresie ważności (por. pkt 24). Średnią ważoną w czasie stężenia w wodzie można obliczyć zgodnie z dodatkiem 5 sekcja 1.

Kinetyczny współczynnik biokoncentracji (BCF_k) należy oznaczyć jako stosunek k_1/k_2 , tj. obu kinetycznych stałych szybkości reakcji pierwszego rzędu. Stałe szybkości reakcji k_1 i k_2 oraz BCF_k można uzyskać przez jednoczesne dostosowanie fazy wchłaniania i wydalania. Alternatywnie można oznaczyć k_1 i k_2 sekwencyjnie (zob. opis i porównanie tych metod w dodatku 5). Stała szybkości wydalania (k_2) może wymagać korekty o rozcieńczenie wynikające ze wzrostu (por. pkt 72 i 73). Jeśli krzywa wchłaniania/wydalania zdecydowanie nie jest krzywą pierwszego rzędu, wówczas należy zastosować bardziej złożone modele (zob. bibliografia w dodatku 5) i zasięgnąć rady specjalisty ds. biostatystyki lub farmakokinetyki.

Dane na temat masy/długości ciała ryb

Mokre masy i całkowite długości ciała poszczególnych ryb na każdym etapie pobierania próbek są zestawiane w tabelach oddzielnie dla grup badanych i kontrolnych w fazie wchłaniania (w tym podstawowej populacji w odniesieniu do początku wchłaniania) i w fazie wydalania. Zmierzone masy i długości każdej ryby należy powiązać ze stężeniem analizowanej substancji chemicznej, wykorzystując na przykład w tym celu indywidualny kodu identyfikacyjny w odniesieniu każdej ryby z próby. Masa ciała jest preferowaną miarą wzrostu do celów korygowania kinetycznych wartości BCF o rozcieńczenie wynikające ze wzrostu (zob. metoda stosowana do korygowania danych o rozcieńczeniu wynikające ze wzrostu określona w pkt 73 i dodatku 5).

Korekta rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu and normalizacja lipidów

Na skutek wzrostu ryb w fazie wydalania mierzone stężenia substancji chemicznej w rybach mogą ulegać zmniejszeniu, w wyniku czego ogólna stała szybkości wydalania (k_2) będzie większa niż wynikałoby to z samych tylko procesów usuwania (np. oddychania, metabolizmu, wydalania). Należy dokonać korekty kinetycznych współczynników biokoncentracji pod kątem rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu. Wzrost będzie miał również wpływ na wartość BCF_{SS} , ale nie istnieją żadne uzgodnione procedury w zakresie korekty BCF_{SS} pod kątem wzrostu. W przypadkach znacznego wzrostu należy również wyprowadzić BCF_k skorygowany pod kątem wzrostu (BCF_{kg}), ponieważ może on być znacznie istotniejszą miarą współczynnika biokoncentracji. Zawartość lipidów w rybach doświadczalnych (ściśle związana z bioakumulacją substancji hydrofobowych) może ulegać w praktyce takim zmianom, że niezbędna jest normalizacja do ustalonej zawartości lipidów w rybie (5 % w/w) w celu przedstawienia współczynników biokoncentracji kinetycznych i w stanie równowagi w znaczący sposób, chyba że można przyjąć, iż substancja badana nie kumuluje się głównie w lipidach (np. niektóre substancje perfluorowane mogą wiązać się z białkami). Równania i przykłady obliczeń można znaleźć w dodatku 5.

W celu skorygowania kinetycznego BCF pod kątem rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu, należy skorygować stałą szybkości wydalania pod kątem wzrostu. Stałą szybkości skorygowaną pod kątem wzrostu (k_{2g}) oblicza się, odejmując stałą szybkości wzrostu (k_p , uzyskaną na podstawie danych z pomiaru masy ciała), od ogólnej stałej szybkości wydalania (k_2). Następnie oblicza się skorygowany pod kątem wzrostu kinetyczny współczynnik biokoncentracji, dzieląc stałą szybkości wchłaniania (k_1) przez skorygowaną pod kątem wzrostu stałą szybkości wydalania (k_{2g}) (por. dodatek 5). W pewnych przypadkach taka metoda zawodzi. Na przykład w przypadku substancji badanych o bardzo niskiej szybkości wydalania u szybko rosnących ryb wartość wyprowadzonej k_{2g} może być bardzo niska, a tym samym błąd w obu stałych szybkości, na podstawie których wyprowadzono tę wartość, osiąga poziom krytyczny i w niektórych przypadkach szacunkowa wartość k_g może być wyższa niż k_2 . Alternatywne podejście, które pozwala pominąć potrzebę korekty o rozcieńczenie wynikające ze wzrostu, polega na wykorzystaniu danych dotyczących masy substancji badanej przypadającej na wydalanie pojedynczej ryby (na podstawie całej ryby) zamiast normalnych danych dotyczących masy substancji badanej przypadającej na jednostkę masy ryb (stężenie). Można to łatwo osiągnąć, ponieważ zgodnie z tą metodą badawczą badania powinny wiązać zapisane stężenia w tkance z masą ciała poszczególnych ryb. Prostą procedurę umożliwiającą osiągnięcie tego celu przedstawiono w dodatku 5. Należy zwrócić uwagę, że k_2 musi zostać zgłoszone nawet w przypadku stosowanie tej alternatywnej metody.

Należy również zgłosić współczynniki biokoncentracji kinetyczne i w stanie równowagi w odniesieniu do domyślnej zawartości lipidów u ryb wynoszącej 5 % (w/w), chyba że istnieją podstawy, by sądzić, że substancja badana nie gromadzi się głównie w lipidach. Dane dotyczące koncentracji w rybach, czyli BCF, są normalizowane zgodnie ze wskaźnikiem mieszczącym się w granicach od 5 % do rzeczywistej (indywidualnej) średniej zawartości lipidów (w % mokrej masy) (por. dodatek 5).

Jeżeli analizę chemiczną i analizę lipidów wykonywano u tej samej ryby, wówczas należy wykorzystać znormalizowane dane dotyczące lipidów danej ryby do obliczenia BCF znormalizowanego pod kątem lipidów. Ewentualnie, jeżeli wzrost u ryb kontrolnych i u ryb narażonych na działanie substancji jest podobny, do celów korekty lipidów można zastosować tylko zawartość lipidów u ryb kontrolnych (por. pkt 56). Metodę obliczania BCF przy znormalizowanym poziomie lipidów przedstawiono w dodatku 5.

Interpretacja wyników

Wyniki badania należy ostrożnie interpretować, w przypadku gdy mierzone stężenia roztworów do badań występują na poziomach zbliżonych do granicy wykrywalności metody analitycznej.

Aby można było wykluczyć występowanie efektów toksycznych, średni wzrost zarówno w badanej grupie, jak i w grupie kontrolnej nie powinien się zasadniczo znacząco różnić. Należy porównać stałe szybkości wzrostu lub krzywe wzrostu obu grup, stosując stosowną procedurę (¹).

(¹) Można wykonać test t-Studenta na stałych szybkości wzrostu, aby zbadać, czy istnieje różnica w zakresie wzrostu między grupą kontrolną a grupą badaną, lub test F w przypadku analizy wariancji. W razie konieczności można zastosować test F lub test ilorazu wiarygodności, które będą pomocne przy wyborze odpowiedniego modelu wzrostu (monografia OECD nr 54, (32)).

Jasno określone krzywe wchłaniania i wydalania wskazują na dobrej jakości dane o biokoncentracji. W odniesieniu do stałych szybkości, aby można je było uznać za niezawodne, wynik testu zgodności χ^2 powinien wykazać dobre dopasowanie (tj. mały odsetek błędu pomiaru (32)) w przypadku modelu bioakumulacji, (por. dodatek 5). Jeżeli stosuje się więcej niż jedno badane stężenie, różnica między stałymi wchłaniania/wydalania pomiędzy badanymi stężeniami powinna być mniejsza niż 20 % (¹). W przeciwnym razie można wskazać zależność od stężenia. Należy odnotować zaobserwowane różnice dotyczące stałych szybkości wchłaniania/wydalania między zastosowanymi badanymi stężeniami oraz podać możliwe wyjaśnienia. Zasadniczo 95-procentowa granica ufności w przypadku BCF dobrze zaplanowanych badań jest bliska ± 20 % otrzymanego BCF.

W przypadku badania co najmniej dwóch stężeń wyniki obydwu lub wszystkich stężeń stosuje się do zbadania spójności wyników i do wykazania czy są one zależne od stężenia. W przypadku badania tylko jednego stężenia w celu ograniczenia wykorzystania zwierząt lub zasobów, należy przedstawić uzasadnienie dla zastosowania jednego stężenia.

Uzyskany BCF_{SS} jest wątpliwy w przypadku, gdy BCF_K jest znacznie wyższy niż BCF_{SS} , gdyż może to wskazywać, że nie osiągnięto stanu równowagi lub że nie uwzględniono procesów rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu ani procesu utraty. W przypadkach, w których BCF_{SS} jest znacznie wyższy od BCF_K , należy sprawdzić wyprowadzone stałe szybkości wchłaniania i wydalania pod kątem błędów i dokonać ich ponownej oceny. Poprawę szacunków BCF_K można uzyskać dzięki innej procedurze dopasowania (por. dodatek 5).

Sprawozdanie z badania

Poza informacjami na temat substancji badanej, o których mowa w pkt 3, sprawozdanie z badania zawiera następujące informacje:

Substancja badana:

właściwości fizyczne oraz, w odpowiednich przypadkach, właściwości fizykochemiczne;

- dane identyfikacyjne substancji chemicznej takie jak nazwa Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC) lub nazwa CAS, numer CAS, identyfikator SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne itp. (w tym w stosownych przypadkach zawartość węgla organicznego);
- w przypadku substancji wieloskładnikowych i UVCB (substancji chemicznych o nieznanym lub zmiennym składzie, złożonych produktów reakcji lub materiałów biologicznych) w miarę możliwości opis nazwy chemicznej poszczególnych składników oraz, w odniesieniu do każdego z nich, odsetek jaki stanowią w całkowitej masie substancji. Należy przedstawić podsumowanie w jaki sposób metoda analityczna zastosowana w badaniu odzwierciedla pomiar stężenia substancji; należy opisać wszystkie procedury analityczne, w tym dokładność metody, granicę wykrywalności metody i granicę oznaczalności;
- w przypadku substancji znakowanych izotopem dokładne położenie znakowanego atomu (znakowanych atomów) oraz wartość procentową promieniotwórczości związanej z zanieczyszczeniami;
- informacje na temat toksyczności substancji badanej dla ryby (w idealnych warunkach dla gatunku doświadczalnego). Należy zgłosić toksyczność jako ostrą 96 h LC_{50} oraz wartości NOAEC i LOAEC otrzymane w ramach badania toksyczności przewlekłej (tj. badania przeprowadzanego we wczesnym stadium życia lub badania prowadzonego podczas całego cyklu życia, o ile są dostępne).
- warunki składowania badanej substancji chemicznej lub substancji badanej i stabilność badanej substancji chemicznej lub substancji badanej w warunkach składowania, jeżeli przed zastosowaniem podlega składowaniu.

Gatunek doświadczalny:

Nazwa systematyczna, odmiana, źródło, jakakolwiek obróbka wstępna, aklimatyzacja, wiek, płeć (w stosownych przypadkach), zakres rozmiarów (masa i długość) itp.

(¹) Takie wartości procentowe pozwalają na założenie, że metody analityczne są niezawodne, a okres połowicznego zaniku wynosi < 14 dni. Jeżeli metody analityczne są w mniejszym stopniu niezawodne lub okres połowicznego zaniku jest (znacznie) dłuższy, wartości te wzrastają.

Warunki badania:

- wykorzystana procedura badawcza (np. przepływowa lub półstatyczna); regularne badanie lub plan zminimalizowany (w tym przesłanki i uzasadnienie);
- rodzaj i właściwości stosowanego oświetlenia i fotoperiodu(-ów);
- plan badania (np. liczba i rozmiar komór badawczych, szybkość wymiany objętości wody, wskaźnik obciążenia, liczba kontrprób, liczba ryb przypadających na kontrpróbę, liczba badanych stężeń, długość faz wchłaniania i wydalania, częstotliwość pobierania próbek ryb i wody);
- metoda przygotowania roztworów podstawowych i częstotliwość ich wymiany (w przypadku zastosowania rozpuszczalnika należy podać jego rodzaj i stężenie, a także jego wpływ na zawartość węgla organicznego w wodzie użytej do badania) lub opis alternatywnego systemu dawkowania;
- badane stężenia nominalne, średnie wartości pomiarowych i ich odchylenia standardowe w naczyniach badawczych oraz metoda uzyskania takich wartości i częstotliwość pomiaru;
- źródło wody rozcieńczającej, opis jakiegokolwiek obróbki wstępnej, wyniki przeprowadzenia dowodu na zdolność ryb doświadczalnych do życia w wodzie oraz właściwości wody: pH, twardość, temperatura, stężenie rozpuszczonego tlenu, poziom chloru resztkowego, (jeśli dokonano pomiaru), całkowity węgiel organiczny, zawiesina, zasolenie ośrodka badawczego (w stosownych przypadkach) oraz wszelkie inne wykonane pomiary;
- jakość wody w naczyniach badawczych, pH, twardość, całkowity węgiel organiczny, temperatura oraz stężenie rozpuszczonego tlenu; stosowane metody i częstotliwość pomiaru;
- szczegółowe informacje dotyczące karmienia, np. rodzaj pokarmu(-ów), jego źródło, skład (w miarę możliwości przynajmniej zawartość lipidów i białka), wybrany wskaźnik żywieniowy, ilość podawanego pokarmu i częstotliwość karmienia);
- informacje dotyczące poddania działaniu substancji chemicznej próbek ryb i wody, w tym szczegółowe informacje dotyczące przygotowania, składowania, ekstrakcji oraz procedur analitycznych (i dokładności) w odniesieniu do substancji badanej i zawartości lipidów;
- metody stosowane do randomizacji podawania substancji chemicznej i przypisywania ryb do naczyń badawczych;
- data wprowadzenia organizmów doświadczalnych do roztworów do badań oraz czas trwania badania;
- opis badania ustalającego zakres oraz wyników, jeżeli są dostępne.

Wyniki:

- wyniki z wszelkich przeprowadzonych badań wstępnych;
- upadkowość ryb kontrolnych oraz ryb w każdej komorze narażenia oraz wszelkie inne zaobserwowane nietypowe zachowania;
- informacje dotyczące jakichkolwiek zaobserwowanych niekorzystnych skutków;
- pełen opis wszystkich stosowanych procedur analizy substancji chemicznej, w tym granice wykrywalności i oznaczenie ilościowe, zmienność i ustanie działania substancji;
- zawartość lipidów u ryb, w tym zastosowane metody, oraz współczynnik normalizacji lipidów (L_n , współczynnik służący wyrażeniu wyniku związanego z zawartością lipidów u ryb wynoszącego 5 %), jeżeli go wyznaczono;
- zestawione dane tabelaryczne dotyczące masy (i długości) ryb powiązane z poszczególnymi stężeniami substancji chemicznej (i w stosownych przypadkach zawartością lipidów), zarówno w odniesieniu do grupy kontrolnej, jak i grupy narażonej na działanie substancji chemicznej (na przykład przy użyciu indywidualnych identyfikatorów w przypadku każdej ryby z próby) oraz obliczenia dotyczące wyprowadzonej(-ych) stałej(-ych) szybkości wzrostu;
- zestawione w postaci tabeli dane dotyczące stężenia substancji badanej u ryb (C_p , powiązane z poszczególnymi rybami) i w wodzie (C_w) (w stosownych przypadkach wraz z wartościami średniej dla grupy badanej i grupy kontrolnej, odchyleniem standardowym oraz zakresem) w odniesieniu do wszystkich okresów pobierania próbek (C_f wyrażone w mg/kg mokrej masy całego ciała lub jego określonych tkanek, np. lipidów, oraz C_w wyrażone w mg/l). Wartości C_w w odniesieniu do serii prób kontrolnych (należy zgłosić również tło);

- krzywe (w tym wszystkie zmierzone dane) wskazujące następujące wartości (w stosownych przypadkach stężenia można wyrazić w odniesieniu do całego ciała, a zawartość lipidów znormalizować do 5 % zwierzęcia lub jego określonych tkanek):
 - wzrost, tj. masa ryby w stosunku do czasu lub logarytm naturalny zmienionej masy w stosunku do czasu (w tym wyprowadzona stała szybkości wzrostu k_g);
 - wchłanianie i wydalanie substancji badanej u ryby (na jednym wykresie);
 - czas potrzebny do osiągnięcia stanu równowagi (jeżeli został osiągnięty);
 - logarytm naturalny zmienionego stężenia w stosunku do czasu wchłaniania (w tym wyznaczona stała szybkości wchłaniania k_1);
 - logarytm naturalny zmienionego stężenia (ln stężenia) w stosunku do czasu wydalania (w tym wyznaczona stała szybkości wydalania k_2); oraz
 - krzywe fazy wchłaniania i fazy wydalania wskazujące zarówno dane, jak i dopasowany model;
- jeżeli kontrola wizualna wykresu wykazuje oczywiste wartości odstające, można zastosować statystycznie ważny test na wartość odstającą w celu usunięcia błędnych punktów danych, a także przedstawić udokumentowane uzasadnienie ich pominięcia;
- współczynnik biokoncentracji w stanie równowagi (BCF_{ss}), jeżeli osiągnięto (prawie) stan równowagi;
- kinetyczny współczynnik biokoncentracji (BCF_k) i wyznaczone stałe szybkości wchłaniania i wydalania k_1 oraz k_2 , wraz z wariancjami w k_2 (nachylenie i punkt przecięcia), jeżeli zastosowano dopasowanie sekwencyjne;
- granice ufności, odchylenie standardowe (w miarę dostępności) i metody obliczania / analizy danych w odniesieniu do każdego z parametrów dotyczących każdego stężenia stosowanej substancji badanej;
 - wszelkie informacje dotyczące metabolitów substancji badanych znakowanych izotopem i ich nagromadzenia;
 - stała/stałe szybkości wzrostu (w tym 95 % przedziału/przedziałów ufności) i obliczona stała szybkości wydalania skorygowana pod kątem wzrostu (k_{2g}), okres półtrwania i wartości BCF (BCF_{kg});
 - wszystko, co odbiega od normy, jeżeli chodzi o badanie, wszelkie odchylenia od tych procedur oraz wszelkie inne ważne informacje;
- tabela podsumowująca zawierająca istotne zmierzone i policzone dane, jak przedstawiono poniżej:

Stałe szybkości wchłaniania i wydalania oraz współczynniki biokoncentracji (BCF) dotyczące substancji	
k_g (stała szybkości wzrostu; dzień ⁻¹):	podać wartość (95 % CI) ⁽¹⁾
k_1 (ogólna stała szybkości wchłaniania; l kg ⁻¹ dzień ⁻¹):	podać wartość (95 % CI) ⁽¹⁾
k_2 (ogólna stała szybkości wydalania; dzień ⁻¹):	podać wartość (95 % CI) ⁽¹⁾
k_{2g} (stała szybkości wydalania skorygowana pod kątem wzrostu; dzień ⁻¹):	podać wartość (95 % CI) ⁽¹⁾
C_f (stężenie substancji chemicznej u ryby w stanie równowagi; mg kg ⁻¹):	podać wartość ± SD ⁽²⁾
C_w (stężenie substancji chemicznej w wodzie; mg l ⁻¹):	podać wartość ± SD ⁽²⁾
L_n (współczynnik normalizacji lipidów):	podać wartość ⁽³⁾

Stałe szybkości wchłaniania i wydalania oraz współczynniki biokoncentracji (BCF) dotyczące substancji	
BCF _{SS} (BCF w stanie równowagi; l kg ⁻¹)	podać wartość ± SD ⁽²⁾
BCF _{SSL} (BCF przy znormalizowanym poziomie lipidów w stanie równowagi; l kg ⁻¹):	podać wartość ⁽³⁾ ± SD ⁽²⁾
BCF _k (kinetyczny BCF; l kg ⁻¹)	podać wartość (95 % CI) ⁽¹⁾
BCF _{kg} (kinetyczny BCF skorygowany pod kątem wzrostu; l kg ⁻¹)	podać wartość (95 % CI) ⁽¹⁾
t _{1/2g} (okres półtrwania skorygowany pod kątem wzrostu; dzień):	podać wartość (95 % CI) ⁽¹⁾
BCF _{KL} (kinetyczny BCF przy znormalizowanym poziomie lipidów; l kg ⁻¹):	podać wartość
BCF _{KL,G} (kinetyczny BCF przy znormalizowanym poziomie lipidów skorygowany pod kątem wzrostu; l kg ⁻¹):	podać wartość

⁽¹⁾ CI: przedział ufności (jeżeli można go oszacować)
⁽²⁾ SD: odchylenie standardowe (jeżeli można je oszacować)

Przy opracowywaniu wstępnej metody badawczej i planu badania należy unikać zgłaszania wyników jako „nie wykryto / oznaczono ilościowo na granicy wykrywalności / oznaczenia ilościowego”, gdyż wyników takich nie można użyć do obliczania stałych szybkości.

C.13 – II: Zminimalizowane badanie narażenia drogą wodną u ryb

WPROWADZENIE

Z coraz większego doświadczenia zdobywanego podczas prowadzenia i interpretacji pełnych badań, zarówno przez laboratoria, jak i organy regulacyjne, wynika, że, z pewnymi wyjątkami, kinetykę pierwszego rzędu stosuje się do szacowania stałych szybkości wchłaniania i wydalania. W związku z tym stałe szybkości wchłaniania i wydalania można oszacować przy minimalnej liczbie punktów pobierania próbek i wprowadzonym kinetycznym BCF.

Wstępnym celem analizowania alternatywnych planów badań BCF było opracowanie okrojonego badania, które miało być stosowane na pośrednim etapie badania w celu obalenia lub potwierdzenia szacunków BCF opierających się na K_{OW} i QSAR, a więc wyeliminowanie konieczności przeprowadzenia pełnego badania w odniesieniu do wielu substancji oraz zminimalizowanie kosztów i wykorzystywania zwierząt poprzez zmniejszenie liczby prób i liczby przeprowadzanych sekwencji analitycznych. Postępując zgodnie z głównym planem wcześniejszej metody badawczej, aby pozwolić na integrację wyników badania z istniejącymi danymi dotyczącymi BCF i aby ułatwić prowadzenie badania i interpretację danych, dążono do zapewnienia dostatecznie dokładnych i precyzyjnych szacunków BCF na potrzeby podejmowania decyzji dotyczących oceny ryzyka. Wiele takich względów ma zastosowanie tak samo jak w przypadku pełnego badania, np. kryteria ważności (por. pkt 24) i zatrzymanie badania, w przypadku gdy zaobserwowano nieznaczne wchłanianie pod koniec fazy wchłaniania (por. pkt 16 i 38).

Substancje kwalifikujące się do planu badania zminimalizowanego powinny należeć do ogólnej dziedziny, dla której opracowano niniejszą metodę badawczą, tj. do niepolarnych substancji organicznych (por. pkt 49). W przypadku jakichkolwiek wskazań, że substancja, która ma stanowić przedmiot badania, może wykazywać inne zachowanie (np. wyraźne odchylenie od kinetyki pierwszego rzędu), do celów regulacyjnych należy przeprowadzić pełne badanie.

Badania zminimalizowanego nie prowadzi się zazwyczaj przez krótszy okres niż standardowe badanie na BCF, wykorzystuje się w nim jednak mniej prób ryb (zob. dodatek 6 w kwestii uzasadnienia). W przypadku substancji, które szybko ulegają wydalaniu, można jednak skrócić okres wydalania, aby uniknąć spadku stężenia u ryby poniżej granicy wykrywalności / oznaczalności ilościowej przed końcem badania. Zminimalizowane badanie narażenia ryb z wykorzystaniem jednego stężenia można stosować w celu określenia potrzeby przeprowadzenia pełnego badania, przy czym jeżeli uzyskane dane zastosowane do obliczenia stałych szybkości i BCF są rzetelne (por. pkt 93), można odstąpić od pełnego badania, pod warunkiem że uzyskany BCF jest daleki od regulacyjnych problematycznych wartości.

W niektórych przypadkach korzystne może być przeprowadzenie planu badania zminimalizowanego z więcej niż jednym badanym stężeniem jako badania wstępnego w celu określenia, czy szacunki BCF w odniesieniu do substancji są zależne od stężenia. Jeżeli wartości szacunkowe BCF z badania zminimalizowanego wykazują zależność od stężenia, konieczne będzie przeprowadzenie pełnego badania. Jeżeli w oparciu o takie badanie zminimalizowane wartości szacunkowe BCF nie są zależne od stężenia, lecz wyników nie uznaje się za ostateczne, wówczas można przeprowadzić ewentualne późniejsze pełne badanie z zastosowaniem jednego stężenia, ograniczając w ten sposób wykorzystanie zwierząt w porównaniu do pełnego badania przy (co najmniej) dwóch stężeniach.

Substancje potencjalnie kwalifikujące się do badania zminimalizowanego powinny:

- z dużym prawdopodobieństwem wykazywać przybliżoną kinetykę pierwszego rzędu w odniesieniu do wchłaniania i wydalania, np. uzyskaną z przekroju z podobnymi substancjami;
- posiadać $\log K_{ow} < 6$, chyba że spodziewa się szybkiego metabolizmu ⁽¹⁾;
- być w wystarczającym stopniu rozpuszczalne w wodzie w odniesieniu do techniki analitycznej (por. pkt 24);
- umożliwiać jasne oznaczenie ilościowe (tj. stężenia powinny być co najmniej jeden rząd wielkości powyżej granicy oznaczalności) zarówno w przypadku ryb, jak i wody, zaleca się znakowanie markerem promieniotwórczym (por. pkt 23); oraz
- mieć dłuższy okres wydalania niż przewidywany okres półtrwania (por. dodatek 5 w odniesieniu do obliczania) lub okres wydalania powinien być odpowiednio dostosowany (por. pkt 91). Dopuszcza się wyjątek od tej zasady, w przypadku gdy oczekiwany jest szybki metabolizm substancji.

HARMONOGRAM POBIERANIA PRÓBEK W BADANIACH PROWADZONYCH ZGODNIE Z PLANEM ZMINIMALIZOWANYM

Pobieranie próbek ryb

Pobieranie próbek ryb ogranicza się do czterech punktów pobierania próbek:

- w środku i na końcu fazy wchłaniania (z których drugi punkt stanowi jednocześnie początek wydalania), np. po 14 i 28 dniach (33);
- w środku fazy wydalania i na zakończenie badania (gdy stężenie substancji wynosi < 10 % maksymalnego stężenia lub co najmniej wyraźnie po jednym okresie półtrwania substancji), np. po 7 i 14 dniach wydalania (33). Jeżeli jest spodziewane szybkie wydalanie lub takie zaobserwowano, konieczne może być skrócenie okresu wydalania w celu uniknięcia spadku stężenia u ryby poniżej granicy oznaczalności;
- pomiar lipidów tak ja w przypadku pełnego badania;
- korekta wzrostu tak ja w przypadku pełnego badania;
- BCF oblicza się jako kinetyczny BCF.

Pobieranie próbek wody

W przypadku planu zminimalizowanego próbki wody pobiera się tak jak w przypadku pełnego badania (por. pkt 54) lub co najmniej pięciokrotnie w równych odstępach w fazie wchłaniania i co tydzień w fazie wydalania.

⁽¹⁾ Badanie zminimalizowane można istotnie stosować w celu wykazania szybkiego metabolizmu, jeżeli wiadomo, że jest on prawdopodobny.

Modyfikacje planu

Uwzględniając właściwości substancji badanej, ważne prognozy QSAR i szczególny cel badania, można rozważyć pewne zmiany w planie badania:

- jeżeli konieczna jest większa precyzja, można wykorzystać więcej ryb (6 lub 8 zamiast 4) w próbie na koniec fazy wchłaniania;
- włączenie dodatkowej grupy ryb do wykorzystania jeżeli po 14 dniach (lub na koniec przewidzianego końca fazy wydalania) wydalanie nie było wystarczające do odpowiedniego wydalania (tj. >50 %). Jeżeli przewidziany czas trwania fazy wydalania jest krótszy lub dłuższy niż 14 dni, należy dostosować harmonogram pobierania próbek (tj. jedna grupa ryb na koniec przewidywanego końca etapu wydalania i jedna grupa po upływie połowy tego czasu);
- stosowanie dwóch badanych stężeń w celu zbadania możliwej zależności od stężenia. jeżeli wyniki badania zminimalizowanego przeprowadzonego z dwoma badanymi stężeniami wykazują, że BCF nie zależy od stężenia (tj. różni się o mniej niż 20 %), jedno badane stężenie można uznać za wystarczające w pełnym badaniu, jeżeli się je przeprowadza;
- wydaje się prawdopodobne, że można stosować modele procesów bioakumulacji, takie jak proponowane przez Arnot *et al.* (35), jako wsparcie w planowaniu długości faz wchłaniania i wydalania (zob. również dodatek 5).

Obliczenia

Uzasadnieniem takiego podejścia jest to, że współczynnik biokoncentracji w pełnym badaniu można wyznaczyć albo jako współczynnik biokoncentracji w stanie równowagi (BCF_{SS}), obliczając stosunek stężenia substancji badanej w tkance ryby do stężenia substancji badanej w wodzie, albo obliczając kinetyczny współczynnik biokoncentracji (BCF_k) jako stosunek stałej szybkości wchłaniania k_1 do stałej szybkości wydalania k_2 . BCF_k jest ważny, nawet jeżeli nie osiągnięto stężenia substancji w stanie równowagi w fazie wchłaniania, pod warunkiem że proces wchłaniania i wydalania przebiega według kinetyki pierwszego rzędu. Dwa punkty danych są wymagane jako bezwzględne minimum do oszacowania stałych szybkości wchłaniania i wydalania: jeden pod koniec fazy wchłaniania (tj. na początku fazy wydalania) i jeden pod koniec (lub po upływie znacznej części) fazy wydalania. Zaleca się stosowanie pośredniego punktu pobierania próbek jako sprawdzenie kinetyki wchłaniania i wydalania⁽¹⁾. W odniesieniu do obliczeń zob. dodatki 5 i 6.

Interpretacja wyników

Aby ocenić ważność i wartość informacyjną badania, należy zweryfikować, czy okres wydalania przekracza jeden okres półtrwania. Ponadto należy porównać BCF_{km} (kinetyczny BCF wyznaczony z badania zminimalizowanego) ze zminimalizowaną wartością BCF_{SS} (która stanowi BCF_{SS} obliczony po zakończeniu fazy wchłaniania przy założeniu, że został osiągnięty stan równowagi. Może to stanowić wyłączenie założenie, gdyż liczba punktów pobierania próbek nie jest wystarczająca, aby móc to udowodnić). Jeżeli $BCF_{km} <$ zminimalizowany BCF_{SS} , preferowaną wartością powinien być zminimalizowany BCF_{SS} . Jeżeli BCF_{km} wynosi poniżej 70 % zminimalizowanego BCF_{SS} wyniki nie są ważne i należy przeprowadzić pełne badanie.

Jeżeli wartość BCF_{km} uzyskana w badaniu zminimalizowanym będzie bliska jakiegokolwiek wartości będącej przedmiotem zainteresowania regulacyjnego, należy przeprowadzić pełne badanie. Jeżeli wynik jest daleki od jakiegokolwiek regulacyjnej problematycznej wartości (o wiele wyższy lub niższy), pełne badanie może nie być konieczne lub, jeżeli jest to wymagane w ramach regulacyjnych, można przeprowadzić pełne badanie z jednym stężeniem.

Jeżeli pełne badanie okaże się konieczne po przeprowadzeniu badania zminimalizowanego z jednym stężeniem, można je przeprowadzić przy drugim stężeniu. Jeżeli wyniki są spójne, można odstąpić od przeprowadzania pełnego badania z innym stężeniem, gdyż oczekuje się, że biokoncentracja substancji nie jest zależna od stężenia. Jeżeli badanie zminimalizowane przeprowadzono przy dwóch stężeniach, a wyniki wskazują brak zależności od stężenia, można przeprowadzić pełne badanie z tylko jednym stężeniem (por. pkt 87).

⁽¹⁾ Jeżeli dokonuje się pomiaru tylko dwóch punktów danych, można oszacować granice ufności w odniesieniu do BCF_{km} , stosując metody bootstrap. Jeżeli dostępne są również pośrednie punkty danych, granice ufności w odniesieniu do BCF_{km} można obliczyć w pełnym badaniu.

Sprawozdanie z badania

Sprawozdanie z badania w odniesieniu do badania zminimalizowanego powinno obejmować wszystkie informacje wymagane w przypadku pełnego badania (por. pkt 81), poza informacjami, które nie są możliwe do opracowania (tj. krzywą przedstawiającą czas potrzebny do osiągnięcia stanu równowagi i współczynnikiem biokoncentracji w stanie równowagi; w przypadku drugiej informacji, należy podać zamiast niej zminimalizowany BCF_{ss}). Ponadto powinno ono również zawierać uzasadnienie zastosowania badania zminimalizowanego oraz uzyskany BCF_{km} .

C.13 – III: Badanie bioakumulacji u ryb przez narażenie na działanie substancji drogą pokarmową

WPROWADZENIE

Metodę opisaną w niniejszej sekcji należy stosować w odniesieniu do substancji, w przypadku których nie jest możliwe zastosowanie metody narażenia drogą wodną (na przykład ze względu na brak możliwości utrzymania stabilnych i mierzalnych stężeń wody lub brak możliwości osiągnięcia odpowiedniego skażenia organizmu w ciągu 60 dni narażenia; zob. poprzednia sekcja dotycząca metody narażenia drogą wodną). Należy jednak zdać sobie sprawę, że punktem końcowym tego badania będzie pokarmowy współczynnik biomagnifikacji (BMF), nie zaś współczynnik biokoncentracji (BCF)⁽¹⁾.

W maju 2001 r. na konferencji SETAC Europe w Madrycie przedstawiono nową metodę badania bioakumulacji substancji organicznych słabo rozpuszczalnych w wodzie (36). Pracę tę oparto na różnych zgłoszonych badaniach zawartych w literaturze dotyczących bioakumulacji, w ramach których stosowano metodę dawkowania przez wzbogaconą paszę (np. (37)). Na początku 2004 r. grupie roboczej UE do spraw PBT przedłożono projekt protokołu (38), wraz z uzupełniającym dokumentem bazowym (39), opracowany w celu pomiaru potencjału bioakumulacji substancji organicznych słabo rozpuszczalnych w wodzie, w odniesieniu do których nie jest możliwe zastosowanie standardowej metody badania biokoncentracji u ryb przez badanie narażenia drogą wodną. Jako dalsze uzasadnienie stosowania tej metody podano fakt, że potencjalne narażenie środowiskowe w przypadku tak słabo rozpuszczalnych substancji (tj. $\log K_{ow} > 5$) może odbywać się w dużym stopniu drogą pokarmową (por. (40) (41) (42) (43) (44)). Z tego względu w niektórych opublikowanych rozporządzeniach dotyczących substancji chemicznych⁽²⁾ odniesiono się do badań narażenia drogą pokarmową. Należy jednak pamiętać o tym, że zgodnie z opisaną tu metodą dokłada się starań, aby unikać narażenia na działanie substancji w fazie wodnej, dlatego też wartość BMF uzyskana dzięki zastosowaniu niniejszej metody badawczej nie może zostać bezpośrednio porównana z wartością BMF ustaloną w oparciu o wyniki badania w terenie (w ramach którego dopuszcza się możliwość narażenia na działanie substancji zarówno drogą wodną, jak i drogą pokarmową).

Ta sekcja niniejszej metody badawczej opiera się na wspomnianym protokole (38) i stanowi nową metodę, która nie została ujęta we wcześniejszej wersji metody badawczej C.13. Takie alternatywne badanie umożliwia bezpośrednie zbadanie ścieżki narażenia drogą pokarmową w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych.

W celu uzyskania informacji dotyczących tego, kiedy badanie narażenia drogą pokarmową może być preferowane w stosunku do badania narażenia drogą wodną, potencjalne osoby przeprowadzające badanie powinny się zapoznać z pkt 1–14 niniejszej metody badawczej. Przedstawiono różne kwestie dotyczące substancji, które należy uwzględnić przed przeprowadzeniem badania.

Stosowanie substancji badanych znakowanych izotopem może odbywać się przy uwzględnieniu tych samych kwestii, co w przypadku metody narażenia drogą wodną (por. pkt 6 i 65).

Metodę narażenia drogą pokarmową można stosować w celu zbadania większej liczby substancji w jednym badaniu, pod warunkiem że spełnione są pewne kryteria; przedstawiono je w sposób bardziej szczegółowy w pkt 112. W celu uproszczenia w niniejszej metodzie przedstawiono badanie z zastosowaniem tylko jednej substancji badanej.

Badanie narażenia drogą pokarmową jest pod wieloma względami podobne do metody narażenia drogą wodną z oczywistym wyjątkiem, jakim jest droga narażenia. Wiele aspektów przedstawionej tu metody pokrywa się zatem z metodą narażenia drogą wodną przedstawioną w poprzedniej sekcji. W miarę możliwości zastosowano odesłania do odpowiednich punktów w poprzedniej sekcji, aby jednak tekst pozostał czytelny i zrozumiały, pewna liczba powtórzeń jest nieunikniona.

⁽¹⁾ Definicje i jednostki można znaleźć w dodatku 1

⁽²⁾ Do celów rozporządzenia (WE) nr 1907/2006 w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH) (Dz.U. L 396 z 30.12.2006, s. 1) kwestię tę omówiono w „Poradniku dotyczącym wymagań w zakresie informacji i oceny bezpieczeństwa chemicznego”, rozdz. R.7c, R.7.10.3.1; R.7.10.4.1; oraz wykres R7,10-2.

ZASADA BADANIA

Można zastosować warunki przepływowe lub półstatyczne (por. pkt 4); zaleca się stosowanie warunków przepływowych w celu ograniczenia potencjalnego narażenia na działanie substancji badanej drogą wodną wskutek desorpcji ze wzbogaconej paszy lub odchodów. Badanie składa się z dwóch etapów: wchłaniania (karmienie paszą wzbogaconą badaną substancją) i wydalania (karmienie czystą paszą, niewzbogaconą badaną substancją) (por. pkt 16). Podczas fazy wchłaniania badanej grupie ryb podaje się codziennie ustaloną ilość komercyjnej paszy dla ryb o znanym składzie wzbogaconej substancją badaną. Najlepiej gdyby ryby zjadły całość podanego im pokarmu (por. pkt 141). Następnie podczas fazy wydalania podaje się rybom czystą, niewzbogaconą badaną substancją paszę dla ryb. W przypadku metody narażenia drogą wodną można zastosować w razie konieczności większą liczbę grup badanych, poddawanych narażeniu na działanie wzbogaconej substancji badanej o różnym stężeniu, w większości przypadków wysoce hydrofobowych organicznych substancji badanych wystarczy jednak jedna grupa badana (por. pkt 49 i 107). Jeżeli stosuje się warunki półstatyczne, ryby należy przenieść do nowego ośrodka lub do nowej komory badawczej pod koniec fazy wchłaniania (w przypadku gdy ośrodek lub aparatura wykorzystywane podczas fazy wchłaniania zostały zanieczyszczone substancją badaną poprzez ługowanie). Stężenia substancji badanej u ryb mierzy się w obu fazach badania. Poza grupą ryb, którym podawana jest wzbogacona pasza (grupą badaną), grupa kontrolna ryb jest utrzymywana w identycznych warunkach i identycznie karmiona, z tym wyjątkiem, że komercyjna pasza dla ryb nie jest wzbogacona substancją badaną. Istnienie takiej grupy kontrolnej pozwala na oznaczenie ilościowe poziomów tła substancji badanej u ryb niepoddanych narażeniu i służy do celów porównawczych w odniesieniu do jakichkolwiek niekorzystnych skutków związanych z podaniem substancji chemicznej odnotowanych w grupie badanej lub grupach badanych⁽¹⁾. Pozwala również na porównanie stałych szybkości wzrostu między grupami w celach sprawdzenia, czy ryby spożyły podobne ilości podawanej paszy (wyjaśniając różne wartości stałych szybkości wzrostu, należy również uwzględnić potencjalne różnice dotyczące walorów smakowych paszy; por. pkt 138). Co istotne, że zarówno podczas fazy wchłaniania, jak i podczas fazy wydalania grupie badanej i grupie kontrolnej podaje się paszę o równoważnej wartości odżywczej.

Jak wynika z doświadczenia podmiotu, który opracował tę metodę, zazwyczaj wystarczy faza wchłaniania trwająca 7–14 dni (38) (39). Zakres ten powinien zminimalizować koszt przeprowadzania badania, zapewniając jednocześnie w przypadku większości substancji wystarczające narażenie. W niektórych przypadkach można jednak przedłużyć fazę wchłaniania (por. pkt 127). Podczas fazy wchłaniania stężenie substancji u ryby może nie osiągnąć stanu równowagi, w związku z czym przetwarzanie danych i wyniki tej metody opiera się zazwyczaj na kinetycznej analizie pozostałości w tkankach. (Uwaga: Można w tym przypadku zastosować równania służące oszacowaniu czasu pozostałego do osiągnięcia stanu równowagi, tak jak w badaniu narażenia drogą wodną – zob. dodatek 5). Faza wydalania rozpoczyna się, gdy rybom podaje się po raz pierwszy niewzbogaconą paszę, i trwa zazwyczaj do 28 dni lub do momentu, gdy substancji badanej nie można już oznaczyć ilościowo u całej ryby, którykolwiek moment nastąpi wcześniej. Fazę wydalania można skrócić lub przedłużyć powyżej 28 dni, w zależności od zmian, jakie z czasem następują w mierzonych stężeniach substancji chemicznej, i od wielkości ryby.

Metoda ta pozwala na określenie okresu półtrwania specyficznego dla substancji ($t_{1/2}$, ze stałej szybkości wydalania, k_2), wydajności przyswajania (wchłaniania na całą długość jelita, a), kinetycznego pokarmowego współczynnika biomagnifikacji (BMF_k), kinetycznego pokarmowego współczynnika biomagnifikacji skorygowanego pod kątem wzrostu (BMF_{kg}), oraz kinetycznego pokarmowego współczynnika biomagnifikacji skorygowanego pod kątem zawartości lipidów⁽²⁾ (BMF_{kl}) (lub kinetycznego pokarmowego współczynnika biomagnifikacji skorygowanego pod kątem wzrostu i zawartości lipidów, BMF_{kgl}) w odniesieniu do substancji badanej u ryby. W odniesieniu do metody narażenia drogą wodną wzrost masy ryby podczas badania powoduje rozcieńczenie substancji badanej u rosnącej ryby, a zatem jeżeli nie skoryguje się (kinetycznego) BMF pod kątem wzrostu, będzie on niedoszacowany (por. pkt 162 i 163). Ponadto jeżeli szacuje się, że osiągnięto stan równowagi podczas fazy wchłaniania, można obliczyć orientacyjny BMF w stanie równowagi. Istnieją metody pozwalające na oszacowanie kinetycznego współczynnika biokoncentracji (BCF_k) na podstawie danych uzyskanych w badaniu narażenia drogą pokarmową (np. (44) (45) (46) (47) (48)). Zalety i wady takich metod omówiono w dodatku 8.

Badanie opracowano przede wszystkim dla słabo rozpuszczalnych niepolarnych substancji organicznych, w przypadku których wchłanianie i wydalanie u ryb przebiega w przybliżeniu zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu. W przypadku gdy wchłanianie i wydalanie badanej substancji u ryb nie przebiega w przybliżeniu zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu, wówczas należy zastosować modele bardziej złożone (zob. bibliografia w dodatku 5) i zasięgnąć rady specjalisty ds. biostatystyki lub farmakokinetyki.

⁽¹⁾ W przypadku większości substancji badanych byłoby najlepiej, gdyby nie zostały wykryte w wodzie próby kontrolnej. Stężenia tła powinny mieć znaczenie wyłącznie w przypadku naturalnie występujących materiałów (np. niektórych metali) i substancji wszechobecnych w środowisku.

⁽²⁾ Ponieważ BMF definiuje się jako stosunek stężenia substancji w organizmie do stężenia w paszy w stanie równowagi, lipidy uwzględnia się, dokonując korekty o zawartość lipidów w organizmie i w paszy, stąd trafniejsze jest określenie „korekta”. Podejście to różni się od „normalizacji” do ustalonej zawartości lipidów w organizmie, jaką się wykonuje w badaniu biokoncentracji przez narażenie drogą wodną.

BMF określa się zazwyczaj, stosując analizę substancji badanej u całej ryby (na podstawie mokrej masy). W stosownych przypadkach, jeżeli rybę podzielono na jadalne i niejadalne części, do celów badania można pobrać próbki konkretnych tkanek (np. mięśni, wątroby) (por. pkt 21). Ponadto można usunąć przewód pokarmowy i dokonać jego odrębnej analizy w celu określenia wpływu na stężenia u całej ryby w momentach pobierania próbek na końcu fazy wchłaniania i blisko początku fazy wydalania lub jako część podejścia bazującego na bilansie masy.

Należy zmierzyć zawartość lipidów u całej ryby, z której pobrano próbki, tak aby można było skorygować stężenia pod kątem zawartości lipidów, uwzględniając zawartość lipidów zarówno w paszy, jak i u ryby (por. pkt 56 i 57 oraz dodatek 7).

Należy zmierzyć i odnotować masę ryb u osobników, od których pobrano próbki, i połączyć je ze stężeniami analizowanej substancji chemicznej u tego osobnika (np. zgłoszonymi przy użyciu unikalnego kodu identyfikacyjnego przypisanego każdej rybie, od której pobrano próbki) w celu obliczenia wzrostu, jaki mógł wystąpić podczas badania. W miarę możliwości należy również zmierzyć długość całkowitą ryby⁽¹⁾. Dane dotyczące masy są również konieczne do oszacowania BCF z wykorzystaniem danych dotyczących wydalania z badania narażenia drogą pokarmową.

INFORMACJE DOTYCZĄCE SUBSTANCJI BADANEJ

Jak opisano w pkt 3 i 22, informacje dotyczące substancji badanej powinny być dostępne. Zazwyczaj nie jest konieczne stosowanie metody analitycznej w odniesieniu do pomiaru stężeń substancji badanej w wodzie; konieczne jest stosowanie metod o odpowiedniej czułości do mierzenia stężeń w paszy dla ryb i w tkankach ryb.

Metodę tę można stosować w celu zbadania większej liczby substancji w jednym badaniu. Substancje badane muszą być jednak zgodne ze sobą nawzajem, tak aby nie wchodziły w interakcje ani nie zmieniały swoich właściwości chemicznych przy wzbogacaniu nimi paszy dla ryb. Należy dążyć do tego, aby wyniki pomiarów w odniesieniu do każdej wspólnie badanej substancji nie różniły się znacznie od wyników, które uzyskano by w przypadku przeprowadzenia odrębnych badań dla każdej z badanych substancji. Należy ustalić w ramach wstępnej analizy, że każdą z substancji można odzyskać z wielokrotnie wzbogaconej paszy i z próbki tkanki ryby, i że będzie się ona charakteryzować: (i) wysokim poziomem odzysku (np. > 85 % wartości nominalnej); oraz (ii) niezbędną czułością na badanie. Całkowita dawka badanych wspólnie substancji powinna być niższa od łączonego stężenia, które może wywołać efekty toksyczne (por. pkt 51). Ponadto należy uwzględnić w planie badania możliwe niekorzystne skutki u ryb i potencjał w odniesieniu do skutków interakcji (np. skutków metabolicznych) związane z jednoczesnym badaniem wielu substancji. Należy unikać jednoczesnego badania substancji podatnych na dysocjację. Z punktu widzenia narażenia metoda ta jest również odpowiednia w przypadku złożonych mieszanin (por. pkt 13, chociaż będą miały zastosowanie te same ograniczenia dotyczące analizy, co w przypadku każdej innej metody).

WAŻNOŚĆ BADANIA

Aby badanie było ważne, spełnione muszą być następujące warunki (por. pkt 24):

- różnice w temperaturze wody nie przekraczają ± 2 °C w grupach poddanych działaniu substancji chemicznej lub w grupach kontrolnych;
- stężenie rozpuszczonego tlenu nie spada poniżej 60 % wartości nasycenia powietrza;
- stężenie substancji badanej w paszy dla ryb przed fazą wchłaniania i pod koniec tej fazy mieści się w zakresie ± 20 % (w oparciu o co najmniej trzy próbki w obu punktach pobierania próbek);
- podczas wstępnej analizy wzbogaconej paszy należy wykazać wysoki stopień jednorodności substancji w paszy; co najmniej trzy wartości stężenia substancji w próbkach pobranych na początku badania nie mogą odbiegać od średniego stężenia o więcej niż ± 15 %;

⁽¹⁾ Podczas badania należy odnotować również długość całkowitą, gdyż stanowi ona dobry wskaźnik świadczący o wystąpieniu niekorzystnego skutku.

- stężenia substancji badanej w niewzbogaconej paszy lub tkankach ryb kontrolnych nie są wykrywalne lub są obecne wyłącznie na zwykłych poziomach wykrywalności w porównaniu z próbkami poddanymi działaniu substancji chemicznej;
- upadkowość lub inne niekorzystne skutki/choroby zarówno w grupie kontrolnej, jak i badanej powinny wynosić $\leq 10\%$ na koniec badania; jeżeli z jakiegokolwiek powodu badanie przedłuży się, niekorzystne skutki w obu grupach wynoszą $\leq 5\%$ miesięcznie i $\leq 30\%$ łącznie. Znaczne różnice w średnim wzroście między grupą badaną a grupą kontrolną ryb, od których pobierano próbki, mogą wskazywać na wystąpienie efektu toksycznego substancji badanej.

SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Jeżeli laboratorium nie przeprowadzało jeszcze takiego badania lub wprowadzono istotne zmiany w badaniu (takie jak zmiana odmiany lub dostawcy ryb, inny gatunek ryb, znacząca zmiana wielkości ryb, paszy dla ryb lub metody wzbogacania itp.), zaleca się przeprowadzenie badania biegłości technicznej przy zastosowaniu substancji odniesienia. Substancję odniesienia stosuje się przede wszystkim w celu ustalenia, czy technika wzbogacania paszy jest odpowiednia dla zapewnienia maksymalnej jednorodności i biodostępności substancji badanych. Jednym z przykładów użytych w przypadku niepolarnych hydrofobowych substancji jest heksachlorobenzen (HCB), należy jednak rozważyć stosowanie innych substancji, co do których dostępne są wiarygodne dane dotyczące wchłaniania i biomagnifikacji ze względu na właściwości HCB stwarzające zagrożenie⁽¹⁾. W przypadku wykorzystania substancji odniesienia należy przedstawić w sprawozdaniu z badania podstawowe informacje na jej temat, w tym nazwę, czystość, numer CAS, strukturę, dane dotyczące toksyczności (jeżeli są dostępne), tak jak w przypadku substancji badanych (por. pkt 3 i 22).

OPIS METODY

Aparatura

Należy stosować materiały i aparaturę jak opisano w metodzie narażenia drogą wodną (por. pkt 26). Należy stosować przepływowy lub statyczny układ badawczy z wymianą, które zapewnią wystarczającą objętość wody rozcieńczającej w zbiornikach. Należy odnotowywać natężenie przepływu.

Woda

Należy stosować wodę do badania, jak opisano w metodzie narażenia drogą wodną (por. pkt 27–29). Ośrodek badania powinien charakteryzować się opisanymi właściwościami, a jego jakość powinna pozostać stała podczas całego badania. Naturalna zawartość cząstek oraz całkowity węgiel organiczny powinny być jak najniższe (≤ 5 mg/l cząstek stałych; ≤ 2 mg/l całkowitego węgla organicznego) przed rozpoczęciem badania. Pomiar całkowitego węgla organicznego konieczny jest tylko przed rozpoczęciem badania jako część charakterystyki wody użytej do badania (por. pkt 53).

Pasza

Zaleca się stosowanie komercyjnie dostępnej paszy dla ryb (pływającej lub wolno tonącej paszy w postaci peletek), scharakteryzowanej co najmniej pod kątem zawartości białka i tłuszczu. Pasza powinna składać się z peletek jednakowego rozmiaru, aby zwiększyć skuteczność narażenia przez paszę, tj. aby ryba zjadła więcej paszy, nie zaś zjadała większe kawałki i pozostawiała mniejsze. Rozmiar peletek powinien być dostosowany do rozmiaru ryb na początku badania (np. w przypadku ryb o długości całkowitej 3–7 cm można użyć peletek o średnicy 0,6–0,85 mm, a w przypadku ryb o długości całkowitej 6–12 cm można użyć peletek o średnicy 0,85–1,2 mm). Można dostosować rozmiar peletek do wzrostu ryb na początku fazy wydalania. Przykład odpowiedniego składu paszy w postaci dostarczonej komercyjnie podano w dodatku 7. Przy opracowywaniu niniejszej metody zazwyczaj stosowano paszę doświadczalną o całkowitej zawartości lipidów 15–20 % (w/w). Pasza dla ryb o tak wysokim stężeniu lipidów może nie być dostępna w niektórych regionach. W takich przypadkach można w razie konieczności przeprowadzić badania przy niższym poziomie stężenia lipidów w paszy, dostosowując częstotliwość karmienia w taki sposób, by utrzymać dobry stan zdrowia ryb (w oparciu o badanie wstępne). Należy zmierzyć i odnotować całkowitą zawartość lipidów w paszy grupy badanej i grupy kontrolnej przed rozpoczęciem badania i na koniec fazy wchłaniania. Należy przedstawić w sprawozdaniu z badania szczegóły dostarczone przez dostawcę komercyjnej paszy dotyczące analizy składników odżywczych, wilgotności, włókna i popiołu, oraz w miarę możliwości minerałów i pozostałości pestycydów (np. najważniejszych „standardowych” zanieczyszczeń).

⁽¹⁾ HCB widnieje w wykazie w załącznikach A i C do konwencji sztokholmskiej i w załącznikach I i II do rozporządzenia (WE) nr 850/2004 dotyczącego trwałych zanieczyszczeń organicznych (Dz.U. L 158 z 30.4.2004, s. 7).

Podczas wzbogacania paszy substancją badaną należy dołożyć wszelkich starań, aby zapewnić jednorodność w całej paszy używanej do badania. Przy wyborze stężenia substancji badanej w paszy dla grupy badanej należy uwzględnić czułość techniki analitycznej, toksyczność substancji badanej (NOEC, jeżeli jest znany) oraz odpowiednie dane fizykochemiczne. Substancję odniesienia, jeżeli jest stosowana, należy najlepiej włączyć w stężeniu ok. 10 % stężenia substancji badanej (lub w każdym razie najniższym stosowanym stężeniu), podlegającym analizie czułości (np. w przypadku heksachlorobenzenu uznano, że stężenie w paszy wynoszące 1–100 µg/g jest dopuszczalne; por. (47) aby uzyskać więcej informacji na temat wydajności przyswajania HCB).

Paszę dla ryb można wzbogacić substancją badaną na kilka sposobów, w zależności od właściwości fizycznych i rozpuszczalności substancji (zob. dodatek 7, aby uzyskać szczegółowe informacje na temat metod wzbogacania):

- jeżeli substancja jest rozpuszczalna i stabilna w trójglicerydach, należy przed wymieszaniem z paszą dla ryb rozpuścić ją w niewielkiej ilości oleju z ryb lub jadalnego oleju roślinnego. W takim przypadku należy dołożyć starań, aby uniknąć przygotowania dawki o zbyt wysokiej zawartości lipidów, uwzględniając naturalną zawartość lipidów we wzbogaconej paszy, dodając minimalną znaną ilość wymaganego oleju, aby osiągnąć rozłożenie substancji badanej w paszy i jej jednorodność; lub
- paszę należy wzbogacić przy użyciu odpowiedniego rozpuszczalnika organicznego, o ile nie zagraża to jednorodności i biodostępności (może się zdarzyć, że w konsekwencji parowania rozpuszczalnika w paszy uformują się (mikro)kryształki substancji badanej, przy czym nie istnieje żadna prosta metoda, aby udowodnić, że nie miało to miejsca; por. (49)); lub
- nielepłą ciecz należy dodać bezpośrednio do paszy dla ryb, należy ją jednak dobrze wymieszać, aby uzyskać jednorodność i ułatwić przyswajanie. Technika mieszania powinna zapewniać jednorodność wzbogaconej paszy.

W kilku przypadkach, np. w przypadku substancji badanych o mniejszych właściwościach hydrofobowych, gdy istnieje większe prawdopodobieństwo zdesorbowania z paszy, może być konieczne pokrycie przygotowanych peletek paszy niewielką ilością oleju z kukurydzy/ryb (zob. pkt 142). W takich przypadkach należy poddać tej samej procedurze paszę podawaną grupie kontrolnej oraz przygotowywaną paszę końcową stosowaną do pomiaru lipidów.

Jeżeli stosuje się substancję odniesienia, wyniki powinny być porównywalne z danymi na temat badań pochodzącymi z literatury, które to badania przeprowadzono w podobnych warunkach, i stosując porównywalną częstotliwość karmienia (por. pkt 45), a parametry specyficzne dla substancji odniesienia powinny spełniać odpowiednie kryteria przedstawione w pkt 113 (tیره trzecie, czwarte i piąte).

Jeżeli jako nośnik substancji badanej stosuje się olej lub nośnik rozpuszczalnikowy, należy wymieszać taką samą ilość tego samego nośnika (wyłączając substancję badaną) z paszą podawaną grupie kontrolnej w celu zachowania równowagi w stosunku do wzbogaconej paszy. Co istotne, że zarówno podczas fazy wchłaniania, jak i podczas fazy wydalania grupie badanej i grupie kontrolnej podaje się paszę o równoważnej wartości odżywczej.

Wzbogaconą paszę należy przechowywać w warunkach zapewniających możliwość utrzymania stabilności substancji badanej dodanej do paszy (np. w warunkach chłodniczych), a warunki te należy odnotować.

Wybór gatunku ryb

Można zastosować gatunek ryb wskazany w odniesieniu do narażenia drogą wodną (por. pkt 32 i dodatek 3). Przed publikacją niniejszej metody badawczej w badaniach bioakumulacji pokarmowej wykorzystywano zazwyczaj pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*), karpia (*Cyprinus carpio*) i strzeblę wielkogłową (*Pimephales promelas*). Gatunek doświadczalny powinien wykazywać zachowanie żywieniowe charakteryzujące się szybkim spożyciem podanej dawki paszy, aby ograniczyć do minimum jakiegokolwiek czynniki wpływające na stężenie substancji badanej w paszy (np. wymywanie do wody i możliwość narażenia drogą wodną). Należy wykorzystywać ryby mieszczące się w zalecanym zakresie rozmiaru/masy (por. dodatek 3). Ryby nie powinny być na tyle małe, aby zagrażało to prostej analizie poszczególnych przypadków. Badanie gatunku w stadium szybkiego wzrostu może skomplikować interpretację danych, a duża szybkość wzrostu może wpłynąć na obliczenia wydajności przyswajania ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ W odniesieniu do szybkiego wzrostu w trakcie fazy wchłaniania rzeczywista częstotliwość karmienia spadnie poniżej poziomu ustalonego na początku narażenia.

utrzymywanie ryb

Aklimatyzacja, upadkowość i kryteria dopuszczalności chorób są takie same jak w przypadku metody narażenia drogą wodną przed rozpoczęciem badania (por. pkt 33–35).

PRZEPROWADZENIE BADANIA

Czynności poprzedzające badanie i badanie ustalające zakres

Czynności analityczne poprzedzające badanie są niezbędne, aby wykazać ustanie działania substancji we wzbożonej paszy / wzbożonej tkance ryby. Badanie ustalające zakres służące wybraniu odpowiedniego stężenia w paszy nie zawsze jest konieczne. Aby wykazać brak zaobserwowanych niekorzystnych skutków i ocenić walory smakowe wzbożonej paszy, czułość metody analitycznej w odniesieniu do tkanek ryb i paszy dla ryb oraz wybór odpowiedniej częstotliwości karmienia i przerw między pobieraniem próbek w trakcie fazy wydalania itp., można przeprowadzić wstępne doświadczenia dotyczące karmienia, nie są jednak one obowiązkowe. Wstępne badanie może być cenne przy szacowaniu liczby ryb potrzebnych do pobrania próbek w trakcie fazy wydalania. Może ono przyczynić się do znacznego ograniczenia liczby wykorzystanych ryb, w szczególności w przypadku substancji badanych szczególnie podatnych na metabolizm.

Warunki narażenia na działanie substancji

Czas trwania fazy wchłaniania

Faza wchłaniania trwająca 7–14 dni jest zazwyczaj wystarczająca; w tym czasie jednej grupie podaje się paszę dla grupy kontrolnej, a drugiej grupie ryb paszę doświadczalną w ustalonej dawce w zależności od badanego gatunku i warunków doświadczalnych, np. 1–2 % masy ciała (mokrej masy) w przypadku pstrąga tęczowego. Częstotliwość karmienia powinna zostać dobrana w taki sposób, aby nie dopuścić do szybkiego wzrostu i dużego zwiększenia zawartości lipidów. W razie konieczności można wydłużyć fazę wchłaniania, opierając się na praktycznych doświadczeniach z wcześniejszych badań lub wiedzy na temat wchłaniania/wydalania substancji badanej (lub substancji analogicznej) u ryby. Początek badania definiuje się jako moment pierwszego podania wzbożonej paszy. Dzień doświadczalny trwa od momentu karmienia i kończy się niedługo przez porą następnego karmienia (np. jedną godzinę). Pierwszy dzień doświadczalny fazy wchłaniania trwa zatem od momentu pierwszego podania wzbożonej paszy i kończy się na krótko przed drugim podaniem wzbożonej paszy. W praktyce faza wchłaniania kończy się na krótko przed (np. jedną godzinę) pierwszym podaniem paszy niewzbożonej substancją badaną, gdyż ryby będą nadal trawiły wzbożoną paszę i wchłaniały substancję badaną przez kolejne 24 godziny. Istotne jest, aby upewnić się, że osiągnięto wystarczająco wysokie (nietoksyczne) skażenie organizmu substancją badaną w odniesieniu do metody analitycznej, aby w trakcie fazy wydalania można było zmierzyć spadek o przynajmniej jeden rząd wielkości. W szczególnych przypadkach można zastosować wydłużoną fazę wchłaniania (do 28 dni) z dodatkowym pobieraniem próbek, aby uzyskać wgląd w kinetykę wchłaniania. Podczas wchłaniania stężenie u ryby może nie osiągnąć stanu równowagi. Tak jak w badaniu narażenia drogą wodną można w tym przypadku zastosować równania służące oszacowaniu czasu potrzebnego do osiągnięcia stanu równowagi, służące jako wskaźnik prawdopodobnego czasu potrzebnego do osiągnięcia u ryb znacznych stężeń (por. dodatek 5).

W niektórych przypadkach może być wiadomo, że ze względu na słabą czułość analityczną albo niską wydajność przyswajania, wchłanianie substancji u ryby przez 7–14 dni będzie przy stosowanym stężeniu w paszy niewystarczające do osiągnięcia odpowiednio wysokiego stężenia u ryby tak, aby możliwa była analiza spadku przynajmniej jednego rzędu wielkości w podczas wydalania. W takich przypadkach korzystne może być wydłużenie początkowej fazy karmienia powyżej 14 dni lub, szczególnie w odniesieniu do wysoce metabolizowanych substancji, należy rozważyć wyższe stężenie w pokarmie. Należy jednak zadbać o to, aby podczas wchłaniania utrzymywać skażenie organizmu poniżej (szacowanego) najwyższego stężenia, przy którym nie obserwuje się szkodliwych, przewlekłych zmian (NOEC) w tkance ryby (por. pkt 138).

Czas trwania fazy wydalania

Wydalanie zazwyczaj trwa do 28 dni, licząc od momentu podania grupie badanej ryb czystej, niewzbogaconej paszy po zakończeniu fazy wchłaniania. Wydalenie rozpoczyna się wraz z pierwszym podaniem „niewzbogaconej” paszy, nie zaś bezpośrednio po ostatnim podaniu „wzbogaconej” paszy, gdyż ryby będą nadal trawiły paszę i wchłaniały substancję badaną przez następne 24 godziny, jak przedstawiono w pkt 126. Pierwszą próbkę podczas fazy wydalania pobiera się zatem niedługo przed drugim podaniem niewzbogaconej paszy. Zaplanowano taki okres wydalania, aby wykryć substancje o potencjalnym okresie półtrwania do 14 dni, który jest zgodny z okresem substancji wykazujących zdolność do bioakumulacji ⁽¹⁾, okres 28 dni obejmuje zatem dwa okresy półtrwania takich substancji. W przypadkach substancji wykazujących bardzo dużą zdolność do bioakumulacji korzystne może być wydłużenie fazy wydalania (jeżeli wskazano tak w badaniu wstępnym).

Jeżeli substancja ulega wydalaniu bardzo powoli, tak, że nie można określić dokładnego okresu półtrwania w fazie wydalania, informacje nadal mogą wystarczyć na potrzeby oceny, aby wyznaczyć wysoki poziom bioakumulacji. Z kolei jeżeli substancja jest wydalana tak szybko, że nie można wyznaczyć wiarygodnego stężenia w czasie zerowym (stężenia na końcu wchłaniania / na początku wydalania, $C_{0,d}$) ani k_2 , można zachowawczo oszacować k_2 (por. dodatek 7).

Jeżeli analizy ryb w krótszych odstępach czasu (np. 7 lub 14 dni) wykazą, że substancja uległa wydalaniu poniżej poziomów oznaczenia ilościowego przed upływem pełnego okresu 28 dni, można zaprzestać pobierania następnych próbek i zakończyć badanie.

W kilku przypadkach może się zdarzyć, że nie wystąpi żadne mierzalne wchłanianie substancji badanej na koniec okresu wchłaniania (lub przy drugiej próbie w okresie wydalania). Jeżeli można wykazać, że: (i) spełnione są kryteria ważności przedstawione w pkt 113; oraz (ii) brak wchłaniania nie wynika z innego niedociągnięcia w badaniu (np. zbyt krótki czas wchłaniania, wady techniki wzbogacania paszy prowadzące do słabej biodostępności, brak czułości w metodzie analitycznej, niespożywanie paszy przez ryby itp.), możliwe jest zakończenie badania bez konieczności jego ponownego przeprowadzenia z zastosowaniem dłuższego czasu wchłaniania. Jeżeli w ramach wstępnych czynności wskazano, że może chodzić o taki przypadek, może być zalecane przeprowadzenie w miarę możliwości analizy odchodów w kierunku niestrawionej substancji badanej jako części podejścia bazującego na „bilansie masy”.

Liczba ryb doświadczalnych

Podobnie jak w przypadku badania narażenia drogą wodną, należy wybierać ryby o podobnej masie i długości, tak aby masa najmniejszej z nich nie była mniejsza niż dwie trzecie masy największej z ryb (por. pkt 40–42).

Wybór łącznej liczby ryb użytych do badania powinien opierać się na harmonogramie pobierania próbek (minimum jedna próbka na koniec fazy wchłaniania i od czterech do sześciu próbek podczas fazy wydalania, zależnie jednak od czasu trwania faz) i powinno się w nim uwzględnić czułość techniki analitycznej, prawdopodobne osiągnięte stężenie na koniec fazy wchłaniania (w oparciu o dotychczasową wiedzę) i czas trwania wydalania (jeżeli pozwala na to stan dotychczasowej wiedzy). Za każdym razem należy pobrać próbki od pięciu do dziesięciu ryb, przy czym pomiar parametrów wzrostu (masy i długości całkowitej) powinien poprzedzać analizę substancji chemicznej lub analizę lipidów.

Z uwagi na nieodłączne różnice w rozmiarze ryb, szybkości ich wzrostu i ich fizjologii oraz prawdopodobne różnice w ilości podawanej paszy spożywanej przez każdą z ryb, aby odpowiednio ustalić średnie stężenie i jego zmienność, w każdym odstępie czasu należy pobrać próbki od co najmniej pięciu ryb z grupy badanej i od pięciu ryb z grupy kontrolnej. Jest prawdopodobne, że różnice wśród wykorzystywanych ryb będą miały większy wpływ na ogólne niekontrolowane różnice w badaniu niż różnice nieodłącznie związane ze stosowanymi metodami analitycznymi, uzasadnione jest zatem stosowanie w niektórych przypadkach do dziesięciu ryb na punkt pobierania próbek. Jeżeli stężenia tła substancji badanej u ryb kontrolnych nie są jednak możliwe do zmierzenia na początku okresu wydalania, analiza substancji chemicznej u dwóch–trzech ryb kontrolnych podczas ostatniego pobierania próbek może być wystarczająca tylko wtedy, jeżeli we wszystkich punktach pobierania próbek dokonuje się pomiaru pozostałych ryb kontrolnych pod względem masy i długości całkowitej (tak, aby dokonać pomiaru wzrostu u takiej samej liczby ryb badanych i ryb kontrolnych). Ryby należy przechowywać i ważyć oddzielnie (nawet jeżeli okazuje się konieczne późniejsze połączenie wyników próbek) oraz mierzyć ich długość całkowitą.

⁽¹⁾ W badaniu narażenia drogą wodną 14-dniowy okres półtrwania odpowiadałby BCF o wartości ok. 10 000 L/kg przy wykorzystaniu ryb o masie 1 g i odpowiadającej szybkości wchłaniania ok. 500 L/kg na dobę (zgodnie z równaniem podanym w Sijm *et al.*(46)).

W przypadku standardowego badania, obejmującego na przykład okres wydalania trwający 28 dni, w tym pięć próbek pobieranych w okresie wydalania, oznacza to wykorzystanie 59–120 ryb z grupy badanej i 50–110 ryb z grupy kontrolnej, przy założeniu że technika analityczna stosowana względem substancji pozwala na przeprowadzenie analizy zawartości lipidów na tych samych rybach. Jeżeli nie można przeprowadzić analizy zawartości lipidów na tych samych rybach, na których przeprowadza się analizę substancji chemicznej, a wykorzystanie ryb kontrolnych wyłącznie do przeprowadzenia analizy lipidów również nie jest wykonalne (por. pkt 56), potrzebne byłoby dodatkowe 15 ryb (trzy z podstawowej populacji na początku badania, po trzy z grupy kontrolnej i z grupy badanej na początku wydalania oraz po trzy z grupy kontrolnej i z grupy badanej na koniec doświadczenia). Przykładowy harmonogram pobierania próbek wraz z liczbami ryb można znaleźć w dodatku 4.

Obciążenie

Podobnie jak w przypadku metody narażenia drogą wodną należy stosować wysoką proporcję objętości wody do masy ryb (por. pkt 43 i 44). Chociaż wskaźnik obciążenia pod względem masy ryb do objętości wody nie ma wpływu na stężenie ekspozycyjne w badaniu, zaleca się, aby wynosił on 0,1–1,0 g ryb (mokra masa) na litr wody na dobę, aby utrzymać odpowiednie stężenia rozpuszczonego tlenu i zminimalizować stres u organizmów doświadczalnych.

Pasza doświadczalna i karmienie

Podczas okresu aklimatyzacji należy podawać rybom odpowiednią paszę, jak opisano powyżej (pkt 117). Jeżeli badanie prowadzone jest w warunkach przepływowych, należy wstrzymać przepływ wody na czas karmienia ryb.

Podczas badania pasza przeznaczona dla grupy badanej powinna być zgodna z powyższym opisem (pkt 116–121). Poza czynnikami specyficznymi dla substancji, czułością analityczną, spodziewanym stężeniem w paszy w warunkach otoczenia i poziomami toksyczności przewlekłej / skażeniami organizmu, dokonując wyboru docelowego stężenia wzbogacania, należy uwzględnić walory smakowe paszy (aby ryby nie unikały jej spożywania). Należy udokumentować w sprawozdaniu nominalne stężenie wzbogacania substancji badanej. Na podstawie doświadczenia można stwierdzić, że stężenia wzbogacania znajdujące się w przedziale 1–1000 µg/g stanowią praktyczny zakres stosowany w odniesieniu do substancji badanych, które nie wykazują szczególnego mechanizmu toksycznego. W odniesieniu do substancji działających za pośrednictwem niespecyficznego mechanizmu poziomy pozostałości w tkankach nie powinny przekraczać 5 µmol/g lipidów, gdyż powyżej tego poziomu pozostałości mogą z dużym prawdopodobieństwem wywierać wpływ długoterminowy (19) (48) (50) (1). W odniesieniu do innych substancji należy dołożyć starań, aby nie wystąpiły żadne niekorzystne skutki wynikające ze zakumulowanego narażenia (por. pkt 127). Dzieje się tak w szczególności w przypadku, gdy jednocześnie bada się więcej niż jedną substancję (por. pkt 112).

Wzbogacenie paszy dla ryb odpowiednią ilością substancji badanej można przeprowadzić na trzy różne sposoby, jak opisano w pkt 119 i w dodatku 7. Takie metody i procedury wzbogacania paszy należy udokumentować w sprawozdaniu. Rybom kontrolnym podaje się niewzbogaconą paszę zawierającą taką samą ilość niewzbogaconego nośnika w postaci oleju, jeżeli zastosowano go we wzbogaconej paszy podawanej podczas fazy wchłaniania, lub poddaną działaniu „czystego” rozpuszczalnika, jeżeli zastosowano nośnik w postaci rozpuszczalnika do przygotowania paszy dla grupy badanej. Wzbogaconą i niewzbogaconą paszę należy poddać analitycznym pomiarom dotyczącym stężenia substancji badanej przynajmniej trzykrotnie przed rozpoczęciem fazy wchłaniania i na jej końcu. Po narażeniu na działanie wzbogaconej paszy (faza wchłaniania) rybom (z obu grup) podaje się niewzbogaconą paszę (faza wydalania).

Rybom podaje się ustalone dawki (w zależności od gatunku; np. ok. 1–2 % mokrej masy ciała na dzień w przypadku pstrąga tęczowego). Częstotliwość karmienia powinna zostać dobrana w taki sposób, aby nie dopuścić do szybkiego wzrostu i dużego zwiększenia zawartości lipidów. Należy odnotować dokładną częstotliwość karmienia ustaloną podczas doświadczenia. Początkowe karmienie powinno opierać się na harmonogramie pomiarów masy podstawowej populacji zaraz przed rozpoczęciem badania. Ilość paszy należy dostosować do mokrej masy ryb, od których pobrano próbki przy każdym pobieraniu próbek, aby uwzględnić wzrost w trakcie doświadczenia. Masę i długość ryb w zbiornikach badawczych i kontrolnych można oszacować z masy i długości całkowitej ryb wykorzystanych w przypadku każdego pobierania próbek; nie należy ważyć ani mierzyć ryb pozostających w zbiornikach badawczych i kontrolnych. Istotne jest, aby utrzymać tę samą ustaloną częstotliwość karmienia podczas całego doświadczenia.

(1) Ponieważ rzeczywiste wewnętrzne stężenia można wyznaczyć dopiero po przeprowadzeniu badania, potrzebne są ich spodziewane wartości szacunkowe (np. opierające się na spodziewanych BMF i stężeniu w paszy; por. równanie A5.8 w dodatku 5).

Należy obserwować ryby podczas karmienia, upewniając się, że spożywają one w widoczny sposób całość podanej paszy, aby zagwarantować, że w obliczeniach zostanie użyta odpowiednia częstotliwość spożywania pokarmu. Dokonując wyboru częstotliwości karmienia, która zapewni spożycie całości paszy podawanej raz dziennie, należy uwzględnić przeprowadzone wstępne doświadczenia dotyczące karmienia lub zdobyte wcześniej doświadczenie. W przypadku gdy ryby konsekwentnie pozostawiają niespożytą paszę, można zalecić podzielenie dawki na rzecz dodatkowego okresu karmienia w każdym dniu doświadczalnym (np. zastąpić karmienie raz dziennie karmieniem połową dawki dwa razy dziennie). Jeżeli jest to konieczne, należy przeprowadzać drugie karmienie o stałych porach tak, aby od momentu karmienia do momentu pobierania próbek upłynął możliwie maksymalnie okres (np. moment drugiego karmienia ustalony jest w pierwszej połowie dnia doświadczalnego).

Chociaż zazwyczaj ryby szybko spożywają paszę, ważne jest, aby upewnić się, że substancja pozostaje zaadsorbowana w paszy. Należy dołożyć starań, aby uniknąć rozproszenia substancji badanej z paszy do wody, co naraziłoby ryby na dodatkowe stężenie substancji badanej w wodzie poza narażeniem drogą pokarmową. Można to osiągnąć usuwając niespożytą paszę (i odchody) ze zbiorników badawczych i kontrolnych w przeciągu godziny od karmienia, najlepiej jednak w przeciągu 30 minut. Ponadto można zastosować system, w ramach którego woda podlega ciągłemu oczyszczaniu przez filtr z węglem aktywnym, aby wszystkie „rozproszone” zanieczyszczenia podlegały absorpcji. Systemy przepływowe mogą być pomocne w szybkim splukiwaniu cząstek paszy i rozproszonych substancji⁽¹⁾. W niektórych przypadkach niewielka modyfikacja techniki przygotowywania wzbogaconej paszy może pomóc w złagodzeniu tego problemu (zob. pkt 119).

Światło i temperatura

Tak jak w przypadku metody narażenia drogą wodną (por. pkt 48) zaleca się fotoperiod wynoszący 12–16 godzin i dostosowanie temperatury (± 2 °C) do wymagań wykorzystywanego gatunku doświadczalnego (por. dodatek 3). Rodzaj oraz właściwości oświetlenia powinny być znane i udokumentowane.

Kontrolne

Należy stosować jedną grupę kontrolną, w której ryby karmione są taką samą dawką jak ryby z grupy badanej, lecz paszą niezawierającą substancji badanej. Jeżeli w celu wzbogacenia paszy stosowano nośnik w postaci oleju lub rozpuszczalnika w grupie badanej, należy poddać dokładnie takim samym zabiegom paszę podawaną grupie kontrolnej, z tym że bez dodawania substancji badanej, tak aby pasze grupy badanej i grupy kontrolnej były równoważne (por. pkt 121 i 139).

Częstotliwość pomiarów jakości wody

Warunki opisane w metodzie narażenia drogą wodną odnoszą się również do niniejszej metody, z tym że pomiar całkowitego węgla organicznego konieczny jest tylko przed rozpoczęciem badania jako część charakterystyki wody użytej do badania (por. pkt 53).

Pobieranie próbek oraz analiza ryb i paszy

Analiza próbek paszy

Próbki paszy grupy badanej i grupy kontrolnej należy poddać analizie w zakresie substancji badanej przynajmniej trzykrotnie oraz analizie w zakresie zawartości lipidów przynajmniej przed rozpoczęciem fazy wchłaniania i na jej końcu. Metody analizy i procedury zapewniania jednorodności paszy należy zawrzeć w sprawozdaniu.

⁽¹⁾ Obecność substancji badanej w ośrodku badawczym wynikająca z wydalania przez ryby lub wymywania substancji z paszy może być nie do uniknięcia. Jednym z rozwiązań jest zatem mierzenie stężenia substancji w wodzie pod koniec okresu wchłaniania, szczególnie w przypadku stosowania warunków półstatycznych, mające pomóc ustalić, czy miało miejsce narażenie drogą wodną.

Należy dokonać analizy próbek na obecność substancji badanej przy zastosowaniu standardowych i zweryfikowanych metod. Należy przeprowadzić czynności poprzedzające badanie w celu ustalenia granicy oznaczalności, odsetka ustania działania substancji, zakłóceń i różnorodności analitycznej w zakładanym próbnym materiale. Jeżeli badaniu poddawany jest materiał znakowany izotopem, należy uwzględnić podobne kwestie jak w przypadku metody narażenia drogą wodną, przy czym analizę wody należy zastąpić analizą paszy (por. pkt 65).

Analiza ryb

Podczas każdego pobierania próbek od ryb zostaną one pobrane od 5–10 osobników z grupy poddanej narażeniu i grupy kontrolnej (w niektórych przypadkach można ograniczyć liczbę ryb kontrolnych; por. pkt 134).

Pobieranie próbek powinno odbywać się o tej samej porze każdego dnia doświadczalnego (zależnie od pory karmienia) i powinno być tak zaplanowane w czasie, aby zminimalizować prawdopodobieństwo pozostania paszy w jelicie podczas fazy wchłaniania i we wczesnej fazie wydalania, aby zapobiec uwzględnieniu błędnych wartości całkowitego stężenia substancji badanej (tj. ryby, od których pobrano próbki należy usuwać na koniec dnia doświadczalnego, pamiętając o tym, że dzień doświadczalny rozpoczyna się wraz z karmieniem, a kończy wraz z następnym karmieniem ok. 24 godziny później. Wydalanie rozpoczyna się wraz z pierwszym podaniem niewzbogaconej paszy; por. pkt 128). Pierwsza próbka pobrana podczas fazy wydalania (niedługo przed drugim podaniem niewzbogaconej paszy) jest ważna, gdyż stosuje się ekstrapolację z dnia poprzedzającego ten pomiar do oszacowania stężenia w czasie zerowym ($C_{0,d}$, stężenie u ryby pod koniec wchłaniania / na początku wydalania). Ewentualnie można usunąć przewód pokarmowy ryby i osobno dokonać jego analizy pod koniec wchłaniania oraz pierwszego i trzeciego dnia wydalania.

Podczas każdego pobierania próbek należy usuwać ryby z obu naczyń badawczych i poddawać tym samym czynnościom, jak opisano w przypadku metody narażenia drogą wodną (por. pkt 61–63).

Stężenia substancji badanej u całej ryby (mokra masa) mierzy się co najmniej po zakończeniu fazy wchłaniania i podczas fazy wydalania zarówno w grupie kontrolnej, jak i w grupie badanej. Zaleca się ustalenie czterech do sześciu punktów pobierania próbek podczas fazy wydalania (np. 1., 3., 7., 14. i 28. dnia). Można ewentualnie włączyć dodatkowy punkt pobierania próbek po 1–3 dniach wchłaniania w celu oszacowania wydajności przyswajania z fazy liniowej wchłaniania przez ryby, gdy są wciąż na początku okresu narażenia. Istnieją dwa główne odchylenia od tego harmonogramu: (i) jeżeli stosuje się wydłużoną fazę wchłaniania do celów zbadania kinetyki wchłaniania, podczas fazy wchłaniania będą ustalone dodatkowe punkty pobierania próbek, konieczne będzie zatem włączenie dodatkowych ryb (por. pkt 126); (ii) jeżeli badanie zakończono pod koniec fazy wchłaniania z uwagi na brak wymiernego wchłaniania (por. pkt 131). Poszczególne ryby, od których pobierane są próbki, należy zważyć (i zmierzyć ich długość całkowitą), aby można było wyznaczyć stałe szybkości wzrostu. Można również zmierzyć stężenia substancji w poszczególnych tkankach ryby (jadalnych i niejadalnych częściach) pod koniec okresu wchłaniania i w wybranych momentach w trakcie wydalania. Jeżeli badaniu poddawany jest materiał znakowany izotopem, należy uwzględnić podobne kwestie, co w przypadku metody narażenia drogą wodną, przy czym analizę wody należy zastąpić analizą paszy (por. pkt 65).

W przypadku okresowego stosowania substancji odniesienia (por. pkt 25) zaleca się, aby w grupie badanej mierzono stężenia pod koniec wchłaniania i we wszystkich momentach w trakcie wydalania określonych w odniesieniu do substancji badanej (u całych ryb); w grupie kontrolnej analiza stężeń konieczna jest tylko pod koniec wchłaniania (u całych ryb). W niektórych okolicznościach (na przykład jeżeli techniki analityczne odnoszące się do substancji badanej i do substancji odniesienia nie są ze sobą zgodne tak, że aby postępować zgodnie z harmonogramem pobierania próbek konieczne by było wykorzystanie dodatkowej ryby) można zastosować następujące inne podejście, aby zminimalizować liczbę niezbędnych dodatkowych ryb. Pomiar stężeń substancji odniesienia odbywa się tylko pierwszego i trzeciego dnia wydalania, a dwa następne punkty pobierania próbek dobiera się tak, aby można było dokonać wiarygodnych szacunków stężenia w czasie zerowym ($C_{0,d}$) oraz k_2 w odniesieniu do substancji odniesienia.

W miarę możliwości zawartość lipidów u poszczególnych ryb należy oznaczać przy każdej okazji pobierania próbek lub co najmniej na początku i na końcu fazy wchłaniania oraz na końcu fazy wydalania. (por. pkt 56 i 67). W zależności od stosowanej metody analitycznej (odniesienie do pkt 67 i dodatku 4) możliwe może być wykorzystanie tej samej ryby do wyznaczenia zarówno zawartości lipidów, jak i stężenia substancji badanej. Podejście takie jest preferowane ze względu na minimalizowanie liczby ryb. Jeżeli nie jest to jednak możliwe, można zastosować takie samo podejście, jak opisane w przypadku metody narażenia drogą wodną (zob. pkt 56 w odniesieniu do takich alternatywnych możliwości pomiaru zawartości lipidów). Takie metody stosowane do określenia ilościowego zawartości lipidów należy udokumentować w sprawozdaniu.

Jakość metody analitycznej

Aby zapewnić swoistość, dokładność, precyzję i odtwarzalność specyficznych dla substancji technik analitycznych, a także odzysk badanej substancji zarówno z paszy, jak i z ryb, należy przeprowadzać kontrole doświadczenia.

Pomiar wzrostu ryb

Na początku badania należy zważyć próbkę ryb z populacji (i zmierzyć ich długość całkowitą). Próbki od tych ryb należy pobrać na krótko przed pierwszym podaniem wzbogaconej paszy (np. godzinę wcześniej) i przypisać je do dnia doświadczalnego 0. Liczba ryb wykorzystanych do pobrania tych próbek powinna być co najmniej taka sama, jak liczba wykorzystana do pobrania próbek w trakcie badania. Niektóre z tych ryb mogą być te same, co ryby wykorzystane do analizy lipidów przed rozpoczęciem fazy wchłaniania (por. pkt 153). Podczas każdego okresu pobierania próbek najpierw waży się ryby i mierzy ich długość. Dane dotyczące masy (i długości) każdej ryby należy powiązać ze stężeniem analizowanej substancji chemicznej (i w stosownych przypadkach zawartością lipidów), na przykład przy użyciu indywidualnego kodu identyfikacyjnego w odniesieniu do każdej ryby z próby. Pomiarów tych próbek ryb można wykorzystać do oszacowania masy (i długości) ryb pozostających w zbiornikach badawczych i kontrolnych.

Ocena doświadczenia

Należy codziennie prowadzić obserwacje dotyczące upadkowości i odnotowywać je. Należy prowadzić dodatkowe obserwacje dotyczące niekorzystnych skutków, na przykład odnoszące się do nietypowego zachowania lub przebarwienia, i odnotowywać je. Ryby uznaje się za martwe, jeżeli nie występuje ruch oddechowy i nie można wykryć reakcji na niewielką stymulację mechaniczną. Należy usuwać wszystkie martwe ryby lub ryby będące wyraźnie w stanie agonalnym.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

Wyniki badania wykorzystuje się w celu uzyskania wartości stałej szybkości wydalania (k_2) jako funkcji całkowitej mokrej masy ryby. Stałą szybkości wzrostu, k_g , oblicza się na podstawie średniego wzrostu masy ryby i stosuje w stosownych przypadkach do uzyskania stałej szybkości wydalania skorygowanej pod kątem wzrostu, k_{2g} . Ponadto należy odnotowywać wydajność przyswajania (a ; absorpcję z jelita), kinetyczny współczynnik biomagnifikacji (BMF_k) (w stosownych przypadkach skorygowany pod kątem wzrostu, BMF_{kg}), jego wartość skorygowaną pod kątem zawartości lipidów (BMF_{kl} lub BMF_{kgl} , jeżeli jest skorygowany pod kątem rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu) oraz częstotliwość karmienia. Ponadto jeżeli można oszacować czas do osiągnięcia stanu równowagi w fazie wchłaniania (np. 95 % stanu równowagi lub $t_{95} = 3,0/k_2$), można włączyć oszacowanie BMF w stanie równowagi (BMF_{ss}) (por. pkt 105 i 106 oraz dodatek 5), jeżeli wartość t_{95} wskazuje na to, że mogły zostać osiągnięte warunki stanu równowagi. Aby uzyskać wartość skorygowaną pod kątem lipidów, tj. BMF_{ssl} , należy stosować w odniesieniu do tego BMF_{ss} tę samą korektę pod kątem zawartości lipidów, co w przypadku kinetycznie uzyskanego BMF (BMF_k) (należy zauważyć, że nie istnieje żadna uznana procedura dokonywania korekty BMF w stanie równowagi pod kątem rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu). Wzory i przykładowe obliczenia przedstawiono w dodatku 7. Istnieją metody pozwalające na oszacowanie kinetycznego współczynnika biokoncentracji (BCF_k) na podstawie danych uzyskanych w badaniu narażenia drogą pokarmową. Kwestię tę omówiono w dodatku 8.

Dane na temat masy/długości ciała ryb

Dane tabelaryczne dotyczące mokrej masy i długości poszczególnych ryb odnoszące się do wszystkich okresów zestawia się oddzielnie w przypadku grupy badanej i grupy kontrolnej we wszystkich dniach pobierania próbek w trakcie fazy wchłaniania (na początku wchłaniania od ryb z podstawowej populacji; pod koniec wchłaniania od ryb z grupy kontrolnej i z grupy badanej oraz, jeżeli są prowadzone, od grupy kontrolnej i grupy badanej we wczesnej fazie (np. 1–3 dnia wchłaniania) i fazie wydalania (np. 1, 2, 4, 7, 14, 28 dnia). Preferowaną miarą wzrostu na potrzeby korekty pod kątem rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu jest masa. Zobacz poniżej (pkt 162 i 163) oraz dodatek 5 w odniesieniu do metod(-y) stosowanej(-ych) do korygowania danych pod kątem rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu.

Dane dotyczące stężenia substancji badanej u ryb

Pomiary pozostałości substancji badanej u poszczególnych ryb (lub w zbiorczych próbkach ryb, jeżeli nie jest możliwe dokonanie pomiarów u poszczególnych ryb), wyrażone w postaci stężenia w mokrej masie (w/w), zestawia się w postaci tabeli w odniesieniu do ryb badanych i ryb kontrolnych dla poszczególnych okresów pobierania próbek. Jeżeli u każdej ryby, od której pobiera się próbki, przeprowadzono analizę lipidów, można uzyskać i podać w formie danych tabelarycznych poszczególne stężenia skorygowane pod kątem zawartości lipidów (w/w lipidów).

- Pomiary pozostałości substancji badanej u poszczególnych ryb (lub w zbiorczych próbkach ryb jeżeli nie jest możliwe dokonanie pomiarów u poszczególnych ryb, por. pkt 66) w odniesieniu do okresu wydalania przekształca się w logarytmy naturalne i wykreśla się na wykresie w stosunku do czasu (dni). Jeżeli kontrola wizualna wykresu wykazuje oczywiste wartości odstające, można zastosować statystycznie ważny test na wartość odstającą w celu usunięcia błędnych punktów danych, a także przedstawić udokumentowane uzasadnienie ich pominięcia.
- Korelację liniową bazującą na metodzie najmniejszych kwadratów oblicza się w oparciu o $\ln(\text{stężenia})$ w stosunku do danych dotyczących (dziennego) wydalania. Nachylenie i punkt przecięcia linii są odnotowywane jako ogólna stała szybkości wydalania (k_2) i naturalny logarytm z uzyskanego stężenia w czasie zerowym ($C_{0,d}$) (por. dodatek 5 i dodatek 7 aby uzyskać dodatkowe szczegółowe informacje). Jeżeli nie jest to możliwe ze względu na to, że stężenia przy drugim pobieraniu próbek w okresie wydalania mają wartość poniżej granicy oznaczalności, można zachowawczo oszacować wartość k_2 (por. dodatek 7).
- Wariacje w nachyleniu i punkcie przecięcia linii oblicza się, stosując standardowe procedury statystyczne oraz ocenione i przedstawione 90-procentowe (lub 95-procentowe) przedziały ufności wokół tych wyników.
- Mierzone średnie stężenie u ryby w ostatnim dniu wchłaniania (mierzone stężenie w czasie zerowym, $C_{0,m}$) również oblicza się i porównuje z uzyskaną wartością $C_{0,d}$. W przypadku gdy uzyskana wartość jest niższa niż wartość pomiarowa, taka różnica może świadczyć o obecności nieprzetrawionej wzbogaconej paszy w jelicie. Jeżeli uzyskana wartość jest zdecydowanie wyższa niż wartość pomiarowa, może to wskazywać, że wartość uzyskana z regresji liniowej danych z okresu wydalania jest błędna i powinna być ponownie oszacowana (zob. dodatek 7).

Szybkość wydalania i współczynnik biomagnifikacji

Aby obliczyć współczynnik biomagnifikacji z danych, należy najpierw uzyskać wartość wydajności przyswajania (wchłanianie substancji badanej na całej długości jelita). W tym celu należy zastosować równanie A7.1 z dodatku 7, do którego muszą być znane wartość uzyskanego stężenia u ryby w czasie zerowym fazy wydalania ($C_{0,d}$), (ogólnej) stałej szybkości wydalania (k_2), stężenia w paszy (C_{pasza}), stałej szybkości trawienia paszy (I) oraz długości okresu wchłaniania (t). Nachylenie i punkt przecięcia zależności liniowej między $\ln(\text{stężenia})$ a czasem wydalania są zgłaszane jako ogólna stała szybkości wydalania ($k_2 = \text{nachylenie}$) i stężenie w czasie zerowym ($C_{0,d} = e^{\text{punkt przecięcia}}$), jak powyżej. Uzyskane wartości należy sprawdzić pod kątem biologicznej wiarygodności (np. wydajność przyswajania jako ułamek nie jest wyższa niż 1). (I) oblicza się, dzieląc masę paszy przez masę karmionej codziennie ryby (jeżeli podaje się paszę w ilości 2 % masy ciała, (I) będzie wynosić 0,02). Częstotliwość karmienia stosowana w obliczeniach może jednak wymagać dostosowania pod kątem wzrostu ryb (można tego dokonać, stosując znaną stałą szybkości wzrostu do oszacowania masy ryb w każdym punkcie czasu w trakcie fazy wchłaniania; por. dodatek 7). Jeżeli nie jest możliwe ustalenie wartości k_2 i $C_{0,d}$ ze względu na to, że na przykład stężenia przy drugim pobieraniu próbek w okresie wydalania mają wartość poniżej granicy wykrywalności, można zachowawczo oszacować wartość k_2 oraz „górną granicę” BMF_k (por. dodatek 7).

Po ustaleniu wydajności przyswajania (a) współczynnik biomagnifikacji można obliczyć, mnożąc a przez wartość stałej szybkości trawienia (I) oraz dzieląc ją przez (ogólną) stałą szybkości wydalania (k_2). Współczynnik biomagnifikacji skorygowany pod kątem wzrostu oblicza się w ten sam sposób, lecz korzystając ze stałej szybkości wydalania skorygowanej pod kątem wzrostu (k_{2g} ; por. pkt 162 i 163. Wydajność przyswajania można oszacować w sposób alternatywny, jeżeli dokonano analizy tkanek u ryb, od których pobrano próbki we wczesnej fazie liniowej fazy wchłaniania; por. pkt 151 i dodatek 7. Wartość ta stanowi niezależny szacunek wydajności przyswajania w odniesieniu do organizmu zasadniczo niepoddanego narażeniu (tj. gdy ryby są na początku fazy wchłaniania). Aby uzyskać BMF wykorzystuje się zazwyczaj wartość wydajności przyswajania oszacowaną z danych dotyczących wydalania.

Korekta pod kątem zawartości lipidów i korekta pod kątem rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu

Na skutek wzrostu ryb w fazie wydalania mierzone stężenia substancji chemicznej w rybach mogą ulegać zmniejszeniu, w wyniku czego ogólna stała szybkości wydalania (k_2) będzie większa niż wynikałoby to z samych tylko procesów usuwania (np. metabolizmu, wydalania) (por. pkt 72). Zawartość lipidów w rybach doświadczalnych (ściśle związana z bioakumulacją substancji hydrofobowych) i zawartość lipidów w paszy mogą ulegać w praktyce takim zmianom, że niezbędna jest ich korekta w celu przedstawienia współczynników biomagnifikacji w sensowny sposób. Należy dokonać korekty współczynnika biomagnifikacji pod kątem rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu (tak ja w przypadku kinetycznego BCF w ramach metody narażenia drogą wodną) oraz pod kątem zawartości lipidów w paszy związanej z zawartością u ryb (współczynnik korygujący poziom lipidów). Równania i przykłady obliczeń można znaleźć odpowiednio w dodatku 5 i w dodatku 7.

W celu skorygowania rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu, należy obliczyć stałą szybkości wydalania skorygowaną pod kątem wzrostu (k_{2g}) (równania można znaleźć w dodatku 5). Tę stałą szybkości wydalania skorygowaną pod kątem wzrostu (k_{2g}) stosuje się następnie do obliczenia współczynnika biomagnifikacji skorygowanego pod kątem wzrostu, tak jak wskazano w pkt 73. W pewnych przypadkach taka metoda nie jest możliwa. Alternatywne podejście, które pozwala pominąć potrzebę korekty o rozcieńczenie wynikające ze wzrostu, polega na wykorzystaniu danych dotyczących masy substancji badanej przypadającej na wydalanie pojedynczej ryby (na podstawie całej ryby) zamiast normalnych danych dotyczących masy substancji badanej przypadającej na jednostkę masy ryb (stężenie). Można to łatwo osiągnąć, ponieważ badania według tej metody powinny wiązać zapisane stężenia w tkance z masą ciała poszczególnych ryb. Prostą procedurę umożliwiającą osiągnięcie tego celu przedstawiono w dodatku 5. Należy zwrócić uwagę, że k_2 musi zostać oszacowane i zgłoszone nawet w przypadku stosowania tej alternatywnej metody.

Aby dokonać korekty pod kątem zawartości lipidów w paszy i u ryby, w przypadku gdy nie przeprowadzono analizy zawartości lipidów u wszystkich ryb, od których pobrano próbki, ustala się średnie frakcje lipidowe (w/w) u ryb i w paszy⁽¹⁾. Współczynnik korygujący pod kątem lipidów (L) oblicza się wtedy, dzieląc średnią frakcję lipidową u ryb przez średnią frakcję lipidową w paszy. Aby obliczyć współczynnik biomagnifikacji skorygowany pod kątem zawartości lipidów, współczynnik biomagnifikacji, w zależności od zastosowania skorygowany pod kątem wzrostu lub nie, dzieli się przez współczynnik korygujący pod kątem zawartości lipidów.

Jeżeli analizę substancji chemicznej i analizę lipidów wykonywano u tej samej ryby i w każdym punkcie pobierania próbek, wówczas można wykorzystać dane dotyczące tkanki danej ryby skorygowane pod kątem zawartości lipidów do bezpośredniego obliczenia BMF skorygowanego pod kątem zawartości lipidów (por. (37)). Na wykresie przedstawiającym dane dotyczące stężenia skorygowanego pod kątem zawartości lipidów podano $C_{0,d}$ na podstawie lipidów oraz k_2 . Analizę matematyczną można przeprowadzić, stosując te same równania przedstawione w dodatku 7, lecz wydajność przyswajania (a) oblicza się, stosując stałą szybkości trawienia paszy znormalizowaną pod kątem lipidów (I_{lipidy}) i stężenie w pokarmie na podstawie zawartości lipidów ($C_{pasza-lipidy}$). Podobnie następnie stosuje się parametry skorygowane pod kątem zawartości lipidów do obliczenia BMF (należy zauważyć, że aby obliczyć BMF skorygowany pod kątem zawartości lipidów i pod kątem wzrostu $_{kgL}$, należy raczej również zastosować korektę stałej szybkości wzrostu w odniesieniu do frakcji lipidowej, nie zaś mokrą masę ryby).

Interpretacja wyników

Aby można było wykluczyć występowanie efektów toksycznych, średni wzrost zarówno w badanej grupie, jak i w grupie kontrolnej nie powinien się zasadniczo znacząco różnić. Należy porównać stałe szybkości wzrostu lub krzywe wzrostu obu grup, stosując stosowną procedurę⁽²⁾.

Sprawozdanie z badania

Po zakończeniu badania przygotowuje się sprawozdanie końcowe zawierające informacje dotyczące *substancji badanej*, *gatunku doświadczalnego* oraz *warunków badania*, jak ujęto w wykazie w pkt 81 (tak jak w przypadku metody narażenia drogą wodną). Ponadto konieczne są następujące informacje:

- (1) Podejście to dotyczy szczególnie badania narażenia drogą pokarmową i różni się ono od procedury stosowanej w ramach narażenia drogą wodną, stąd aby uniknąć pomyłki, używa się raczej słowa „korekta” zamiast słowa „normalizacja” – zob. również przypis w pkt 106.
- (2) Można wykonać test t-Studenta na stałych szybkości wzrostu, aby zbadać, czy istnieje różnica w zakresie wzrostu między grupą kontrolną a grupą badaną, lub test F w przypadku analizy wariancji. W razie konieczności można zastosować test F lub test ilorazu wiarygodności, które będą pomocne przy wyborze odpowiedniego modelu wzrostu (monografia OECD nr 54, (32)).

Substancja badana:

- wszelkie informacje dotyczące stabilności substancji badanej w przygotowywanej paszy;

Warunki badania:

- stężenie nominalne substancji w paszy, technika wzbogacania, ilość nośnika (lipidu) stosowanego w procesie wzbogacania paszy (o ile jest wykorzystany), pomiary stężenia substancji badanej we wzbogaconej paszy w odniesieniu do każdej analizy (co najmniej trzykrotnie przed rozpoczęciem badania i pod koniec wchłaniania) oraz średnie wartości;
- rodzaj i jakość nośnika w postaci oleju lub rozpuszczalnika (czystość, dostawca itp.) stosowane przy wzbogacaniu paszy;
- stosowany rodzaj paszy (przybliżona analiza ⁽¹⁾), czystość lub jakość, dostawca itp.), częstotliwość karmienia podczas fazy wchłaniania, ilość podawanej paszy i częstotliwość podawania (przy uwzględnieniu wszelkich dostosowań opartych na masie ryb, od których pobrano próbki);
- moment, w którym zabrano i uśmiercono ryby na potrzeby analizy substancji chemicznej w odniesieniu do każdego punktu pobierania próbek (np. godzinę przed karmieniem w następnym dniu);

Wyniki:

- wyniki wszelkich wstępnych czynności poprzedzających badanie;
- informacje dotyczące jakichkolwiek zaobserwowanych niekorzystnych skutków;
- pełen opis wszystkich stosowanych procedur analizy substancji chemicznej, w tym granice wykrywalności i oznaczenie ilościowe, zmienność i ustanie działania substancji;
- mierzone stężenia lipidów w paszy (paszy wzbogaconej i paszy dla grupy kontrolnej), poszczególne średnie wartości i odchylenia standardowe;
- zestawione dane tabelaryczne dotyczące masy (i długości) ryb powiązane z poszczególnymi rybami zarówno w odniesieniu do grupy kontrolnej, jak i grupy narażonej na działanie substancji (na przykład przy użyciu indywidualnych identyfikatorów w przypadku każdej ryby) oraz obliczenia, wyprowadzona(-e) stała(-e) szybkości wzrostu i 95-procentowy(-e) przedział(-y) ufności;
- zestawione dane tabelaryczne dotyczące stężenia substancji badanej u ryby, średnie mierzone stężenie pod koniec wchłaniania ($C_{0,m}$) oraz wyznaczona (ogólna) stała szybkości wydalania (k_2) i stężenie substancji u ryby na początku fazy wydalania ($C_{0,d}$) wraz z wariancjami tych wartości (nachyleniem i punktem przecięcia);
- zestawione dane tabelaryczne dotyczące zawartości lipidów u ryby (w stosownych przypadkach wymienione przy konkretnych stężeniach substancji), średnie wartości w odniesieniu do grupy badanej i grupy kontrolnej na początku badania, na końcu wchłaniania i na końcu wydalania;
- krzywe (w tym wszystkie zmierzone dane) wskazujące następujące wartości (w stosownych przypadkach stężenia można wyrazić w odniesieniu do całego ciała zwierzęcia lub jego określonych tkanek):
 - wzrost (tj. masa (i długość) ryby w stosunku do czasu) lub logarytm naturalny zmienionej masy w stosunku do czasu;
 - wydalanie substancji badanej u ryby; oraz
 - logarytm naturalny zmienionego stężenia (\ln stężenia) w stosunku do czasu wydalania (w tym wyznaczona stała szybkości wydalania k_2) oraz logarytm naturalny wyznaczonego stężenia na początku fazy wydalania, $C_{0,d}$);
- jeżeli kontrola wizualna wykresu wykazuje oczywiste wartości odstające, można zastosować statystycznie ważny test na wartość odstającą w celu usunięcia błędnych punktów danych, a także przedstawić udokumentowane uzasadnienie ich pominięcia;

⁽¹⁾ Technika analizy paszy pod kątem białka, lipidów, włókna surowego i zawartości popiołu; informacje te zazwyczaj można uzyskać od dostawcy paszy.

- obliczona stała szybkości wydalania skorygowana pod kątem wzrostu i okres półtrwania skorygowany pod kątem wzrostu;
- obliczona wydajność przyswajania (α);
- „nieprzetworzony” pokarmowy BMF, kinetyczny BMF skorygowany pod kątem zawartości lipidów i pod kątem rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu („nieprzetworzony” i skorygowany pod kątem zawartości lipidów w oparciu o mokrą masę całej ryby), w stosownych przypadkach BMF specyficzny dla tkanek;
- wszelkie informacje dotyczące metabolitów substancji badanych znakowanych izotopem i ich nagromadzenia;
- wszystko, co odbiega od normy, jeżeli chodzi o badanie, wszelkie odchylenia od tych procedur oraz wszelkie inne ważne informacje;
- tabela podsumowująca zawierająca istotne zmierzone i policzone dane, jak przedstawiono poniżej:

Stałe szybkości wydalania substancji oraz współczynniki biomagnifikacji (BMF _k)	
k_g (stała szybkości wzrostu; dzień ⁻¹):	podać wartość (95 % CI) ⁽¹⁾
k_2 (ogólna stała szybkości wydalania, dzień ⁻¹):	podać wartość (95 % CI)
k_{2g} (stała szybkości wydalania skorygowana pod kątem wzrostu; dzień ⁻¹):	podać wartość (95 % CI) ⁽¹⁾
$C_{0,m}$ (zmierzone stężenie w czasie zerowym, stężenie u ryby na koniec wchłaniania) (µg/g):	podać wartość ± SD ⁽²⁾
$C_{0,d}$ (wyprowadzona wartość stężenia w czasie zerowym fazy wydalania; µg/g):	podać wartość ± SD ⁽²⁾
I (wyznaczona częstotliwość spożywania pokarmu; g pokarmu / g masy ciała ryby dziennie):	podać wartość
I_g (faktyczna częstotliwość karmienia dostosowana do szybkości wzrostu; g pokarmu / g masy ciała ryby dziennie) ⁽²⁾ :	podać wartość ± SD ⁽²⁾
C_{pasza} (stężenie substancji chemicznej w pokarmie; µg/g):	podać wartość ± SD ⁽²⁾
α (wydajność przyswajania substancji):	podać wartość ± SD ⁽²⁾
BMF _k (kinetyczny pokarmowy BMF):	podać wartość (95 % CI) ⁽¹⁾
BMF _{kg} (skorygowany pod kątem wzrostu kinetyczny pokarmowy BMF):	podać wartość (95 % CI) ⁽¹⁾
$t_{1/2g}$ (skorygowany pod kątem wzrostu okres półtrwania w dniach):	podać wartość ± SD ⁽²⁾
L_c (współczynnik korygujący poziom lipidów):	podać wartość
BMF _{kgL} (skorygowany pod kątem lipidów i wzrostu kinetycznego BMF):	podać wartość
BMF _{ss-L} (orientacyjny BMF w stanie równowagi skorygowany pod kątem lipidów) ⁽²⁾ :	podać wartość ± SD ⁽²⁾

⁽¹⁾ CI: przedział ufności (jeżeli można go oszacować)

⁽²⁾ SD: odchylenie standardowe (jeżeli można je oszacować)

BIBLIOGRAFIA

- (1) Chapter C.13 of this Annex, *Bioconcentration: Flow-through Fish Test*.
- (2) Chapter A.6 of this Annex, *Water Solubility*
- (3) Li A, Doucette W.J. (1993), The effect of cosolutes on the aqueous solubilities and octanol/water partition coefficients of selected polychlorinated biphenyl congeners. *Environ Toxicol Chem* 12: 2031-2035
- (4) Chapter A.8 of this Annex, *Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method*.
- (5) Chapter A.24 of this Annex, *Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method*.
- (6) Chapter A.23 of this Annex, *Partition Coefficient (1-Octanol/Water): Slow-Stirring Method*.
- (7) Chapter C.7 of this Annex, *Hydrolysis as a Function of pH*.
- (8) (OECD (1997), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Number 7: Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water [OCDE/GD\(97\)21](#). Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.
- (9) Chapter A.5 of this Annex, *Surface Tension of Aqueous Solutions*.
- (10) Chapter A.4 of this Annex, *Vapour Pressure*.
- (11) Chapter C.4 of this Annex, *Ready Biodegradability*.
- (12) Chapter C.29 of this Annex, *Ready Biodegradability – CO₂ in sealed vessels*
- (13) Connell D.W. (1988), Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 102: 117-156.
- (14) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. *SAR QSAR Environ. Res.* 1: 29-39.
- (15) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.
- (16) Brown R.S., Akhtar P., Åkerman J., Hampel L., Kozin I.S., Villerius L.A. and Klamer H.J.C. (2001), Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. *Environ. Sci. Technol.* 35: 4097-4102.
- (17) Fernandez J.D., Denny J.S. and Tietge J.E. (1998), A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin to commercially available pelletized fish food. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2058-2062.
- (18) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N., Whiteman F.W. and Dawson T.D. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2', 5,5'-tetrachlorobiphenyl. *Toxicol. Sci.* 77: 206-218.
- (19) Parkerton T.F., Arnot J.A., Weisbrod A.V., Russom C., Hoke R.A., Woodburn K., Traas T., Bonnell M., Burkhard L.P. and Lampi M.A. (2008), Guidance for evaluating *in vivo* fish bioaccumulation data. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 4: 139-155.
- (20) Verbruggen E.M.J., Beek M., Pijnenburg J. and Traas T.P. (2008). Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2436-2448.
- (21) Schlechtriem C., Fliedner A. and Schäfers C. (2012), Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of OECD Test Guideline 305. *Environmental Sciences Europe* 2012, 24:13. published: 3 April 2012.

- (22) Chapter C.47 of this Annex, *Fish, Early-Life Stage Toxicity Test*.
- (23) Chapter C.15 of this Annex, *Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages*
- (24) Chapter C.14 of this Annex, *Fish, Juvenile Growth Test*.
- (25) OECD (2000), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures ENV/JM/MONO(2000)6. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.
- (26) US-EPA (1994), Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors 822-R-94-002. US EPA, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, USA.
- (27) US-FDA (1999), Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA.
- (28) US-EPA (1974), Section 5, A (1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson, J.F., Editor. US-EPA, Research Triangle Park, NC, USA
- (29) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- (30) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A. and Parrish C.C. (1985), Micromethod for lipids in aquatic invertebrates. *Limnol. Oceanogr.* 30: 1099-1105.
- (31) Smedes F. (1999), Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. *Analyst.* 124: 1711-1718.
- (32) OECD (2006), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54: Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. ENV/JM/MONO(2006)18. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.
- (33) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2271-2280.
- (34) Springer T.A. (2009), Statistical Research Related to Update of OECD Guideline 305. Wildlife International, Ltd, Easton, MD, USA.
- (35) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1168-1177.
- (36) Parkerton T., Letinski D., Febbo E., Davi R., Dzambia C., Connelly M., Christensen K. and Peterson D. (2001), A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (presentation). in SETAC Europe 12th Annual Meeting: Madrid, Spain.
- (37) Fisk A.T., Cymbalisky C.D., Bergman Å. and Muir D.C.G. (1996), Dietary accumulation of C₁₂- and C₁₆-chlorinated alkanes by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 1775-1782.
- (38) Anonymous (2004), Fish, dietary bioaccumulation study – Basic protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- (39) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- (40) Bruggeman W.A., Opperhuizen A., Wijbenga A. and Hutzinger O. (1984), Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, *Toxicol. Environ. Chem.* 7: 173-189.
- (41) Muir D.C.G., Marshall W.K. and Webster G.R.B. (1985), Bioconcentration of PCDDs by fish: effects of molecular structure and water chemistry. *Chemosphere.* 14: 829-833.

- (42) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environ. Sci. Technol.* 23: 699-707.
 - (43) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N. and Whiteman F.W. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. Stimulation of chronic exposure scenarios. *Toxicol. Sci.* 77: 219-229.
 - (44) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 5: 624-637.
 - (45) Sijm D.T.H.M. and van der Linde A. (1995), Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. *Environ. Sci. Technol.* 29: 2769-2777.
 - (46) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
 - (47) Fisk A.T., Norstrom R.J., Cymbalisty C.D. and Muir D.G.G. (1998), Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 951-961.
 - (48) McGrath J.A., Parkerton T.F. and Di Toro D.M. (2004), Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2503-2517.
 - (49) Poppendieck D.G. (2002), Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Desorption Mechanisms from Manufactured Gas Plant Site Samples. Dissertation. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, USA.
 - (50) McCarty L.S. and Mackay D. (1993), Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. *Environ. Sci. Technol.* 27: 1718-1728.
 - (51) OECD (2012), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 175: Part I – Validation Report of a ring test for the OECD TG 305 dietary exposure bioaccumulation fish test. Part II – Additional Report including comparative analysis of trout and carp results ENV/JM/MONO (2012)20. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.
-

Dodatek 1

DEFINICJE I JEDNOSTKI

Wydajność przyswajania (a) stanowi miarę względnej ilości substancji przyswajanej przez organizm z jelit (choć wartości a nie wyraża się w żadnych jednostkach, najczęściej przedstawia się ją jako odsetek, a nie jako ułamek).

Bioakumulacja zasadniczo oznacza proces, w ramach którego stężenie substancji w organizmie osiąga poziom przekraczający poziom stężenia substancji w substancji lub mieszaninie wykorzystywanej do celów oddechowych (np. woda w przypadku ryb lub powietrze w przypadku ssaków), w pokarmie lub w obydwu tych nośnikach(1).

Biokoncentracja oznacza wzrost stężenia substancji badanej w danym organizmie lub na nim (lub określonych tkankach tego organizmu) w stosunku do stężenia substancji badanej w ośrodku.

Współczynnik biokoncentracji (BCF lub K_b) w dowolnym momencie fazy wchłaniania w ramach przedmiotowego testu akumulacji odpowiada stężeniu substancji badanej w/na rybach lub ich określonych tkankach (C_p , wyrażone w mg/kg) podzielonemu przez stężenie substancji w ośrodku (C_w , wyrażone w mg/l). BCF wyraża się w $l\ kg^{-1}$. Należy pamiętać o tym, że korekty pod kątem wzrostu lub standardowej zawartości lipidów nie są brane pod uwagę.

Biomagnifikacja oznacza wzrost stężenia substancji badanej w lub na danym organizmie (lub w określonych tkankach tego organizmu) w stosunku do stężenia substancji badanej w pokarmie.

Współczynnik biomagnifikacji (BMF) oznacza stężenie substancji w organizmie drapieżnika w stosunku do stężenia substancji w organizmie ofiary drapieżnika (lub w pokarmie) w stanie równowagi. Zgodnie z metodą opisaną w niniejszej metodzie badawczej dokłada się starań, aby unikać narażenia na działanie substancji w fazie wodnej, dlatego też wartość BMF uzyskana dzięki zastosowaniu niniejszej metody badawczej nie może zostać bezpośrednio porównana z wartością BMF ustaloną w oparciu o wyniki badania w terenie (w ramach którego dopuszcza się możliwość narażenia na działanie substancji zarówno drogą wodną, jak i drogą pokarmową).

Pokarmowy współczynnik biomagnifikacji (pokarmowy BMF) to termin stosowany w ramach niniejszej metody badawczej do opisanie wyniku testu narażenia drogą pokarmową, w którym dokłada się starań, aby unikać narażenia na działanie substancji w fazie wodnej, dlatego też wartość BMF uzyskana dzięki zastosowaniu niniejszej metody badawczej nie może zostać bezpośrednio porównana z wartością BMF ustaloną w oparciu o wyniki badania w terenie (w ramach którego dopuszcza się możliwość narażenia na działanie substancji zarówno drogą wodną, jak i drogą pokarmową).

Faza wydalania lub faza po narażeniu na działanie substancji (utrata) to okres następujący po przeniesieniu ryb doświadczalnych z ośrodka zawierającego substancję badaną do ośrodka wolnego od tej substancji, w trakcie którego bada się przebieg procesu wydalania (lub utraty netto) substancji z organizmu ryb doświadczalnych (lub z określonych tkanek tych ryb).

Stała szybkości wydalania (utrata) (k_2) oznacza wartość liczbową określającą szybkość zmniejszania stężenia substancji badanej u ryb doświadczalnych (lub w określonych tkankach tych ryb) po przeniesieniu ryb doświadczalnych z ośrodka zawierającego substancję badaną do ośrodka wolnego od tej substancji (k_2 wyraża się w dniach⁻¹).

Rozpuszczalny węgiel organiczny (RWO) to miara stężenia węgla pochodzącego z rozpuszczonych źródeł organicznych w ośrodkach wykorzystywanych w badaniu.

Faza narażenia na działanie substancji lub faza wchłaniania to okres, w którym ryby są narażone na działanie substancji badanej.

Częstotliwość karmienia (I) oznacza średnią ilość pokarmu spożywaną przez każdą rybę każdego dnia w zestawieniu z szacunkową średnią masą całego ciała ryby (wyrażoną w g pokarmu / g masy ciała ryby dziennie).

Kinetyczny współczynnik biokoncentracji (BCF_k) to stosunek stałej szybkości wchłaniania k_1 do stałej szybkości wydalania k_2 (tj. k_1/k_2 – zob. stosowne definicje w niniejszym dodatku). Zasadniczo wartość tego współczynnika powinna być porównywalna z wartością BCF_{ss} (zob. definicja powyżej), ale może dojść do wystąpienia odchyień w przypadku braku pewności co do stanu równowagi lub w przypadku gdy kinetyczny współczynnik BCF został skorygowany pod kątem wzrostu.

Kinetyczny współczynnik biokoncentracji znormalizowany pod kątem lipidów (BCF_{kl}) został znormalizowany do ryb, u których zawartość lipidów wynosi 5 %.

Kinetyczny współczynnik biokoncentracji znormalizowany pod kątem lipidów i skorygowany pod kątem wzrostu (BCF_{kg}) został znormalizowany do ryb, u których zawartość lipidów wynosi 5 %, i skorygowany pod kątem wzrostu w okresie badania, jak opisano w dodatku 5.

Znormalizowany pod kątem lipidów współczynnik biokoncentracji w stanie równowagi (BCF_{ssl}) został znormalizowany dla ryb, u których zawartość lipidów wynosi 5 %.

Substancja wieloskładnikowa została zdefiniowana do celów REACH jako substancja zawierająca więcej niż jeden składnik główny w stężeniu mieszczącym się w zakresie od 10 % do 80 % (w/w).

Współczynnik podziału *n*-oktanol/woda (K_{ow}) to szybkość rozpuszczalności substancji w *n*-oktanolu i wodzie w stanie równowagi (metody A.8 (2), A.24 (3), A.23 (4)); wyrażany również jako P_{ow} . Logarytm K_{ow} wykorzystuje się jako wskaźnik zdolności substancji chemicznej do bycia przedmiotem biokoncentracji przez organizmy wodne.

Węgiel organiczny w postaci cząstek stałych (POC) to miara stężenia węgla pochodzącego ze źródeł organicznych zawieszonych w pożywce.

Mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME) to bezrozpuszczalnikowa technika analityczna opracowana z myślą o układach rozcieńczających. W ramach tej metody włókno pokryte polimerem poddaje się działaniu fazy gazowej lub ciekłej zawierającej analit stanowiący przedmiot zainteresowania. Zasadniczo stosuje się minimalny czas analizy, aby osiągnąć równowagę między fazą stałą i płynną u gatunków będących przedmiotem pomiaru. Następnie określa się stężenie analitu będącego przedmiotem zainteresowania bezpośrednio na włóknie lub po pobraniu analitu z włókna i przeniesieniu go do rozpuszczalnika, w zależności od stosowanej techniki oznaczania.

Stan równowagi zostaje osiągnięty na wykresie stężenia substancji badanej u ryb (C_f) w stosunku do czasu, w momencie gdy krzywa zaczyna biec równoległe do osi czasu, a wyniki trzech kolejnych analiz poziomu C_f przeprowadzonych na próbkach pobranych w co najmniej dwudniowych odstępach będą odbiegały od siebie najwyżej o ± 20 % oraz między pierwszą a ostatnią analizą nie nastąpi istotny wzrost poziomu C_f . W przypadku próbek zbiorczych należy przeprowadzić co najmniej cztery następujące po sobie analizy. W przypadku substancji badanych o wolnym tempie absorpcji odstępy czasu pomiędzy analizami powinny wynosić odpowiednio siedem dni.

Współczynnik biokoncentracji w stanie równowagi (BCF_{ss}) nie zmienia się w istotnym stopniu w długim okresie, ponieważ stężenie substancji badanej w ośrodku utrzymuje się w tym czasie na stałym poziomie (por. definicja stanu równowagi).

Całkowity węgiel organiczny (TOC) to miara stężenia węgla pochodzącego ze wszystkich źródeł organicznych w pożywkach, uwzględniając źródła w postaci cząstek stałych i źródła w postaci cząstek rozpuszczonych.

Stała szybkości wchłaniania (k_1) to wartość liczbowa określająca szybkość wzrostu stężenia substancji badanej w/na rybach doświadczalnych (lub ich określonych tkankach) w przypadku narażenia ryb na działanie danej substancji (k_1 wyraża się w $l\ kg^{-1}\ dzień^{-1}$).

Substancje o nieznanym lub zmiennym składzie, złożone produkty reakcji lub materiały biologiczne określa się jako UVCB.

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Badana substancja chemiczna oznacza każdą substancję lub mieszaninę badaną za pomocą niniejszej metody badawczej.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. i Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: s. 624–637

-
- (2) . Rozdział A.8 niniejszego załącznika, *Współczynnik podziału (n-oktanol/woda): metoda wytrząsania w kolbie*.
- (3) Rozdział A.24 niniejszego załącznika, *Współczynnik podziału (n-oktanol/woda), metoda HPLC*.
- (4) Rozdział A.23 niniejszego załącznika, *Współczynnik podziału (1-oktanol/woda): metoda powolnego mieszania*.
-

Dodatek 2

NIEKTÓRE WŁAŚCIWOŚCI CHEMICZNE DOPUSZCZALNEJ WODY ROZCIEŃZAJĄCEJ

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

Dodatek 3

GATUNKI RYB ZALECANE DO BADANIA

Zalecany gatunek	Zalecany zakres temperatur przeprowadzania badania (°C)	Zalecana długość całkowita zwierzęcia doświadczalnego (cm) ⁽²⁾
<i>Danio rerio</i> ⁽¹⁾ (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Danio pręgowany	20 – 25	3,0 ± 0,5
<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Strzebla wielkogłowa	20 – 25	5,0 ± 2,0
<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linneusz) Karp	20 – 25	8,0 ± 4,0 ⁽³⁾
<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck i Schlegel) Ryżanka japońska	20 – 25	4,0 ± 1,0
<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Cytrynówka	20 – 25	3,0 ± 1,0
<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) Bass niebieski	20 – 25	5,0 ± 2,0
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) Pstrąg tęczowy	13 – 17	8,0 ± 4,0
<i>Gasterosteus aculeatus</i> (Teleostei, Gasterosteidae) (Linneusz) Ciernik	18 – 20	3,0 ± 1,0

⁽¹⁾ Meyer *et al.* (1)

⁽²⁾ Należy podkreślić, że w trakcie badania za preferowaną miarę wielkości i podstawę dla wyliczania wartości w oparciu o stałą szybkości wzrostu uznaje się masę. Przyjmuje się jednak, że długość stanowi bardziej praktyczną właściwość w przypadku konieczności wzrokowego doboru ryb na początku doświadczenia (tj. doboru z populacji stada).

⁽³⁾ Przedstawiony zakres długości został wyznaczony w metodach badawczych stosowanych w odniesieniu do nowych substancji chemicznych itp. w oparciu o japońskie prawo w zakresie kontroli substancji chemicznych (CSCL).

Różne inne gatunki występujące na obszarach przyujściowych i różne inne gatunki morskie są mniej powszechnie wykorzystywane, na przykład:

Spot	(<i>Leiostomus xanthurus</i>)
Karpieńec zmienny	(<i>Cyprinodon variegatus</i>)
Menidia beryllka	(<i>Menidia beryllina</i>)
Szumień mały	(<i>Cymatogaster aggregata</i>)
Jodnica	(<i>Parophrys vetulus</i>)
Głowacz zbrojny	(<i>Leptocottus armatus</i>)
Ciernik	(<i>Gasterosteus aculeatus</i>)
Labraks	(<i>Dicentrarchus labrax</i>)
Ukleja	(<i>Alburnus alburnus</i>)

Ryby słodkowodne wymienione w tabeli powyżej są łatwe w hodowli lub powszechnie dostępne przez cały rok, natomiast dostępność gatunków morskich i gatunków zamieszkujących obszary przyujściowe jest częściowo ograniczona do terytorium poszczególnych państw. Ryby te nadają się do hodowania i rozmnażania zarówno w gospodarstwach rybackich, jak i w laboratoriach, w warunkach zapewniających im odpowiednią ochronę przed chorobami i pasożytami, co przyczynia się do zagwarantowania odpowiedniego stanu zdrowia danego zwierzęcia doświadczalnego oraz możliwości prześledzenia jego pochodzenia. Wspomniane ryby występują w różnych częściach świata.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Meyer A., Biermann C.H. and Orti G. (1993), The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method Proc. R. Soc. Lond. B. 252: 231-236.
-

Dodatek 4

**HARMONOGRAMY POBIERANIA PRÓBEK NA POTRZEBY BADAŃ NARAŻENIA DROGĄ WODNĄ
I POKARMOWĄ**

1. Teoretyczny przykład harmonogramu pobierania próbek na potrzeby pełnego badania biokoncentracji, w ramach którego dochodzi do narażenia na działanie substancji podanej w wodzie przy wartości $\log K_{ow} = 4$.

Pobieranie próbek ryb	Harmonogram terminów pobierania próbek		Liczba próbek wody ⁽¹⁾	Liczba ryb na próbkę ⁽¹⁾
	Minimalna wymagana częstotliwość (dni) ⁽²⁾	Dodatkowe pobieranie próbek (dni) ⁽²⁾		
Faza wchłaniania				
1	- 1		2 ⁽³⁾	4 ⁽⁴⁾
	0		2)	(3 ⁽⁶⁾)
2	0,3		2	4
		0,4	2)	4)
3	0,6		2	4
		0,9	2)	4)
4	1,2		2	4
		1,7	2)	4)
5	2,4		2	4
		3,3	2)	4)
6	4,7		2	4 – 8 ⁽⁵⁾
				(3 ⁽⁶⁾)
Faza wydalania				Należy przenieść ryby do wody wolnej od badanej substancji
7	5,0		2	4
		5,3		4)
8	5,9		2	4
		7,0		4)
9	9,3		2	4
		11,2		4)

Pobieranie próbek ryb	Harmonogram terminów pobierania próbek		Liczba próbek wody ⁽¹⁾	Liczba ryb na próbkę ⁽¹⁾
	Minimalna wymagana częstotliwość (dni) ⁽²⁾	Dodatkowe pobieranie próbek (dni) ⁽²⁾		
Faza wchłaniania				
10	14,0		2	4 – 8 ⁽⁵⁾
		17,5		(4+3 ⁽⁶⁾)
OGÓŁEM				40–72 (48 – 80) ⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Wartości w nawiasach oznaczają liczbę próbek (wody, ryb), które należy pobrać w przypadku przeprowadzania dodatkowego pobierania próbek.

⁽²⁾ Szacunkowe oznaczenie k_2 dla $\log K_{ow}$ z 4,0 przed badaniem wynosi $0,652 \text{ dni}^{-1}$. Łączny czas trwania doświadczenia wynosi $3 \times t_{ss} = 3 \times 4,6$ dni, tj. 14 dni. Dodatkowe informacje na temat sporządzania szacunków t_{ss} przedstawiono w dodatku 5.

⁽³⁾ Próbkę wody po dostarczeniu co najmniej trzech „objętości komory”.

⁽⁴⁾ Próbkę tych ryb pobiera się z populacji stada.

⁽⁵⁾ W przypadku potrzeby przeprowadzenia bardziej precyzyjnych badań lub badań metabolizmu, które muszą zostać przeprowadzone na większej liczbie ryb, próbki ryb należy pobierać w szczególności pod koniec fazy wchłaniania i wydalania (por. pkt 40).

⁽⁶⁾ Co najmniej trzy dodatkowe ryby mogą być potrzebne do celów przeprowadzenia analizy zawartości lipidów w przypadku braku możliwości wykorzystania tych samych ryb, z których pobrano próbki na potrzeby analizy stężeń substancji na początku badania, pod koniec fazy wchłaniania i pod koniec fazy wydalania. Należy zwrócić uwagę na fakt, że w większości przypadków powinno być możliwe przeprowadzenie badania wyłącznie na trzech rybach kontrolnych (por. pkt 56).

2. Teoretyczny przykład harmonogramu pobierania próbek na potrzeby badania bioakumulacji pokarmowej substancji po 10-dniowej fazie wchłaniania i 42-dniowej fazie wydalania.

Pobranie próbek	Harmonogram terminów pobierania próbek		Liczba próbek pokarmu	Liczba ryb na próbkę	
	Dzień fazy	Dodatkowe próbki ryb?		Grupa badana	Grupa kontrolna
Faza wchłaniania					
1	0	Dopuszczalne ⁽¹⁾ ⁽²⁾	3 – grupa badana	0	5 – 10
			3 – grupa kontrolna ⁽¹⁾		(8 – 13) ⁽²⁾
1A ⁽³⁾	1 – 3			5 – 10	5 – 10
2	10	Tak ⁽⁴⁾	3 – grupa badana	10 – 15 ⁽⁴⁾	5 – 10
			3 – grupa kontrolna ⁽¹⁾	(13 – 18) ⁽⁵⁾	(8 – 13) ⁽⁵⁾
Faza wydalania					
3	1	Tak ⁽⁴⁾		10 – 15 ⁽⁴⁾	5 – 10
4	2			5 – 10	5 – 10
5	4			5 – 10	5 – 10

Pobranie próbek	Harmonogram terminów pobierania próbek		Liczba próbek pokarmu	Liczba ryb na próbkę	
	Dzień fazy	Dodatkowe próbki ryb?		Grupa badana	Grupa kontrolna
Faza wchłaniania					
6	7	Tak ⁽⁴⁾		10 – 15 ⁽⁴⁾	5 – 10
7	14			5 – 10	5 – 10
8	28			5 – 10	5 – 10
9	42	Tak ⁽⁴⁾		10 – 15 ⁽⁴⁾ (13 – 18) ⁽⁵⁾	5 – 10 (8 – 13) ⁽⁵⁾
OGÓŁEM				59 – 120 (63 – 126) ⁽⁴⁾ ⁽⁵⁾	50 – 110 (56 – 116) ⁽⁴⁾ ⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Trzy próbki pokarmu pobrane z grupy kontrolnej i z grupy badanej przeanalizowane pod kątem stężeń substancji badanej oraz pod kątem zawartości lipidów.

⁽²⁾ Ryby pobiera się z populacji stada możliwie jak najszybciej po rozpoczęciu badania; z co najmniej trzech ryb pobranych z populacji stada na początku badania należy pobrać próbki w celu przeanalizowania ich pod kątem zawartości lipidów.

⁽³⁾ (Fakultatywne) pobieranie próbek na wczesnym etapie fazy wchłaniania umożliwia zgromadzenie danych niezbędnych do obliczenia szybkości wchłaniania substancji badanej drogą pokarmową, które można porównać z wartością współczynnika wydajności przyswajania obliczonego w oparciu o dane pochodzące z fazy wydalania.

⁽⁴⁾ Na potrzeby analizy konkretnej tkanki dopuszcza się możliwość pobrania próbek z pięciu dodatkowych ryb.

⁽⁵⁾ Co najmniej trzy dodatkowe ryby mogą być potrzebne do celów przeprowadzenia analizy zawartości lipidów w przypadku braku możliwości wykorzystania tych samych ryb, z których pobrano próbki na potrzeby analizy stężeń substancji na początku badania, pod koniec fazy wchłaniania i pod koniec fazy wydalania. Należy zwrócić uwagę na fakt, że w większości przypadków powinno być możliwe przeprowadzenie badania wyłącznie na trzech rybach kontrolnych (por. pkt 56 i 153).

Uwaga dotycząca czasu trwania poszczególnych faz i terminów pobierania próbek: faza wchłaniania rozpoczyna się w chwili pierwszego podania wzbogaconego pokarmu. Dzień doświadczalny rozpoczyna się w chwili karmienia i kończy się tuż przed kolejnym karmieniem 24 godziny później. Pierwsze pobranie próbek (oznaczone jako „1” w tabeli) powinno nastąpić na krótko przed (np. godzinę przed) pierwszym karmieniem. Pobieranie próbek w trakcie badania najlepiej przeprowadzić tuż przed czasem karmienia przypadającym kolejnego dnia (tj. około 23 godziny po karmieniu przypadającym w dniu pobrania próbek). Faza wchłaniania kończy się tuż przed pierwszym karmieniem niewzbogaconym pokarmem, kiedy to rozpoczyna się faza wydalania (ryby należące do grupy badanej będą prawdopodobnie w dalszym ciągu trawiły wzbogacony pokarm przez 24 godziny od ostatniego karmienia wzbogaconym pokarmem). Oznacza to, że próbkę pobieraną pod koniec fazy wchłaniania należy pobrać tuż przed pierwszym karmieniem niewzbogaconym pokarmem, natomiast pierwszą próbkę pobieraną w fazie wydalania należy pobrać mniej więcej po upływie 23 godzin od czasu pierwszego karmienia niewzbogaconym pokarmem.

Dodatek 5

OGÓLNE OBLICZENIA

1. Wprowadzenie
2. Prognoza czasu trwania fazy wchłaniania
3. Prognozowanie czasu trwania fazy wydalania
4. Metoda sekwencyjna: ustalanie wartości stałej szybkości wydalania (utruty) substancji k_2
5. Metoda sekwencyjna: ustalanie stałej szybkości wchłaniania k_1 (dotyczy wyłącznie metody narażenia drogą wodną)
6. Metoda równoległego obliczania stałych szybkości wchłaniania i wydalania (utruty) substancji (dotyczy wyłącznie metody narażenia drogą wodną)
7. Korekta wartości kinetycznego BCF i BMF z tytułu rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu
8. Normalizacja lipidów do poziomu 5-procentowej zawartości lipidów (dotyczy wyłącznie metody narażenia drogą wodną)

1. WPROWADZENIE

Ogólny model bioakumulacji substancji podawanej w wodzie u ryb można opisać pod względem procesów wchłaniania i wydalania substancji, pomijając wchłanianie substancji podawanej z pokarmem. Wynik równania różniczkowego (dC_f/dt) opisującego szybkość zmiany wysokości stężenia u ryb (mg kg^{-1} dzień $^{-1}$) uzyskuje się, przeprowadzając następujące działanie (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \quad [\text{Równanie A5.1}]$$

gdzie:

k_1 = stała szybkości reakcji pierwszego rzędu przy wchłanianiu substancji przez ryby ($\text{l} \cdot \text{kg}^{-1}$ dzień $^{-1}$)

k_2 = stała szybkości reakcji pierwszego rzędu przy wydalaniu substancji z ryb (dzień $^{-1}$)

k_g = stała szybkości reakcji pierwszego rzędu dla wzrostu ryb („rozcieńczenie wynikające ze wzrostu”) (dzień $^{-1}$)

k_m = stała szybkości reakcji pierwszego rzędu dla przekształceń metabolicznych (dzień $^{-1}$)

k_e = stała szybkości reakcji pierwszego rzędu dla wydalania odchodów (dzień $^{-1}$)

C_w = stężenie w wodzie (mg l^{-1})

C_f = stężenie u ryb (mg kg^{-1} mokrej masy).

W przypadku substancji wykazujących zdolność do bioakumulacji można przyjąć, że średnia ważona czasem (TWA) stanowi najistotniejszy wskaźnik stężenia ekspozycyjnego w wodzie (C_w) w dopuszczalnym zakresie fluktuacyjnym (por. pkt 24). Zaleca się, aby obliczać TWA stężenia substancji w wodzie zgodnie z procedurą przedstawioną metodzie badawczej C.20 w dodatku 6 (2). Należy podkreślić, że przekształcenie logarymiczne stężenia w wodzie uznaje się za odpowiednie, jeżeli oczekuje się, że między okresami wymiany nastąpi rozpad naturalny, np. w ramach planu badania półstatycznego. W przypadku przepływu dyfuzyjnego przeprowadzenie przekształcenia logarymicznego w odniesieniu do stężeń ekspozycyjnych może nie być konieczne. Jeżeli TWA stężenia substancji w wodzie zostały wyprowadzone, powinny zostać zgłoszone i być wykorzystywane w późniejszych obliczeniach.

W ramach standardowego badania BCF u ryb fazę wchłaniania i wydalania można opisać w kontekście procesów kinetyki pierwszego rzędu.

$$\text{Szybkość wchłaniania} = k_1 \times C_w \quad [\text{Równanie A5.2}]$$

$$\text{Ogólny wskaźnik utraty} = (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \quad [\text{Równanie A5.3}]$$

W stanie równowagi, przy założeniu że wzrost i metabolizm są pomijalne (tj. wartości k_g i k_m są praktycznie równe zero), szybkość wchłaniania jest równa szybkości wydalania, co oznacza, że połączenie równania A5.2 i A5.3 daje następującą zależność:

$$\text{BCF} = \frac{C_f - \text{ss}}{C_w - \text{ss}} = \frac{k_1}{k_2} \quad [\text{Równanie A5.4}]$$

gdzie:

$C_{f-\text{ss}}$ = stężenie u ryb w stanie równowagi (mg kg^{-1} mokrej masy)

$C_{w-\text{ss}}$ = stężenie w wodzie w stanie równowagi (mg l^{-1}).

Stosunek k_1/k_2 określa się jako kinetyczny BCF (BCF_k), którego wartość powinna być równa wartości BCF w stanie równowagi (BCF_{ss}) uzyskanej po podzieleniu stężenia u ryb w stanie równowagi przez stężenie w wodzie w stanie równowagi, przy czym może dojść do wystąpienia odchyień w przypadku braku pewności co do stanu równowagi lub w przypadku gdy kinetyczny BCF został skorygowany o wzrost. Ponieważ jednak k_1 i k_2 są stałymi, osiągnięcie stanu równowagi nie jest konieczne do wyprowadzenia BCF_k .

W niniejszym dodatku 5 przedstawiono ogólne obliczenia przeprowadzane w oparciu o przywołane równania pierwszego rzędu, których dokonanie jest niezbędne w kontekście metod bioakumulacji w wyniku narażenia drogą wodną i pokarmową. Mimo że informacje zawarte w sekcjach 5, 6 i 8 mają znaczenie wyłącznie dla metody narażenia drogą wodną, zostały przedstawione w niniejszym dodatku, ponieważ są technikami o „ogólnym” charakterze. Dzięki zastosowaniu metod sekwencyjnych (sekcja 4 i 5) i równoległych (sekcja 6) można obliczyć stałe wchłaniania i wydalania wykorzystywane do wyprowadzenia kinetycznych BCF. Sekwencyjna metoda ustalania wartości k_2 (sekcja 4) jest istotna w kontekście metody narażenia drogą pokarmową, ponieważ jej zastosowanie jest konieczne do tego, by obliczyć zarówno wydajność przyswajania, jak i BMF. W dodatku 7 przedstawiono szczegółowe informacje na temat obliczeń specyficznych dla metody narażenia drogą pokarmową.

2. PROGNOZA CZASU TRWANIA FAZY WCHŁANIANIA

Przed przeprowadzeniem badania szacunkową wartość k_2 , a stąd odsetek czasu wymaganego do osiągnięcia stanu równowagi, można wyprowadzić z zależności empirycznych między k_2 a współczynnikiem podziału n -oktanol/woda (K_{ow}) lub między k_1 a BCF. Należy jednak pamiętać o tym, że równania przedstawione w tej sekcji stosuje się wyłącznie w przypadku, gdy faza wchłaniania i wydalania przebiegają według kinetyki pierwszego rzędu. W przypadku wystąpienia oczywistych przesłanek świadczących o tym, że wspomniane fazy nie przebiegają według kinetyki pierwszego rzędu, i w przypadku chęci uzyskania prognoz dotyczących przebiegu fazy wchłaniania zaleca się zasięgnąć porady specjalisty ds. biostatystyki lub farmakokinetyki.

Szacunkową wartość k_2 (dzień^{-1}) można uzyskać, stosując szereg metod. Na przykład w pierwszej kolejności można oprzeć się na następujących zależnościach empirycznych ⁽¹⁾:

$$\log k_2 = 1,47 - 0,414 \log K_{\text{ow}} \quad (r^2 = 0,95) \quad [(3); \text{Równanie A5.5}]$$

lub

$$k_2 = \frac{k_1}{\text{BCF}} \quad [\text{Równanie A5.6}]$$

$$\text{gdzie } k_1 = 520 \times W^{-0,32} \quad (\text{w przypadku substancji, dla których } \log K_{\text{ow}} > 3) \quad (r^2 = 0,85) \quad [(4); \text{Równanie A5.7}]$$

$$\text{oraz } \text{BCF} = 10^{(0,910 \cdot \log K_{\text{ow}} - 1,975 \cdot \log(6,8 \cdot 10^{-7} K_{\text{ow}} + 1) - 0,786)} \quad (r^2 = 0,90) \quad [(5); \text{Równanie A5.8}]$$

⁽¹⁾ Podobnie jak ma to miejsce w przypadku wszystkich zależności empirycznych, należy upewnić się, że substancja badana wchodzi w zakres dziedziny zastosowania odpowiedniej zależności.

W = średnia masa ryb poddanych działaniu substancji chemicznej (w gramach mokrej masy) pod koniec fazy wchłaniania / na początku fazy wydalania ⁽¹⁾

Aby zapoznać się z informacjami na temat innych powiązanych zależności, zob. (6). Zastosowanie bardziej złożonych modeli przy szacowaniu wartości k_2 może okazać się korzystne, jeżeli np. istnieje prawdopodobieństwo wystąpienia istotnych zmian o charakterze metabolicznym (7) (8). W miarę zwiększania się złożoności modelu należy jednak zachowywać coraz większą ostrożność przy interpretowaniu uzyskiwanych prognoz. Na przykład obecność grup nitrowych może świadczyć o szybkim metabolizmie, ale nie w każdym przypadku tak będzie. Dlatego też przy sporządzaniu harmonogramu badania należy zestawić wyniki uzyskane po zastosowaniu metody predykcyjnej z informacjami na temat struktury danej substancji chemicznej oraz z wszelkimi innymi istotnymi informacjami (na przykład z wynikami badań wstępnych).

Czas potrzebny do osiągnięcia określonego odsetka stanu równowagi można obliczyć, stosując szacunkową wartość k_2 wyprowadzoną z ogólnego równania kinetycznego opisującego fazę wchłaniania i wydalania (kinetyka pierwszego rzędu), przy założeniu, że wzrost i metabolizm są pomijalne. Jeżeli w trakcie badania odnotowany zostanie istotny wzrost, opisane poniżej szacunki nie będą wiarygodne. W takich przypadkach zaleca się skorzystanie z wartości k_{2g} skorygowanej pod kątem wzrostu, jak opisano dalej (zob. sekcja 7 niniejszego dodatku):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_w - k_2 C_f \quad [\text{Równanie A5.9}]$$

lub, jeżeli wartość C_w jest stała:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{Równanie A5.10}]$$

W miarę zbliżania się do stanu równowagi ($t \rightarrow \infty$) wynik równania A5.10 można obniżyć (por. (9)(10)) do:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \quad [\text{Równanie A5.11}]$$

lub

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = BCF \quad [\text{Równanie A5.12}]$$

W takim przypadku wynik równania $BCF \times C_w$ odpowiada przybliżonemu stężeniu substancji u ryb w stanie równowagi (C_{f-ss}). [Uwaga: takie samo podejście można zastosować przy szacowaniu BMF w stanie równowagi w badaniu narażenia drogą pokarmową. W takim przypadku w przywołanych powyżej równaniach BCF zastępuje się BMF, a C_w zastępuje się C_{pasza} , tj. stężeniem substancji w pokarmie]

Równanie A5.10 można rozpisać jako:

$$C_f = C_{f-ss} (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{Równanie A5.13}]$$

lub

$$\frac{C_f}{C_{f-ss}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad [\text{Równanie A5.14}]$$

Na podstawie równania A5.14 można przewidzieć czas potrzebny do osiągnięcia określonego odsetka stanu równowagi, jeżeli wartość k_2 została wcześniej oszacowana na podstawie równania A5.5 lub A5.6.

Zasadniczo za optymalny pod względem statystycznym czas trwania fazy wchłaniania, który pozwoli uzyskać dane nadające się do celów statystycznych (BCF_k), uznaje się okres wymagany do tego, aby krzywa logarytmu na wykresie stężenia substancji badanej u ryb do osi czasu osiągnęła wartość wynoszącą co najmniej 50 % stanu równowagi (tj. $0,69/k_2$), ale nie więcej niż 95 % stanu równowagi (tj. $3,0/k_2$) (11). W przypadku gdy akumulacja przekroczy 95 % stanu równowagi, można rozważyć możliwość obliczenia BCF_{ss} .

⁽¹⁾ Masę ryb pod koniec fazy wchłaniania można oszacować w oparciu o dane zgromadzone w trakcie wcześniejszych badań lub w oparciu o wiedzę na temat gatunku doświadczalnego, na podstawie której można będzie uznać, że masa zwierząt prawdopodobnie zwiększy się w ciągu typowego czasu przeprowadzania badania (np. 28 dni).

Czas potrzebny do osiągnięcia 80 % stanu równowagi wynosi (w oparciu o równanie A5.14):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t} \quad [\text{Równanie A5.15}]$$

lub

$$t_{80} = \frac{-\ln(0,20)}{k_2} = \frac{1,6}{k_2} \quad [\text{Równanie A5.16}]$$

Czas potrzebny do osiągnięcia 95 % stanu równowagi wynosi:

$$t_{95} = \frac{-\ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2} \quad [\text{Równanie A5.17}]$$

Na przykład czas trwania fazy wchłaniania (tj. czas potrzebny do tego, by osiągnąć określony odsetek stanu równowagi, np. t_{80} lub t_{95}) dla substancji badanej, w przypadku której $\log K_{ow} = 4$, wynosiłyby (w oparciu o równania A5.5, A5.16 i A5.17):

$$\log k_2 = 1,47 - 0,414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0,652 \text{ dnia}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1,6}{0,652} = 2,45 \text{ dnia (59 godz.)}$$

$$\text{lub } t_{95} = \frac{3,0}{0,652} = 4,60 \text{ dnia (110 godz.)}$$

Alternatywnie, wyrażenie:

$$t_{ess} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{ow} + 55,31 \text{ (godz.)} \quad [\text{Równanie A5.18}]$$

można wykorzystać do obliczenia czasu potrzebnego do skutecznego osiągnięcia stanu równowagi (t_{ess}) (12). Dla substancji badanej, w przypadku której $K_{ow} = 4$, równanie to przyjmuje postać:

$$t_{ess} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55,31 = 121 \text{ godz.}$$

3. PROGNOZOWANIE CZASU TRWANIA FAZY WYDALANIA

Prognozowany czas konieczny do zmniejszenia skażenia organizmu do określonej wartości procentowej wyjściowego stężenia można również obliczyć za pomocą ogólnego równania opisującego proces wchłaniania i wydalania (przy założeniu, że dana reakcja przebiega według kinetyki pierwszego rzędu, por. równanie A5.9 (1) (13)).

W przypadku fazy wydalania przyjmuje się, że wartość C_w (lub C_{pasza} w przypadku badania narażenia drogą pokarmową) wynosi zero. Dzięki temu równanie można następnie uprościć do następującej postaci:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f \quad [\text{Równanie A5.19}]$$

lub

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \quad [\text{Równanie A5.20}]$$

gdzie $C_{f,0}$ odpowiada stężeniu na początku okresu wydalania.

W takim przypadku 50-procentowy poziom wydalania zostanie osiągnięty w czasie (t_{50}):

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

lub

$$t_{50} = \frac{-\ln(0,50)}{k_2} = \frac{0,693}{k_2}$$

Podobnie 95-procentowy poziom wydalania zostanie osiągnięty w czasie:

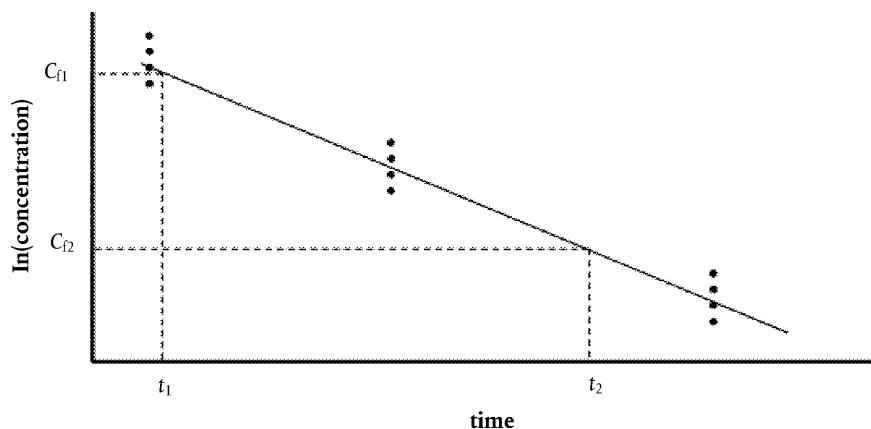
$$t_{95} = \frac{-\ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2}$$

Jeżeli w pierwszym okresie przyjęto 80-procentowy poziom wchłaniania ($1,6/k_2$), a poziom utraty substancji w fazie wydalania wynosił 95 % ($3,0/k_2$), oznacza to, że faza wydalania trwa w przybliżeniu dwukrotnie dłużej niż faza wchłaniania.

Należy zwrócić uwagę na fakt, że szacunki sporządza się w oparciu o założenie, iż proces wchłaniania i wydalania przebiega według kinetyki pierwszego rzędu. Jeżeli dana reakcja w oczywisty sposób nie będzie przebiegała zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu, przywołane powyżej szacunki nie będą wiarygodne.

4. METODA SEKWENCYJNA: USTALANIE WARTOŚCI STAŁEJ SZYBKOŚCI WYDALANIA (UTRATY) SUBSTANCJI K_2

Uznano, że większość danych dotyczących biokoncentracji została „wystarczająco” dobrze opisana za pomocą prostego modelu dwukomorowego o dwóch parametrach, o czym świadczy fakt, że krzywa prostoliniowa (wykreślona w skali logarymicznej) zbliża się do punktów oznaczających stężenia u ryb w trakcie fazy wydalania.



Należy zwrócić uwagę na fakt, że odchylenia od linii prostej mogą świadczyć o tym, że schemat wydalania jest w danym przypadku bardziej złożony, niż schemat wydalania przebiegającego według kinetyki pierwszego rzędu. Aby skorygować odnotowywane w fazie wydalania wyniki odbiegające od wyników, jakie uzyskano by, gdyby reakcja przebiegała według kinetyki pierwszego rzędu, można zastosować metodę graficzną.

Aby obliczyć wartość k_2 dla szeregu punktów (pobierania próbek), należy wykreślić regresję liniową $\ln(\text{stężenie})$ w stosunku do czasu. Nachylenie linii regresji odpowiada szacunkowej wartości stałej szybkości wydalania k_2 ⁽¹⁾. Od punktu przecięcia średnie stężenie substancji u ryb na początku fazy wydalania ($C_{0,d}$; parametr ten odpowiada średniemu stężeniu substancji ryb pod koniec fazy wchłaniania) można łatwo obliczyć w następujący sposób (uwzględniając marginesy błędów) ⁽¹⁾:

$$C_{0,d} = e^{\text{punkt przecięcia}}$$

[Równanie A5.21]

⁽¹⁾ Większość programów, które zapewniają możliwość skorzystania z regresji liniowej, generuje również informacje na temat odchylen standardowych i przedziałów ufności (CI) reszt – dotyczy to np. programu Microsoft Excel z zainstalowanym zestawem narzędzi do analizy danych.

Aby obliczyć wartość k_2 w oparciu o zaledwie dwa punkty (pobierania próbek) (podobnie jak ma to miejsce w przypadku planu zminimalizowanego), oba średnie stężenia należy podstawić do następującego równania

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}) - \ln(C_{f2})}{t_2 - t_1} \quad [\text{Równanie A5.22}]$$

gdzie $\ln(C_{f1})$ i $\ln(C_{f2})$ stanowią logarytmy naturalne stężeń odpowiednio w czasie t_1 i t_2 , a t_2 i t_1 odpowiadają momentom pobrania obu próbek relatywnie do chwili rozpoczęcia wydalania ⁽¹⁾.

5. METODA SEKWENCYJNA: USTALANIE STAŁEJ SZYBKOŚCI WCHŁANIANIA k_1 (DOTYCZY WYŁĄCZNIE METODY NARAŻENIA DROGĄ WODNĄ)

Aby ustalić wartość k_1 w oparciu o zbiór danych sekwencyjnych dotyczących wysokości stężenia w miarę upływu czasu w fazie wchłaniania, należy skorzystać z programu komputerowego zapewniającego możliwość wyliczenia następującego równania:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{Równanie A5.23}]$$

gdzie wartość k_2 odpowiada wartości ustalonej w poprzednim równaniu, a wartość $C_f(t)$ i $C_w(t)$ odpowiada – odpowiednio – stężeniu substancji u ryb i w wodzie w czasie t .

Aby obliczyć wartość k_1 w oparciu o zaledwie dwa punkty (pobierania próbek) (podobnie jak ma to miejsce w przypadku planu zminimalizowanego), należy skorzystać z następującego wzoru:

$$k_1 = \frac{C_f \cdot k_2}{C_w(1 - e^{-k_2 t})} \quad [\text{Równanie A5.24}]$$

Gdzie wartość k_2 odpowiada wartości ustalonej w poprzednim równaniu, C_f odpowiada stężeniu u ryb na początku fazy wydalania, a C_w odpowiada średniemu stężeniu w wodzie w fazie wchłaniania ⁽²⁾.

Zgodność można ocenić metodą wzrokową, analizując nachylenie linii k_1 i k_2 wykreślonych w stosunku do zmierzonych danych dotyczących momentu pobierania próbek. Jeżeli okaże się, że szacunkowa wartość k_1 uzyskana w rezultacie zastosowania metody sekwencyjnej jest niedostatecznie precyzyjna, należy zastosować podejście równoległe w celu obliczenia wartości k_1 i k_2 (zob. sekcja 6 poniżej). Również w tym przypadku należy porównać nachylenie wykreślonych linii w stosunku do zmierzonych danych, aby ocenić stopień zgodności metodą wzrokową. Jeżeli zgodność będzie w dalszym ciągu niezadowalająca, może to świadczyć o tym, że dana reakcja nie przebiega według kinetyki pierwszego rzędu, co wiązałoby się z koniecznością zastosowania bardziej złożonych modeli.

6. METODA RÓWNOLEGŁEGO OBLICZANIA STAŁYCH SZYBKOŚCI WCHŁANIANIA I WYDALANIA (UTRATY) SUBSTANCJI (DOTYCZY WYŁĄCZNIE METODY NARAŻENIA DROGĄ WODNĄ)

Dopuszcza się możliwość skorzystania z programów komputerowych, aby obliczyć wartości k_1 i k_2 przy danym zbiorze danych dotyczących wysokości stężenia w miarę upływu czasu oraz za pomocą następującego modelu:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{Równanie A5.25}]$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_c \quad [\text{Równanie A5.26}]$$

gdzie:

t_c = czas pod koniec fazy wchłaniania.

⁽¹⁾ W odróżnieniu od metody regresji liniowej skorzystanie z tego wzoru nie doprowadzi do wygenerowania odchylenia standardowego dla k_2 .

⁽²⁾ W odróżnieniu od procedury najlepszego dopasowania liniowego ta metoda zazwyczaj nie doprowadzi do wygenerowania odchylenia standardowego ani przedziałów ufności reszt k_1 .

Zastosowanie tego podejścia pozwala bezpośrednio ustalić poziom odchyłeń standardowych reszt dla k_1 i k_2 . Po zastąpieniu k_1/k_2 BCF (por. równanie A5.4) w równaniu A5.25 i A5.26 można oszacować również poziom odchylenia standardowego i wartość 95 % CI BCF. Jest to szczególnie przydatne przy porównywaniu różnych szacunków uzyskanych w rezultacie transformacji danych. Zmienną zależną (stężenie substancji u ryb) można dopasować przy zastosowaniu transformacji logarytmicznej lub bez stosowania takiej transformacji, po czym można ocenić niepewność pomiaru uzyskanej wartości BCF.

Ponieważ między obydwojema parametrami k_1 i k_2 istnieje silna korelacja, jeżeli szacuje się je równolegle, zaleca się, aby w pierwszej kolejności obliczyć wartość k_2 , opierając się wyłącznie na danych zgromadzonych na etapie wydalania (zob. powyżej); wartość k_2 można w większości przypadków wyprowadzić ze stosunkowo wysokim poziomem precyzji z krzywej wydalania. Wartość k_1 można następnie obliczyć za pomocą regresji nieliniowej w oparciu o dane dotyczące wchłaniania⁽¹⁾. Przy dopasowywaniu odpowiednich wartości w ramach metody sekwencyjnej zaleca się korzystanie z tej samej transformacji danych.

Zgodność można ocenić metodą wzrokową, analizując nachylenie linii wykreślonych w stosunku do zmierzonych danych dotyczących momentu pobierania próbek. Jeżeli okaże się, że szacunkowa wartość k_1 uzyskana w rezultacie zastosowania niniejszej metody jest niedostatecznie precyzyjna, można rozważyć możliwość zastosowania podejścia równoległego w celu obliczenia wartości k_1 i k_2 . Również w tym przypadku dopasowywany model należy zestawić ze zmierzonymi danymi naniesionymi na wykres w celu oceny ich zgodności metodą wzrokową, a uzyskane szacunkowe parametry związane z k_1 , k_2 oraz uzyskaną wartość BCF i standardowe odchylenia lub przedziały ufności należy porównać z ich odpowiednikami wyliczonymi w ramach innych rodzajów dopasowania.

Jeżeli zgodność będzie niezadowalająca, może to świadczyć o tym, że dana reakcja nie przebiega według kinetyki pierwszego rzędu, co wiązałoby się z koniecznością zastosowania bardziej złożonych modeli. Wzrost ryb w trakcie badania stanowi jedną z najczęstszych przyczyn występowania komplikacji.

7. KOREKTA WARTOŚCI KINETYCZNEGO BCF I BMF Z TYTUŁU ROZCIEŃCZENIA WYNIKAJĄCEGO ZE WZROSTU

W niniejszej sekcji opisano standardową metodę korygowania wartości o wzrost ryb w trakcie badania (tzw. „rozcieńczenie wynikające ze wzrostu”), którą można stosować wyłącznie w przypadku, gdy dana reakcja przebiega według kinetyki pierwszego rzędu. Jeżeli istnieją przesłanki świadczące o tym, że dana reakcja nie przebiega według kinetyki pierwszego rzędu, zaleca się, aby zasięgnąć porady specjalisty ds. biostatystyki, który wskaże odpowiedni poziom korekty z tytułu rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu, lub aby zastosować opisane poniżej podejście bazujące na masie.

W niektórych przypadkach opisana metoda korygowania wartości z tytułu rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu okazuje się mało precyzyjna lub nieskuteczna (np. w przypadku stosowania substancji badanych o bardzo niskiej szybkości wydalania w odniesieniu do ryb o dużej szybkości wzrostu wartość wyprowadzonej stałej szybkości wydalania skorygowanej z tytułu rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu, tj. k_{2g} , może być bardzo niska, przez co błąd odnotowywany w odniesieniu do obu stałych szybkości wzrostu, na podstawie których wyprowadzono tę wartość, osiągnie poziom krytyczny; ponadto w niektórych przypadkach szacunkowa wartość k_g będzie wyższa niż wartość k_2). W takich przypadkach można zastosować podejście alternatywne (tj. podejście bazujące na masie), które pozwala uniknąć konieczności dokonania korekty i które jest skuteczne również w sytuacji, gdy dana reakcja nie przebiega zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu. Podejście to zostało opisane w końcowej części niniejszej sekcji.

Metoda odejmowania stałej szybkości wzrostu do celów przeprowadzenia korekty z tytułu wzrostu

W ramach standardowej metody wszystkie dane dotyczące masy i długości poszczególnych osobników przekształca się w logarytmy naturalne, a wartość $\ln(\text{masa})$ lub $\ln(1/\text{masa})$ wykreśla się na wykresie w stosunku do czasu (dni), odrębnie dla grupy badanej i grupy kontrolnej. Tę samą procedurę stosuje się w odniesieniu do danych zgromadzonych odrębnie w trakcie fazy wchłaniania i wydalania. Ogólnie rzecz biorąc, na potrzeby korekty z tytułu rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu zaleca się stosowanie danych dotyczących masy zgromadzonych w trakcie całego badania w celu wyprowadzenia stałej szybkości wzrostu (k_g), ale występowanie statystycznie istotnych różnic między stałymi szybkości wzrostu wyprowadzonymi w fazie wchłaniania i w fazie wydalania może świadczyć o tym, że powinno się zastosować stałą szybkości wzrostu w fazie wydalania. Ogólne wartości szybkości wzrostu w badaniach narażenia na działanie substancji w wodzie odnotowywane w grupach badanych i grupach kontrolnych mogą zostać wykorzystane w ramach oceny pod kątem występowania jakichkolwiek skutków związanych z poddaniem działaniu substancji chemicznej.

⁽¹⁾ Należy pamiętać o tym, że niepewność pomiaru szacunkowej wartości k_2 nie jest wykorzystywana we właściwy sposób w ramach modelu bioakumulacji, jeżeli k_2 traktuje się jako stałą przy dopasowywaniu k_1 w ramach metody dopasowania sekwencyjnego. Dlatego też niepewność pomiaru uzyskanej wartości BCF będzie różna dla metody dopasowania równoległego i sekwencyjnego.

Stosując standardowe procedury statystyczne, należy obliczyć korelację liniową bazującą na metodzie najmniejszych kwadratów w oparciu o \ln (masa ryb) na dzień (a także dla \ln (1/masa) na dzień) dla każdej grupy (grupy badane i kontrolne, dane dotyczące poszczególnych zwierząt, a nie średnie wartości dzienne) w ramach całego badania, a także dla fazy wchłaniania i wydalania. Należy obliczyć wariancje w nachyleniu linii i wykorzystać uzyskane wyniki do oceny istotności statystycznej ($p = 0,05$) różnicy w nachyleniach (stałe szybkości wzrostu), stosując test t-Studenta (lub analizę ANOVA w przypadku badania z wykorzystaniem więcej niż jednego stężenia). Korektę z tytułu wzrostu przeprowadza się zazwyczaj w oparciu o dane na temat masy. Dane na temat długości, które przetwarza się w taki sam sposób, mogą okazać się pomocne przy porównywaniu grup kontrolnych i grup badanych pod kątem skutków powiązanych z poddaniem działaniu substancji chemicznej. Jeżeli analiza danych na temat masy nie wykaże występowania statystycznie istotnych różnic, dane zgromadzone w trakcie badania i kontroli można połączyć, ustalając ogólną stałą szybkości wzrostu ryb (k_g) jako równoważną ogólnemu nachyleniu korelacji liniowej. W przypadku odnotowania statystycznie istotnych różnic, stałe szybkości wzrostu dla poszczególnych grup ryb lub etapów badania zgłasza się odrębnie. Stałą szybkości ustaloną dla każdej grupy poddanej działaniu substancji chemicznej należy następnie wykorzystywać przy dokonywaniu korekty z tytułu rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu w danej grupie. W przypadku odnotowania różnic statystycznych między stałymi szybkości w fazie wchłaniania i w fazie wydalania, należy skorzystać ze stałych szybkości wzrostu wyprowadzonych dla fazy wydalania.

Obliczoną stałą szybkości wzrostu (k_g mierzoną w dniach⁻¹) można odjąć od ogólnej stałej szybkości wydalania (k_2), aby uzyskać stałą szybkości wydalania k_{2g} .

$$k_{2g} = k_2 - k_g \quad [\text{Równanie A5.27}]$$

Stałą szybkości wchłaniania dzieli się przez stałą szybkości wydalania skorygowaną pod kątem wzrostu, aby uzyskać kinetyczny BCF skorygowany pod kątem wzrostu, który oznacza się jako BCF_{kg} (lub BMF_{kg}).

$$BCF_{kg} = \frac{k_1}{k_{2g}} \quad [\text{Równanie A5.28}]$$

Stałą szybkości wzrostu wyprowadzoną na potrzeby badania narażenia drogą pokarmową wykorzystuje się w równaniu A7.5, aby obliczyć wartość BMF_{kg} skorygowaną pod kątem wzrostu (por. dodatek 7).

Metoda korekty z tytułu wzrostu bazująca na masie

Jako rozwiązanie alternatywne wobec opisanej powyżej „metody odejmowania stałej szybkości wzrostu” można rozważyć możliwość zastosowania metody bazującej na masie, w ramach której dokonanie korekty z tytułu wzrostu nie jest konieczne. Zgodnie z główną zasadą stosowaną w ramach tej metody dane zgromadzone na etapie wydalania wykorzystuje się w ujęciu masowym na daną rybę, a nie w oparciu o poziom stężenia substancji.

W tym celu należy przekształcić stężenia w tkankach w fazie wydalania (masa substancji badanej / masę jednostkową ryby) w masę substancji badanej u ryby: należy dopasować stężenia i masę ciała poszczególnych ryb w postaci tabeli (np. korzystając z komputerowego arkusza kalkulacyjnego) i przemnożyć każde stężenie przez całkowitą masę ryb w ramach danego pomiaru, aby uzyskać zbiór danych dotyczących stosunku masy substancji badanej do masy ryb dla wszystkich próbek pobranych w fazie wydalania.

Następnie należy wykreślić krzywą logarytmu naturalnego masy substancji do czasu w ramach doświadczenia (faza wydalania) podobnie jak ma to miejsce w przypadku zastosowania standardowej metody.

W przypadku metody narażenia drogą wodną należy okresowo wyprowadzać stałą szybkości wchłaniania (zob. sekcje 4 i 6), pamiętając o tym, że w równaniach służących dopasowaniu krzywej do wartości k_1 należy stosować „standardową” wartość k_2 , i wyprowadzić stałą szybkości wydalania z powyższych danych. Biorąc pod uwagę fakt, że uzyskana w ten sposób wartość stałej szybkości wydalania jest niezależna od wzrostu, ponieważ została wyprowadzona w oparciu o masę całej ryby, należy oznaczyć ją jako k_{2g} , a nie jako k_2 .

8. NORMALIZACJA LIPIDÓW DO POZIOMU 5-PROCENTOWEJ ZAWARTOŚCI LIPIDÓW (DOTYCZY WYŁĄCZNIE METODY NARAŻENIA DROGĄ WODNĄ)

Poziom BCF (kinetycznego i w stanie równowagi) odnotowany w badaniach narażenia drogą wodną należy również zgłosić, zestawiając go z domyślną zawartością lipidów u ryb, która wynosi 5 % mokrej masy, chyba że istnieją podstawy, by sądzić, że substancja badana nie gromadzi się głównie w lipidach (np. niektóre substancje perfluorowane mogą wiązać się z białkami). Dane dotyczące stężenia u ryb lub BCF należy przekształcić we wskaźnik stężenia w mokrej masie przy założeniu 5-procentowej zawartości lipidów. Jeżeli przy dokonywaniu pomiarów stężeń substancji i zawartości lipidów we wszystkich punktach pobierania próbek wykorzystywano te same ryby, każde zmierzone stężenie substancji u danej ryby musi zostać skorygowane o zawartość lipidów u tej ryby.

$$C_{f,L} = \frac{0,05}{L} \cdot C_f \quad [\text{Równanie A5.29}]$$

gdzie:

$C_{f,L}$ = stężenie u ryb przy znormalizowanym poziomie lipidów (mg kg⁻¹ mokrej masy)

L = frakcja lipidowa (w oparciu o mokrą masę)

C_f = stężenie substancji badanej u ryb (mg kg⁻¹ mokrej masy)

Jeżeli nie wszystkie ryby, z których pobrano próbki, zostały poddane analizie lipidów, do znormalizowania BCF wykorzystuje się średnią wartość lipidów. W przypadku BCF w stanie równowagi należy wykorzystać średnią wartość odnotowaną w grupie badanej pod koniec fazy wchłaniania. W kontekście normalizacji kinetycznego BCF mogą pojawić się przypadki, w których zasadne będzie zastosowanie innego podejścia, np. jeżeli odnotowano istotną zmianę zawartości lipidów w trakcie fazy wchłaniania lub wydalania. Jednak niezależnie od przypadku należy rutynowo wyznaczać częstotliwość karmienia w taki sposób, aby ograniczyć możliwość wystąpienia znacznych zmian w zawartości lipidów do minimum.

$$BCF_{KL} = \frac{0.05}{L_n} \cdot BCF_K \quad [\text{Równanie A5.30}]$$

gdzie:

BCF_{KL} = kinetyczny BCF znormalizowany pod kątem zawartości lipidów (L kg⁻¹)

L_n = średnia frakcja lipidowa (w oparciu o mokrą masę)

BCF_K = kinetyczny BCF (L kg⁻¹)

BIBLIOGRAFIA

- (1) Arnot J.A. i Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, *Environ. Toxicol. Chem.* 23: s. 2343–2355.
- (2) Chapter C.20 of this Annex, *Daphnia magna* Reproduction Test.
- (3) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1: 309-320.
- (4) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
- (5) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. *SAR QSAR Environ. Res.* 1: 29-39.

- (6) Kristensen P. (1991), Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Denmark.
 - (7) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1168-1177.
 - (8) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.
 - (9) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2',4,4' tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. *T. Am. Fish. Soc.* 104: 785-792.
 - (10) Ernst W. (1985), Accumulation in aquatic organisms, in *Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals*, Sheeman, P., *et al.*, Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA: 243-255.
 - (11) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977), Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. *Can. J. Chem. Eng.* 55: 614-622.
 - (12) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22: 701-707.
 - (13) Konemann H. and van Leeuwen K. (1980), Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. *Chemosphere.* 9: 3-19.
-

Dodatek 6

**SEKCJA POŚWIĘCONA RÓWNANIOM WYKORZYSTYWANYM W KONTEKŚCIE BADANIA
NARAŻENIA DROGĄ WODNĄ; PLAN BADANIA ZMINIMALIZOWANEGO**

Uzasadnieniem takiego podejścia jest to, że współczynnik biokoncentracji w pełnym badaniu można wyznaczyć albo jako współczynnik biokoncentracji w stanie równowagi (BCF_{SS}), obliczając stosunek stężenia substancji badanej w tkance ryby do stężenia substancji badanej w wodzie, albo obliczając kinetyczny współczynnik biokoncentracji (BCF_k) jako stosunek stałej szybkości wchłaniania k_1 do stałej szybkości wydalania k_2 . BCF_k jest ważny, nawet jeżeli nie osiągnięto stężenia substancji w stanie równowagi w fazie wchłaniania, pod warunkiem że proces wchłaniania i wydalania przebiega według kinetyki pierwszego rzędu.

Jeżeli pomiaru stężenia substancji w tkankach (C_{f1}) dokonano w chwili zakończenia okresu narażenia na działanie substancji (t_1), po czym poziom stężenia w tkance (C_{f2}) zmierzono ponownie po upływie pewnego czasu (t_2), stałą szybkości wydalania (k_2) można oszacować, korzystając z równania A5.22 w dodatku 5.

Wartość stałej szybkości wchłaniania, k_1 , można następnie obliczyć algebraicznie, stosując równanie A5.23 przedstawione w dodatku 5 (gdzie C_f odpowiada C_{f1} , a t odpowiada t_1)(1). Kinetyczny współczynnik biokoncentracji w ramach planu minimalnego (oznaczony jako BCF_{km} w celu odróżnienia go od kinetycznych współczynników biokoncentracji wyznaczonych za pomocą innych metod) jest zatem równy:

$$BCF_{km} = \frac{k_1}{k_2} \quad [\text{Równanie A6.1}]$$

Stężenia lub wyniki należy skorygować pod kątem rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu i znormalizować do ryb o 5-procentowej zawartości lipidów, jak opisano w dodatku 5.

Zminimalizowany BCF_{SS} odpowiada BCF obliczonemu po zakończeniu fazy wchłaniania przy założeniu, że osiągnięto stan równowagi. Ponieważ liczba punktów pobierania próbek nie będzie wystarczająca do tego, by udowodnić osiągnięcie stanu równowagi, konieczne będzie przyjęcie założenia, że stan równowagi został osiągnięty.

$$\text{zminimalizowany } BCF_{SS} = \frac{C_{f - \text{minSS}}}{C_{w - \text{minSS}}} \quad [\text{Równanie A6.2}]$$

gdzie:

$C_{f - \text{minSS}}$ = stężenie u ryb w chwili zakładanego osiągnięcia stanu równowagi pod koniec wchłaniania (mg na kg^{-1} mokrej masy).

$C_{w - \text{minSS}}$ = Stężenie w wodzie w chwili zakładanego osiągnięcia stanu równowagi pod koniec wchłaniania (mg l^{-1}).

BIBLIOGRAFIA

- (1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. i Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: s. 2271–2280.

Dodatek 7

SEKCJA POŚWIĘCONA RÓWNANIOM WYKORZYSTYWANYM DO BADANIA NARAŻENIA DROGĄ POKARMOWĄ

1. Przykładowe ilości składników w odpowiednich paszach dla ryb wprowadzonych do obrotu
2. Przykłady technik wzbogacania paszy
3. Obliczanie wydajności przyswajania i współczynnika biomagnifikacji
4. Korekta pod kątem zawartości lipidów
5. Ocena różnic między zmierzonym stężeniem w czasie zerowym (C0,m) a wyprowadzonym stężeniem w czasie zerowym (C0,d)
6. Wskazówki dotyczące substancji badanych podlegających bardzo szybkiemu wydaleniu

1. PRZYKŁADOWE ILOŚCI SKŁADNIKÓW W ODPOWIEDNICH PASZACH DLA RYB WPROWADZONYCH DO OBROTU

Główny składnik	mączka rybna
Białko surowe	≤ 55,0 %
Tłuszcz surowy	≤ 15,0 % ⁽¹⁾
Włókno surowe	≥ 2,0 %
Zawartość wilgoci	≥ 12 %
Popiół	≥ 8 %

(1) W niektórych regionach jedyną paszą dla ryb, jaką można będzie pozyskać, będzie pasza o stężeniu lipidów niższym niż ten górny limit. W takich przypadkach badania należy przeprowadzić przy niższym poziomie stężenia lipidów w podawanej paszy, dostosowując częstotliwość karmienia w taki sposób, by utrzymać dobry stan zdrowia ryb. Poziomu lipidów w paszy nie należy w sztuczny sposób podwyższać poprzez dodawanie oleju.

2. PRZYKŁADY TECHNIK WZBOGACANIA PASZY

Uwagi ogólne

Paszę kontrolną należy przygotować w dokładnie taki sam sposób jak paszę wzbogaconą, ale nie należy dodawać do niej substancji badanej.

Aby sprawdzić stężenie substancji w paszy, do której dodano substancję, z pojedynczych porcji paszy należy pobrać trzy próbki, stosując odpowiednią metodę pobierania próbek, a następnie należy zmierzyć poziom stężenia substancji badanej lub poziom promieniotwórczości w pobranych próbkach. Należy wykazać wysoki poziom odzysku analitycznego (>85 %) przy niskim poziomie zróżnicowania między próbkami (trzy wartości stężenia substancji w próbkach pobranych na początku badania nie mogą odbiegać od średniego stężenia o więcej niż ±15 %).

W trakcie badania narażenia drogą pokarmową trzy próbki paszy przeznaczone do analizy należy pobrać w dniu 0 oraz pod koniec fazy wchłaniania, aby ustalić zawartość substancji badanej w paszy.

Przygotowywanie paszy dla ryb przy wykorzystaniu (czystego) materiału badanego w postaci płynnej

W pierwszej kolejności ustala się docelowe, nominalne badane stężenie w paszy dla ryb, do której dodano substancję badaną, np. 500 µg substancji badanej / g paszy. Następnie odpowiednią ilość czystej substancji badanej (ustaloną na podstawie masy molowej lub promieniotwórczości właściwej) dodaje się do paszy dla ryb o ustalonej masie znajdującej się w szklanym słoju lub w kolbie wyparki obrotowej. Masa paszy dla ryb powinna być odpowiednia do tego, by pasza ta mogła być spożywana przez całą fazę wchłaniania (biorąc pod uwagę konieczność zwiększania porcji przy każdorazowym karmieniu z uwagi na wzrost ryb). Paszę dla ryb / substancję badaną należy mieszać przez jedną noc, stosując metodę powolnego wirowania (np. przy wykorzystaniu mieszalnika obrotowego) lub stosując metodę obrotową w przypadku wykorzystania wyparki obrotowej z kolbą. Wzbogaconą paszę należy przechowywać w warunkach zapewniających możliwość utrzymania stabilności substancji badanej dodanej do paszy (np. w warunkach chłodniczych) do momentu jej wykorzystania.

Przygotowywanie paszy dla ryb przy wykorzystaniu nośnika w postaci oleju kukurydzianego lub oleju z ryb

Substancje badane w stanie stałym należy zmielić w moździerzu na drobny proszek. Substancje badane w postaci ciekłej należy dodać bezpośrednio do oleju kukurydzianego lub do oleju z ryb. Substancję badaną należy rozpuścić w określonej ilości oleju kukurydzianego lub oleju z ryb (np. 5–15 ml). Odpowiednią dawkę oleju należy przenieść do kolby wyparki obrotowej o odpowiedniej pojemności. Kolbę wykorzystywaną do przygotowania dawki oleju należy wypłukać dwiema niewielkimi podwielokrotnościami oleju i dodać je do kolby wyparki obrotowej, upewniając się, że cała rozpuszczona substancja badana znalazła się w kolbie wyparki. Aby zapewnić całkowite rozpuszczenie/rozproszenie badanej substancji w oleju (lub w przypadku wykorzystania więcej niż jednej substancji badanej w badaniu), należy zastosować mikromieszadło, zakorkować kolbę i energicznie mieszać mieszaninę przez całą noc. Do kolby należy dodać odpowiednią ilość paszy dla ryb (zazwyczaj w formie granulek) wykorzystywanej w badaniu, po czym zawartość kolby należy jednorodnie mieszać, ustawicznie obracając kolbę szklaną przez co najmniej 30 minut, ale najlepiej przez całą noc. Następnie wzbogaconą paszę należy odpowiednio przechowywać (np. w warunkach chłodniczych), aby zapewnić stabilność substancji badanej w paszy do chwili jej wykorzystania.

Przygotowywanie paszy dla ryb przy wykorzystaniu rozpuszczalnika organicznego

Odpowiednią ilość substancji badanej (ustaloną na podstawie masy molowej lub promieniotwórczości właściwej) wystarczającą do stworzenia docelowej dawki rozpuszcza się w odpowiednim rozpuszczalniku organicznym (np. w cykloheksanie lub w acetonie; 10–40 ml, choć w stosownych przypadkach dopuszcza się zastosowanie większej objętości, w zależności od ilości paszy, która ma zostać wzbogacona). Podwielokrotność albo całość tego roztworu (dodawaną porcjami) należy wymieszać z paszą dla ryb, której masa będzie wystarczająca do tego, by można było osiągnąć wymagany poziom dawki nominalnej w badaniu. Paszę / substancję badaną można wymieszać w misce wykonanej ze stali nierdzewnej i pozostawić świeżo przygotowaną dawkę paszy dla ryb w misce umieszczonej pod okapem laboratoryjnym na dwa dni (od czasu do czasu mieszając jej zawartość), aby nadmiar rozpuszczalnika mógł odparować, lub wymieszać paszę / substancję badaną w kolbie stale obracającej się wyparki obrotowej. W stosownych przypadkach nadmiar rozpuszczalnika należy „zdmuchnąć” strumieniem powietrza lub azotu. Należy dopilnować, aby substancja badana nie podlegała krystalizacji w miarę usuwania rozpuszczalnika. Wzbogaconą paszę należy przechowywać w warunkach zapewniających możliwość utrzymania stabilności substancji badanej dodanej do paszy (np. w warunkach chłodniczych) do momentu jej wykorzystania.

3. OBLICZANIE WYDAJNOŚCI PRZYSWAJANIA I WSPÓŁCZYNNIKA BIOMAGNIFIKACJI

Aby obliczyć wydajność przyswajania, należy w pierwszej kolejności oszacować wartość ogólnej stałej szybkości wydalania zgodnie z sekcją 4 w dodatku 5 (stosując „metodę sekwencyjną”, tj. standardową regresję liniową) w oparciu o średnie stężenia próbek pobranych w fazie wydalania. Stała częstotliwości karmienia, I , oraz czas wchłaniania, t , stanowią stałe parametry w ramach badania. C_{pasza} , tj. średnie zmierzone stężenie substancji badanej w paszy, stanowi zmienną mierzoną w trakcie badania. $C_{0,d}$, stężenie substancji badanej u ryb pod koniec fazy wchłaniania, zazwyczaj wyprowadza się z punktu przecięcia wykreślonej na wykresie krzywej \ln (stężenie) w stosunku do dnia fazy wydalania.

Wydajność przyswajania substancji (a , wchłanianie substancji badanej na całej długości jelita) oblicza się za pomocą następującego równania:

$$a = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{pasza}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \quad [\text{Równanie A7.1}]$$

gdzie:

$C_{0,d}$ = wyprowadzona wartość stężenia u ryb w czasie zerowym fazy wydalania (mg kg^{-1});

k_2 = ogólna (nieskorygowana pod kątem wzrostu) stała szybkości wydalania (dzień^{-1}) obliczona zgodnie z równaniami przedstawionymi w sekcji 3 w dodatku 5;

I = stała częstotliwości karmienia (g paszy g^{-1} ryby dzień^{-1});

C_{pasza} = stężenie w paszy (mg kg^{-1} paszy);

t = czas trwania okresu karmienia (dni)

Jeżeli w obliczeniach wykorzystuje się stałą częstotliwości karmienia (I), precyzyjne określenie poziomu wydajności przyswajania (a) może wiązać się z koniecznością dostosowania wartości tej stałej pod kątem wzrostu ryb. Jeżeli w fazie wchłaniania danego badania dochodzi do istotnego wzrostu ryb (z tytułu którego nie dokonano żadnej korekty ilości paszy w celu utrzymania wyznaczonej częstotliwości karmienia), w miarę upływu fazy wchłaniania faktyczna częstotliwość karmienia będzie malała, osiągając poziom niższy niż wyznaczony, co doprowadzi do zwiększenia „rzeczywistej” wydajności przyswajania. (Należy zwrócić uwagę na fakt, że kwestia ta nie wywiera wpływu na ogólne obliczenia poziomu BMF, ponieważ stała I zostaje skutecznie zniwelowana po zastosowaniu równań A7.1 i A7.4). Średnią częstotliwość karmienia skorygowaną pod kątem rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu, I_g , można wyprowadzić na szereg sposobów, ale najprostsza i najpewniejsza metoda jej wyprowadzenia zakłada oparcie się na znanej stałej szybkości wzrostu (k_g) w celu oszacowania masy ryb doświadczalnych na poszczególnych etapach fazy wchłaniania, tj.:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g t} \quad [\text{Równanie A7.2}]$$

gdzie:

$W_f(t)$ = średnia masa ryb w określonym dniu fazy wchłaniania t

$W_{f,0}$ = średnia masa ryb na początku doświadczenia

Dzięki zastosowaniu tej metody można oszacować (przynajmniej) średnią masę ryb w ostatnim dniu narażenia na działanie substancji ($W_{f,\text{koniec fazy wchłaniania}}$). Ponieważ częstotliwość karmienia wyznaczono w oparciu o wartość $W_{f,0}$, faktyczną częstotliwość karmienia dla każdego dnia fazy wchłaniania można obliczyć w oparciu o powyższe dwie wartości masy. Wartość częstotliwości karmienia skorygowanej pod kątem wzrostu, I_g (g paszy g^{-1} masy ciała ryby dzień^{-1}), z której należy korzystać zamiast stałej I w przypadku szybkiego wzrostu w trakcie fazy wchłaniania, można obliczyć na podstawie poniższego równania

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{f,\text{koniec fazy wchłaniania}}} \quad [\text{Równanie A7.3}]$$

Po ustaleniu wydajności przyswajania BMF można obliczyć, mnożąc wydajność przyswajania przez wartość stałej częstotliwości karmienia I (lub I_g , jeżeli współczynnik ten wykorzystano przy obliczaniu wartości a) i dzieląc uzyskany wynik przez wartość ogólnej stałej szybkości wydalania k_2 :

$$\text{BMF} = \frac{I \times a}{k_2} \quad [\text{Równanie A7.4}]$$

Współczynnik biomagnifikacji skorygowany pod kątem wzrostu również należy obliczyć w ten sam sposób, korzystając ze stałej szybkości wydalania skorygowanej pod kątem wzrostu (wyprowadzonej zgodnie z sekcją 7 w dodatku 5). Ponownie, jeżeli wartość a została wyliczona w oparciu o stałą I_g , w obliczeniach należy wykorzystać tę stałą, a nie stałą I :

$$\text{BMF} = \frac{I \times a}{k_{2g}} \quad [\text{Równanie A7.5}]$$

gdzie:

α = wydajność przyswajania (wchłanianie substancji badanej na całej długości jelita);

k_2 = ogólna (nieskorygowana pod kątem wzrostu) stała szybkości wydalania (dzień⁻¹) obliczona zgodnie z równaniami przedstawionymi w sekcji 3 w dodatku 5;

k_{2g} = skorygowana pod kątem wzrostu stała szybkości wydalania (dzień⁻¹);

I = stała częstotliwości karmienia (g paszy g⁻¹ masy ryby dzień⁻¹);

Wartość okresu półtrwania skorygowanego pod kątem wzrostu ($t_{1/2}$) oblicza się w następujący sposób.

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_{2g}} \quad [\text{Równanie A7.6}]$$

Wydajność przyswajania substancji z paszy można również oszacować, jeżeli w fazie liniowej w ramach fazy wchłaniania stwierdzono wystąpienie pozostałości w tkankach (w dniach 1–3). W takim przypadku wydajność przyswajania substancji (α) można ustalić w następujący sposób

$$\alpha = \frac{C_{\text{fish}}(t)}{I \times C_{\text{pasza}} \times t} \quad [\text{Równanie A7.7}]$$

gdzie:

$C_{\text{ryba}}(t)$ = stężenie substancji badanej u ryb w czasie t (mg kg⁻¹ mokrej masy).

4. KOREKTA POD KĄTEM ZAWARTOŚCI LIPIDÓW

Jeżeli w odniesieniu do tej samej ryby dokonano pomiaru zawartości lipidów i przeprowadzono analizę chemiczną we wszystkich okresach pobierania próbek, poszczególne stężenia należy skorygować pod kątem zawartości lipidów, a wartość \ln (stężenie, korekta pod kątem zawartości lipidów) należy wykreślić na wykresie względem czasu trwania fazy wydalania (w dniach), aby uzyskać wartość $C_{0,d}$ i k_2 . Wydajność przyswajania (równanie A7.1) będzie mogła zostać następnie obliczona na podstawie poziomu lipidów w oparciu o wartość C_{pasza} obliczoną na podstawie poziomu lipidów (tj. wartość C_{pasza} pomnożoną przez średnią frakcję lipidową paszy). Późniejsze obliczenia przeprowadzone w oparciu o równania A7.4 i A7.5 pozwolą bezpośrednio wyliczyć wartość BMF skorygowanego pod kątem zawartości lipidów (i pod kątem rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu).

W przeciwnym razie średnią frakcję lipidową (w/w) u ryb i w paszy wyprowadza się zarówno dla grupy badanej, jak i dla grupy kontrolnej (w przypadku paszy i ryb należących do grupy kontrolnej wartość ta będzie zazwyczaj odpowiadała wartości zmierzonej na początku i pod koniec fazy narażenia na działanie substancji; w przypadku grupy badanej wartość ta będzie zazwyczaj odpowiadała wyłącznie wartości zmierzonej pod koniec fazy narażenia na działanie substancji). W trakcie niektórych badań zawartość lipidów u ryb może istotnie wzrosnąć; w takich przypadkach lepszym rozwiązaniem jest oparcie się na średnim stężeniu lipidów u ryb doświadczalnych obliczonym na podstawie wartości pomiarowych odnotowanych pod koniec fazy narażenia na działanie substancji i pod koniec fazy wydalania. Ogólnie rzecz biorąc, dane dotyczące grupy badanej powinny być wykorzystywane wyłącznie do wyprowadzenia obydwu frakcji lipidowych.

Wartość współczynnika korygującego poziom lipidów (L_c) oblicza się na podstawie następującego równania:

$$L_c = \frac{L_{\text{ryby}}}{L_{\text{pasza}}} \quad [\text{Równanie A7.8}]$$

gdzie L_{ryby} i L_{pasza} odpowiadają średnim frakcjom lipidowym odpowiednio u ryb i w paszy.

Współczynnik korygujący poziom lipidów wykorzystuje się przy obliczaniu współczynnika biomagnifikacji skorygowanego pod kątem poziomu lipidów (BMF_L):

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_c} \quad [\text{Równanie A7.9}]$$

5. OCENA RÓŻNIC MIĘDZY ZMIERZONYM STĘŻENIEM W CZASIE ZEROWYM ($C_{0,m}$) A WYPROWADZONYM STĘŻENIEM W CZASIE ZEROWYM ($C_{0,d}$)

Należy porównać wartość zmierzonego stężenia w czasie zerowym ($C_{0,m}$) i wyprowadzonego stężenia w czasie zerowym ($C_{0,d}$). Jeżeli okaże się, że wartość tych stężeń jest bardzo podobna, zaleca się zastosowanie modelu reakcji pierwszego rzędu wykorzystywanego do wyprowadzania parametrów wydalania.

W niektórych badaniach może wystąpić istotna różnica między wyprowadzoną wartością w czasie zerowym, $C_{0,d}$, a średnim zmierzonym stężeniem w czasie zerowym, $C_{0,m}$ (zob. pkt 159 ppkt ostatni niniejszej metody badawczej). Jeżeli wartość $C_{0,d}$ będzie zdecydowanie niższa niż wartość $C_{0,m}$ ($C_{0,d} \ll C_{0,m}$), taka różnica może świadczyć o obecności nieprzetrawionej wzbogaconej paszy w jelicie. Hipotezę tę można potwierdzić doświadczalnie, przeprowadzając odrębną analizę na wycinku jelita, jeżeli pod koniec fazy wchłaniania pobrano dodatkowe próbki (w postaci całych ryb) i zdecydowano się je przechować. W przeciwnym razie, jeżeli wyniki statystycznie ważnego testu na wartość odstającą przeprowadzonego w odniesieniu do regresji liniowej odnotowanej w fazie wydalania wykażą, że pierwszy moment pobierania próbek w fazie wydalania został błędnie zawyżony, należy rozważyć możliwość obliczenia regresji liniowej w celu wyprowadzenia wartości k_2 z pominięciem pierwszego punktu pomiaru stężenia w fazie wydalania. W takich przypadkach, jeżeli niepewność pomiaru w ramach regresji liniowej zostanie w istotny sposób zmniejszona i jeżeli wystąpią przesłanki wskazujące niezbicie, że dana reakcja w fazie wydalania przebiegała zasadniczo według kinetyki pierwszego rzędu, można rozważyć możliwość wykorzystania uzyskanych wartości $C_{0,d}$ i k_2 w obliczeniach wydajności przyswajania. Podjęcie takiej decyzji należy w wyczerpujący sposób uzasadnić w sprawozdaniu. Może również okazać się, że reakcje w fazie wydalania przebiegały zgodnie z kinetyką inną niż kinetyka pierwszego rzędu. W przypadku uzasadnionego podejrzenia, że reakcje wydalania przebiegały zgodnie z kinetyką inną niż kinetyka pierwszego rzędu (tj. w przypadku gdy dane poddane przekształceniu w oparciu o logarytm naturalny będą zdawały się odpowiadać wykreślonej na wykresie prostej regresji liniowej), obliczenia wartości k_2 i $C_{0,d}$ najprawdopodobniej nie będą ważne – należy wówczas zasięgnąć porady biostatystyka.

Jeżeli wartość $C_{0,d}$ będzie zdecydowanie wyższa niż wartość pomiarowa ($C_{0,d} \gg C_{0,m}$), może to świadczyć o tym, że: substancja została wydalona bardzo szybko (tj. punkty pobierania próbek zostały wyznaczone blisko granicy oznaczalności danej metody analitycznej na wczesnym etapie fazy wydalania, por. sekcja 6 poniżej); reakcje w fazie wydalania nie przebiegały w pełni zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu; regresja liniowa, na podstawie której wyprowadzono wartość k_2 i $C_{0,d}$ została błędnie obliczona; lub że w niektórych okresach pobierania próbek w trakcie badania wystąpiły problemy związane z pomiarem stężeń. W takich przypadkach należy uważnie przeanalizować regresję liniową wykreśloną na wykresie pod kątem dowodów świadczących o pobraniu próbek na granicy oznaczalności lub w pobliżu granicy oznaczalności, a także pod kątem wartości odstających i oczywistych krzywizn (wskazujących na to, że dana reakcja przebiega według kinetyki innej niż kinetyka pierwszego rzędu), odnotowując poczynione obserwacje w sprawozdaniu. Wszelka późniejsza ponowna ocena regresji liniowej przeprowadzana w celu poprawy jakości wartości szacunkowych powinna zostać opisana i uzasadniona. Jeżeli stwierdzono, że przebieg danej reakcji istotnie odbiega od kinetyki pierwszego rzędu, obliczenia wartości k_2 i $C_{0,d}$ najprawdopodobniej nie będą ważne – należy wówczas zasięgnąć porady biostatystyka.

6. WSKAZÓWKI DOTYCZĄCE SUBSTANCJI BADANYCH PODLEGAJĄCYCH BARDZO SZYBKIEMU WYDALENIU

Jak wskazano w pkt 129 metody badawczej, szybkość wydalania niektórych substancji może być na tyle duża, że wiarygodne wyznaczenie wartości stężenia w czasie zerowym, $C_{0,d}$, oraz wartości k_2 nie będzie możliwe, ponieważ dokonanie pomiaru stężenia substancji w próbkach pobranych na bardzo wczesnym etapie fazy wydalania (tj. począwszy od drugiej próbki pobranej w fazie wydalania) nie będzie już możliwe (stężenia zgłaszane na granicy oznaczalności). Do takiej sytuacji doszło w trakcie badań międzylaboratoryjnych z wykorzystaniem benzo[a]pirenu przeprowadzonych w celu potwierdzenia niniejszej metody badawczej – wyniki tych badań zostały udokumentowane w sprawozdaniu z weryfikacji niniejszej metody. W takich przypadkach wiarygodne obliczenie regresji liniowej nie jest możliwe, ponieważ wyprowadzona szacunkowa wartość $C_{0,d}$ byłaby zbyt wysoka, przez co pozorna wartość wydajności przyswajania byłaby znacznie wyższa od 1. W takiej sytuacji można zachowawczo oszacować wartość k_2 oraz „górną granicę” BMF.

Obliczenie regresji liniowej (przy wykorzystaniu danych dotyczących stężenia poddanych przekształceniu w oparciu o logarytm naturalny zestawionych z osią czasu) w oparciu o te punkty danych w fazie wydalania, w których dokonano pomiaru stężenia – do punktu pomiaru pierwszego „niewykrywalnego” stężenia włącznie (stężenia na granicy oznaczalności), zapewni możliwość oszacowania wartości k_2 . W takich przypadkach najprawdopodobniej wykorzystane zostaną tylko dwa punkty danych (np. pierwszy i drugi dzień pobierania próbek w trakcie fazy wydalania), po czym wartość k_2 będzie można oszacować na podstawie równania A5.22 w dodatku 5. Wspomniana szacunkowa wartość k_2 może zostać wykorzystana do oszacowania wydajności przyswajania zgodnie z równaniem A7.1 po zastąpieniu wartości $C_{0,d}$ w równaniu zmierzonym stężeniem w czasie zerowym ($C_{0,m}$), jeżeli szacunkowa wartość $C_{0,d}$ będzie ewidentnie zdecydowanie wyższa niż wartość możliwa do osiągnięcia w trakcie badania. Jeżeli wartość $C_{0,m}$ okaże się niemierzalna, należy zastosować granicę wykrywalności w tkankach ryb. Jeżeli – w określonych przypadkach – uzyskana w ten sposób wartość α będzie większa niż 1, uznaje się, że wydajność przyswajania będzie w „najgorszym przypadku” wynosiła 1.

Następnie w oparciu o równanie A7.4 można oszacować maksymalną wartość BMF_k , która powinna zostać podana jako wartość „znacznie niższa niż” (\ll). Na przykład w przypadku badania przeprowadzonego przy częstotliwości karmienia wynoszącej 3 %, przy okresie półtrwania wydalania krótszym niż 3 dni i przy założeniu, że wartość α będzie w „najgorszym przypadku” wynosiła 1, wartość BMF_k będzie prawdopodobnie niższa niż 0,13. Biorąc pod cel, w jakim przeprowadza się te szacunki, oraz fakt, że uzyskane wartości będą miały zachowawczy charakter, skorygowanie ich pod kątem rozcieńczenia wynikającego ze wzrostu lub zawartości lipidów u ryb i w paszy nie jest konieczne.

Dodatek 8

PODEJŚCIA WYKORZYSTYWANE W CELU OSZACOWANIA WSTĘPNEJ WARTOŚCI BCF NA PODSTAWIE DANYCH ZGROMADZONYCH W RAMACH BADANIA NARAŻENIA DROGĄ POKARMOWĄ

Metoda narażenia drogą pokarmową została uwzględniona w niniejszej metodzie badawczej na potrzeby badania bioakumulacji substancji, których nie można w praktyce zbadać za pomocą metody narażenia drogą wodną. Metoda narażenia drogą wodną zapewniła prowadzić do uzyskania współczynnika biokoncentracji, natomiast metoda narażenia drogą pokarmową pozwala bezpośrednio uzyskać informacje dotyczące potencjału biomagnifikacji wynikającego z diety. W ramach wielu systemów bezpieczeństwa chemicznego obowiązuje wymóg podania informacji dotyczących poziomu biokoncentracji w wodzie (dotyczy to np. oceny ryzyka oraz Globalnego Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji). Dlatego też przy szacowaniu współczynnika biokoncentracji należy oprzeć się na danych pozyskanych w ramach badania narażenia drogą pokarmową, które będzie porównywalne z danymi uzyskanymi w ramach badań przeprowadzonych zgodnie z metodą narażenia drogą wodną⁽¹⁾. W niniejszej sekcji zbadano podejścia, które można zastosować, aby osiągnąć ten cel, zwracając jednocześnie uwagę na niedociągnięcia nieodzownie związane z tymi szacunkami.

W badaniu narażenia drogą pokarmową mierzy się wydalanie, aby obliczyć stałą szybkości wydalania, k_2 . Jeżeli oszacowanie stałej szybkości wchłaniania w oparciu o dostępne dane okaże się możliwe w sytuacji, w której ryby zostały narażone na działanie badanej substancji za pośrednictwem wody, można będzie oszacować również wartość kinetycznego BCF.

Szacunkowa wartość stałej szybkości wchłaniania w przypadku narażenia na działanie badanej substancji w wodzie będzie zależała od wielu założeń, z których wszystkie będą przyczyniały się do zwiększenia poziomu niepewności pomiaru sporządzanych szacunków. Ponadto w ramach przedmiotowego podejścia do szacowania poziomu BCF zakłada się, że ogólna szybkość wydalania (uwzględniając czynniki współdecydujące, takie jak rozkład w ciele i indywidualne procesy wydalania) będzie niezależna od techniki narażenia na działanie substancji zastosowanej w celu doprowadzenia do skażenia organizmu substancją badaną.

Poniżej przedstawiono podsumowanie głównych założeń nieodzownie związanych z metodą szacowania.

Wydalanie danej substancji po jej wchłonięciu drogą pokarmową przebiega w taki sam sposób jak wydalanie tej substancji w przypadku narażenia drogą wodną

Reakcja wchłaniania z wody będzie przebiegała według kinetyki pierwszego rzędu

W zależności od metody zastosowanej w celu oszacowania szybkości wchłaniania:

- proces wchłaniania można powiązać z samą masą ryb
- proces wchłaniania można powiązać z samym współczynnikiem podziału n-oktanol/woda danej substancji
- proces wchłaniania można powiązać zarówno z masą ryb, jak i z współczynnikiem podziału n-oktanol/woda danej substancji
- skala oddziaływania czynników, które mogą w praktyce wpłynąć na proces wchłaniania w badaniu narażenia drogą wodną, np. biodostępność substancji, poziom adsorpcji na aparaturze, wielkość cząsteczek itp., będzie znikoma
- oraz, co istotne:

Baza danych („zestaw szkoleniowy”), na podstawie której opracowano metodę szacowania szybkości wchłaniania, jest reprezentatywna dla badanej substancji

W szeregu ogólnie dostępnych publikacji wyprowadzono równania dotyczące wchłaniania substancji z wody u ryb za pośrednictwem skrzelii względem współczynnika podziału n-oktanol/woda danej substancji, masy ciała ryb (1) (2) (3) (4), objętości lub zawartości lipidów, przenikania/dyfuzji przez membranę (5) (6), objętości oddechowej ryb (7) oraz podejścia bazującego na lotności / bilansie masy (8) (9) (10). Szczegółowa ocena metod stosowanych w tym kontekście została przedstawiona w opracowaniu autorstwa Crookesa i Brooke'a (11). Publikację autorstwa Barbera (12), która dotyczyła głównie modelowania bioakumulacji poprzez monitorowanie wchłaniania substancji podanej w paszy, również należy uznać za przydatną w tym kontekście, ponieważ zawiera ona dane pozyskane dzięki zastosowaniu modeli służących do analizowania szybkości wchłaniania przez skrzelia. Jedną z sekcji dokumentu bazowego załączonego do protokołu dotyczącego narażenia drogą pokarmową z 2004 r. (13) również jest poświęcona tej problematyce.

⁽¹⁾ W środowisku naturalnym drogą prowadzącą do największego narażenia na działanie substancji w środowiskach wodnych jest prawdopodobnie spożycia wysoce hydrofobowych substancji – w takim przypadku szacunkowa wartość BCF nie odzwierciedla precyzyjnie potencjału bioakumulacyjnego danej substancji.

Wydaje się, że większość tych modeli została opracowana w oparciu o bazy danych zawierające ograniczoną ilość informacji. Jeżeli chodzi o modele, w przypadku których można uzyskać szczegółowe informacje na temat baz danych wykorzystanych do ich stworzenia, wydaje się, że takie modele są tworzone w oparciu o typy substancji o podobnej strukturze lub typy substancji należące do podobnej klasy (pod względem pełnionej przez nie funkcji, np. związki chloroorganiczne). Przyczynia się to do zwiększenia niepewności pomiaru, jeżeli model wykorzystuje się do prognozowania nie tylko parametrów właściwych dla danego badania, takich jak gatunek, temperatura itp., ale również stałej szybkości wchłaniania innego rodzaju substancji.

W przeglądzie dostępnych technik (11) podkreślono, że żadnej konkretnej metody nie można uznać za „bardziej prawidłową” od innej. Dlatego też należy przedstawić przejrzyste uzasadnienie decyzji o zastosowaniu określonego modelu. W przypadku istnienia szeregu metod, których zastosowanie można uznać za uzasadnione, warto rozważyć możliwość przedstawienia szeregu szacunków wartości k_1 (oraz BCF) lub zakresu wartości k_1 (oraz BCF) ustalonych zgodnie z różnymi metodami szacowania szybkości wchłaniania. Biorąc jednak pod uwagę różnice między poszczególnymi rodzajami modeli i zbiorami danych, na podstawie których je opracowano, zastosowanie średniej wartości ustalonej w oparciu o szacunki sporządzone na różne sposoby może nie być właściwe.

W opinii części badaczy w odniesieniu do tego rodzaju szacunków poziomu BCF należy dokonać korekty z tytułu biodostępności, aby wziąć pod uwagę adsorpcję substancji do rozpuszczalnego węgla organicznego (RWO) w warunkach narażenia drogą wodną i aby zapewnić zgodność szacunków z wynikami badań narażenia na działanie substancji w wodzie (np. (13) (14)). Dokonanie takiej korekty może jednak nie być uzasadnione, biorąc pod uwagę niskie poziomy RWO wymagane do sporządzenia szacunków zakładających wystąpienie „najgorszego przypadku” w badaniu narażenia drogą wodną (tj. stosunek stężenia substancji biodostępnej do stężenia substancji zmierzonego w roztworze). W przypadku wysoce hydrofobowych substancji szybkość wchłaniania przez skrzela może być ograniczona szybkością biernej dyfuzji przy powierzchni skrzeli; w takim przypadku może dojść do sytuacji, w której korekta zostanie zastosowana ze względu na wystąpienie tego zjawiska, a nie ze względów, dla których powinna zostać zastosowana.

Zaleca się, aby skoncentrować się na metodach wymagających oparcia się na danych wejściowych dotyczących badanych substancji, które można będzie łatwo pozyskać w ramach opisanego tutaj badania narażenia drogą pokarmową (tj. $\log K_{ow}$, masa ryb). Można zastosować również inne metody wymagające oparcia się na bardziej złożonych danych wejściowych, ale może wiązać się to z koniecznością przeprowadzenia dodatkowych pomiarów w ramach badania lub dysponowania szczegółową wiedzą na temat danej substancji badanej lub danego gatunku ryby, która może nie być powszechnie dostępna. Ponadto na decyzję o wyborze modelu może wpłynąć również poziom walidacji i dziedzina zastosowania (aby zapoznać się z wynikami przeglądu i analizy porównawczej różnych metod, zob. (11)).

Należy pamiętać o tym, że uzyskane szacunkowe wartości k_1 i BCF są niepotwierdzone, co może wiązać się z koniecznością korzystania z nich zgodnie z podejściem bazującym na wadze dowodów, podobnie jak ma to miejsce w przypadku wyprowadzonej wartości BMF i wyprowadzonych parametrów substancji (np. wielkości cząstek), aby uzyskać całościowy obraz potencjału bioakumulacyjnego danej substancji. Sposób interpretowania tych parametrów i ich wykorzystywania może zależeć od obowiązujących ram regulacyjnych.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Sijm D.T.H.M., Pärt P. and Opperhuizen A. (1993), The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 25: 1-14.
- (2) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., Part P. and Opperhuizen A. (1994), Experimentally determined blood and water flow limitations for uptake of hydrophobic compounds using perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Allometric applications. *Aquat. Toxicol.* 30: 325-341.
- (3) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
- (4) Barber M.C. (2003), A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 1963-1992.
- (5) Opperhuizen A. (1986), Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish, in *Aquatic Toxicology and Environmental Fate*, STP 921, Poston, T.M. and Purdy, R., Editors. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA: 304-315.

- (6) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2343-2355.
- (7) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environ. Sci. Technol.* 23: 699-707.
- (8) Hendriks A.J., van der Linde A., Cornelissen G. and Sijm D.T.H.M. (2001). The power of size. 1. Rate constants and equilibrium ratios for accumulation of organic substances related to octanol-water partition ratio and species weight. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 1399-1420.
- (9) Campfens J. and Mackay D. (1997), Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. *Environ. Sci. Technol.* 31: 577-583.
- (10) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2003), A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. *QSAR Comb. Sci.* 22: 337-345.
- (11) Crookes M. and Brooke D. (2010), Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Draft Report. Environmental Agency, Bristol, UK.
- (12) Barber M.C. (2008), Dietary uptake models used for modelling the bioaccumulation of organic contaminants in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 755-777
- (13) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- (14) Gobas F. and Morrison H. (2000), Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, in *Handbook of property estimation methods for chemicals*, Boethling, R.S. and Mackay, D., Editors. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA: 189-231."

17) w części C rozdział C.20 otrzymuje brzmienie:

„C.20 Badanie wpływu substancji na rozrodczość *Daphnia magna*

WPROWADZENIE

Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 211 (2012). Dotyczące badań wytyczne OECD są poddawane okresowemu przeglądowi w związku z postępem naukowym. Wytyczne dotyczące badań wpływu na rozrodczość nr 211 opracowano na podstawie wytycznej dotyczącej badań nr 202, część II, badanie wpływu substancji na rozrodczość *Daphnia* sp. (1984). Ogólnie przyjmuje się, że dane zgromadzone w trakcie badań przeprowadzanych zgodnie z wytyczną dotyczącą badań nr 202 mogą cechować się dużym stopniem zróżnicowania. Doprowadziło to do sytuacji, w której istotna część podejmowanych wysiłków służy identyfikowaniu przyczyn występowania tego rodzaju różnic w celu wypracowania lepszej metody badawczej. Wytyczną dotyczącą badań nr 211 opracowano w oparciu o rezultaty prowadzonej działalności badawczej, wyniki badań międzylaboratoryjnych oraz wyniki badań walidacyjnych przeprowadzonych w latach 1992 (1), 1994 (2) i 2008 (3).

Najistotniejsze różnice między początkową wersją wytycznych dotyczących badań wpływu na rozrodczość (wytyczna dotycząca badań nr 202 z 1984 r.) a ich drugą wersją (wytyczna dotycząca badań nr 211 z 1998 r.) są następujące:

- zalecanym gatunkiem do wykorzystania w badaniu jest *Daphnia magna*;
- badanie trwa 21 dni;
- jeżeli chodzi o badania półstatyczne, liczba zwierząt, na których należy przetestować każde badane stężenie, została zmniejszona z co najmniej 40, najlepiej podzielonych na cztery grupy po 10 zwierząt, do co najmniej 10 zwierząt utrzymywanych osobno (przy czym w przypadku badań przepływowych dopuszcza się możliwość zastosowania innych planów badania);

- przedstawiono bardziej szczegółowe zalecenia dotyczące ośrodka badania i warunków karmienia.
- wśród głównych różnic między drugą wersją wytycznych dotyczących badań wpływu na rozrodczość (wytyczne dotyczące badań nr 211 z 1998 r.) a niniejszą wersją wytycznych należy wymienić:
- dodano dodatek 7, w którym opisano procedury określania płci nowo wyklutych zwierząt w przypadkach, gdy jest to wymagane. Zgodnie z poprzednimi wersjami niniejszej metody badawczej zapewnienie określonej proporcji płci stanowi fakultatywny punkt końcowy;
- zmienna zależna liczby żyjącego potomstwa na zwierzę rodzicielskie, które przeżyło badanie, została uzupełniona dodatkową zmienną zależną związaną z rozrodczością zwierząt z gatunku *Daphnia*, tj. łączną liczbą żyjącego potomstwa pod koniec badania na każdą rozwielitkę rodzicielską na początku badania, co powala wykluczyć przypadkową lub niezamierzoną upadkowość zwierząt rodzicielskich z analizy. Wspomniana zmienna zależna ma na celu dostosowanie przedmiotowej zmiennej zależnej do innych metod badawczych wykorzystywanych do oceniania wpływu substancji na rozrodczość bezkręgowców. Ponadto, jeżeli chodzi o przedmiotową zmienną zależną, w niniejszej metodzie badawczej dopuszcza się możliwość usunięcia źródła błędu, tj. wpływu przypadkowej lub niezamierzonej upadkowości zwierząt rodzicielskich, w przypadku gdyby taka upadkowość wystąpiła w okresie narażenia na działanie substancji.
- na potrzeby podejścia EC_x (np. EC₁₀ lub EC₅₀) i podejścia NOEC/LOEC uwzględniono dodatkowe wytyczne statystyczne dotyczące planu badania i przetwarzania wyników badania.
- wprowadzono również badanie graniczne.

Stosowane definicje znajdują się w dodatku 1.

ZASADA BADANIA

Głównym celem badania jest ocenie wpływu substancji chemicznej na zdolność rozrodczą *Daphnia magna*. W tym celu młode samice *Daphnia* (zwierzęta rodzicielskie) w wieku poniżej 24 godzin na początku badania narażają się na działanie badanej substancji chemicznej dodawanej do wody w różnych stężeniach. Badanie trwa 21 dni. Pod koniec badania szacuje się łączną liczbę wyprodukowanego żyjącego potomstwa. Zdolność rozrodczą zwierząt rodzicielskich można wyrazić również w innej formie (np. podając liczbę żyjącego potomstwa wyprodukowanego na dane zwierzę rodzicielskie na dzień począwszy od dnia wyprodukowania pierwszego potomstwa), ale dane na ten temat należy zgłaszać niezależnie od łącznej liczby wyprodukowanego żyjącego potomstwa odnotowanej pod koniec badania. Z uwagi na specyficzny charakter planu badania półstatycznego w porównaniu z metodami badawczymi stosowanymi w kontekście badania rozrodczości bezkręgowców, dopuszcza się również możliwość zliczenia liczby żyjącego potomstwa wyprodukowanego przez poszczególne zwierzęta rodzicielskie. W odróżnieniu od pozostałych metod badawczych stosowanych w kontekście badania rozrodczości bezkręgowców, zastosowanie takiej metody zliczania żyjącego potomstwa pozwala wykluczyć z analizy danych określoną liczbę potomstwa, jeżeli zwierzę rodzicielskie, które wyprodukowało to potomstwo, padnie w przypadkowy lub nieumyślny sposób w okresie badania. Dlatego też w przypadku wystąpienia upadkowości wśród zwierząt rodzicielskich w kontrpróbach narażonych na działanie substancji należy ustalić, czy taka upadkowość przebiega zgodnie z zależnością stężenie-odpowiedź, np. czy odnotowuje się istotną regresję odpowiedzi w stosunku do krzywej stężenia substancji chemicznej o nachyleniu dodatnim (w tym celu można zastosować badanie statystyczne zbliżone do badania tendencji Cochran-Armitage'a). Jeżeli upadkowość nie przebiega zgodnie z zależnością stężenie-odpowiedź, kontrpróby, w których odnotowano upadkowość zwierząt rodzicielskich, powinny zostać wykluczone z analizy wyniku badania. Jeżeli upadkowość przebiega zgodnie z zależnością stężenie-odpowiedź, upadkowość zwierząt rodzicielskich powinna zostać oznaczona jako skutek narażenia na działanie badanej substancji chemicznej, a kontrpróby nie powinny zostać wykluczone z analizy. Jeżeli zwierzę rodzicielskie padnie w trakcie badania, np. przypadkowo wskutek niewłaściwego traktowania lub wypadku lub nieumyślnie z uwagi na wystąpienie niewyjaśnionego zdarzenia niezwiązanego z wpływem badanej substancji chemicznej, lub okaże się zwierzęciem płci męskiej, kontrpróbę wyklucza się z analizy (aby uzyskać dodatkowe informacje, zob. pkt 51). Toksyczne oddziaływanie badanej substancji chemicznej na zdolność rozrodczą wyraża się jako EC_x, dopasowując stosowne dane do odpowiedniego modelu w drodze regresji liniowej w celu oszacowania stężenia, które mogłoby doprowadzić do obniżenia zdolności rozrodczej o odpowiednio x %, lub alternatywnie jako wartość NOEC/LOEC (4). Najlepiej byłoby, aby badane stężenia obejmowały najniższe zastosowane stężenia, przy których obserwuje się zmiany (np. EC₁₀), co oznacza, że wartość tę oblicza się w drodze interpolacji, a nie ekstrapolacji.

Należy również odnotować wskaźnik przeżycia zwierząt rodzicielskich oraz czas, jaki upłynął do chwili wyklucia się pierwszego lęgu. Można również zbadać inne skutki narażenia na działanie substancji chemicznej dla parametrów takich jak wzrost (np. długość) oraz, potencjalnie, wrodzony wskaźnik przyrostu populacji (zob. pkt 44).

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

Wyniki badania ostrej toksyczności (zob. rozdział C.2 niniejszego załącznika: badanie nagłego unieruchomienia *Daphnia* sp.) przeprowadzonego na *Daphnia magna* mogą okazać się pomocne przy wyborze odpowiedniego zakresu badanych stężeń w badaniach rozrodczości. Rozpuszczalność w wodzie i prężność par badanej substancji chemicznej powinna być znana, przy czym należy przyjąć wiarygodną metodę analityczną wykorzystywaną do oznaczania ilościowego zawartości substancji chemicznej w roztworach do badań o znanej sprawności odzyskowej i granicy oznaczalności.

Informacje na temat badanej substancji chemicznej, które mogą okazać się przydatne przy ustalaniu warunków badania, obejmują wzór strukturalny, czystość substancji chemicznej, stabilność przy narażeniu na działanie światła, stabilność w warunkach badania, stałą dysocjacji, P_{ow} oraz wyniki badania szybkiej biodegradowalności (zob. rozdziały C.4 (ustalenie „szybkiej” biodegradowalności) i C.29 (szybka biodegradowalność – zawartość CO₂ w zamkniętych naczyniach) niniejszego załącznika).

WAŻNOŚĆ BADANIA

Aby badanie było ważne, powinny być spełnione następujące kryteria wykonania w przypadku prób kontrolnych:

- upadkowość zwierząt rodzicielskich (samic *Daphnia*) nie może przekraczać 20 % w chwili zakończenia badania;
- średnia liczba żyjącego potomstwa wyprodukowanego przez zwierzę rodzicielskie, które przeżyło do zakończenia badania wynosi ≥ 60 .

Uwaga: Takie samo kryterium ważności (20 %) można wykorzystać przy badaniu przypadkowej i nieumyślnej upadkowości w próbach kontrolnych, a także przy analizowaniu poszczególnych badanych stężeń.

OPIS METODY

Aparatura

Naczynie badawcze i inna aparatura, które będą się stykały z roztworami do badań, powinny zostać wykonane w całości ze szkła lub innego chemicznie obojętnego materiału. Naczyniami badawczymi są zazwyczaj szklane zlewki.

Ponadto przy przeprowadzaniu badania konieczne może okazać się skorzystanie z niektórych lub z wszystkich wymienionych poniżej urządzeń:

- miernika tlenu (wyposażonego w mikroelektrodę lub inne odpowiednie urządzenie wykorzystywane do pomiaru stężenia rozpuszczonego tlenu w próbkach o małej objętości);
- odpowiedniej aparatury do kontrolowania temperatury;
- pehametru;
- urządzeń wykorzystywanych do oznaczania twardości wody;
- urządzeń wykorzystywanych do oznaczania stężenia całkowitego węgla organicznego w wodzie lub urządzeń wykorzystywanych do oznaczania chemicznego zapotrzebowania na tlen (ChZT);
- odpowiedniej aparatury do kontrolowania warunków oświetlenia i do pomiaru światłości.

Organizm doświadczalny

Gatunkiem wykorzystywanym w badaniu jest *Daphnia magna* Straus ⁽¹⁾.

Najlepiej, aby klon został zidentyfikowany w drodze typowania genetycznego. Badania (1) pokazują, że wydajność reprodukcyjna klonu A (pochodzącego z IRCHA we Francji) (5) regularnie spełnia kryterium ważności wyznaczone dla średniej liczby żyjącego potomstwa wynoszącej ≥ 60 na zwierzę rodzicielskie, które przeżyło badanie, w przypadku gdy warunki hodowli odpowiadają warunkom opisanym w niniejszej metodzie badawczej. Dopuszcza się jednak możliwość wykorzystania innych klonów, jeżeli uda się wykazać, że warunki hodowli zwierząt z gatunku *Daphnia* spełniają kryteria ważności wyznaczone dla danego badania.

(¹) Dopuszcza się również możliwość wykorzystania innych rozwielitek, jeżeli spełnią one – w stosownych przypadkach – obowiązujące kryteria ważności (kryterium ważności dotyczące zdolności rozrodczej w próbach kontrolnych powinno obowiązywać w odniesieniu do wszystkich gatunków). W przypadku wykorzystania innych rozwielitek należy wyraźnie określić wybrane gatunki i uzasadnić ich wybór.

Na początku badania wiek zwierząt nie powinien przekraczać 24 godzin, przy czym zwierzęta nie powinny być potomstwem z pierwszego wylęgu. Zwierzęta powinny pochodzić ze zdrowej populacji (tj. z populacji, w której nie odnotowano oznak świadczących o wystąpieniu stresu, takich jak wysoka upadkowość, obecność samców i sioდეłek, opóźnienia w produkcji pierwszego lęgu, obecność przebarwionych zwierząt itp.). Zwierzęta pochodzące z populacji powinny przebywać w warunkach hodowlanych (światło, temperatura, ośrodek, pasza i liczba zwierząt na jednostkę objętości) zbliżonych do warunków, które mają zostać zastosowane w badaniu. Jeżeli ośrodek, w którym zwierzęta z gatunku *Daphnia* mają przebywać w trakcie badania, różni się od ośrodka, w którym zwierzęta z gatunku *Daphnia* są standardowo utrzymywane, za dobrą praktykę uznaje się ustanowienie okresu aklimatyzacji przed badaniem wynoszącego zwykle około trzech tygodni (tj. odpowiadającego długości życia jednego pokolenia), aby zapobiec wystąpieniu stresu u zwierząt rodzicielskich.

Ośrodek badawczy

Zaleca się, aby przedmiotowe badanie zostało przeprowadzone w pełni określonym ośrodku. Może to pozwolić uniknąć konieczności wprowadzania dodatkowych elementów (np. wodorostów, ekstraktów glebowych), które trudno jest scharakteryzować, przyczyniając się tym samym do zwiększenia możliwości zapewnienia harmonizacji procedur stosowanych w poszczególnych laboratoriach. Ośrodki ElenDt M4 (6) i M7 (zob. dodatek 2) uznano za odpowiednie do tego celu. Inne ośrodki (np. (7) (8)) mogą jednak również zostać uznane za odpowiednie, o ile będzie można wykazać, że wyniki osiągnięte przez daną hodowlę zwierząt z gatunku *Daphnia* spełniają kryteria ważności wyznaczone w ramach badania.

W przypadku korzystania z ośrodków, w których występują niezidentyfikowane elementy dodatkowe, takie elementy powinny zostać wyraźnie określone, a w sprawozdaniu z badania należy przedstawić informacje na temat ich składu, zwracając szczególną uwagę na zawartość węgla, ponieważ czynnik ten może wywrzeć wpływ na podawaną paszę. Zaleca się oznaczenie całkowitego węgla organicznego lub chemicznego zapotrzebowania na tlen (ChZT) w preparatach podstawowych, w których występuje dodatkowy element organiczny, oraz sporządzenie szacunków dotyczących wpływu całkowitego węgla organicznego / chemicznego zapotrzebowania na tlen na ośrodek wykorzystywany w badaniu. Ponadto zaleca się, aby poziomy stężenia całkowitego węgla organicznego w ośrodku (tj. przed dodaniem glonów) utrzymywały się poniżej 2 mg/l (9).

Przy przeprowadzaniu badań przy wykorzystaniu substancji chemicznych zawierających metale należy pamiętać, że właściwości ośrodka wykorzystywanego w badaniu (np. twardość, zdolność chelatująca) mogą wywrzeć wpływ na toksyczność badanej substancji chemicznej. Dlatego też zaleca się korzystanie z ośrodka, który został w pełni określony. Jednak obecnie jedynymi w pełni określonymi ośrodkami, co do których wiadomo, że są odpowiednie do celów związanych z długoterminową hodowlą zwierząt z gatunku *Daphnia magna*, są ośrodki ElenDt M4 i M7. W składzie obydwu tych ośrodków występuje czynnik chelatujący EDTA. Z przeprowadzonych badań (2) wynika, że poziom „toksyczności pozornej” kadmu jest zazwyczaj niższy, w przypadku gdy badanie wpływu na rozrodczość przeprowadza się w ośrodkach M4 i M7 niż w przypadku gdy badanie to przeprowadza się w ośrodkach, w których nie występuje EDTA. Dlatego też nie zaleca się badania substancji chemicznych zawierających metale w ośrodkach M4 i M7; w przypadku takich substancji chemicznych należy również unikać korzystania z innych ośrodków zawierających czynniki chelatujące. W przypadku substancji chemicznych zawierających metale można rozważyć możliwość skorzystania z alternatywnych ośrodków, takich jak np. odtworzona twarda woda słodka spełniająca normy ASTM (9), która nie zawiera EDTA. Ośrodek stworzony dzięki połączeniu odtworzonej twardej wody słodkiej i ekstraktu z wodorostów (10) uznaje się za odpowiedni do celów długoterminowej hodowli *Daphnia magna* (2).

Stężenie rozpuszczonego tlenu na początku badania i w jego trakcie powinno przekraczać 3 mg/l. Wartość pH powinna mieścić się w przedziale 6–9 i zazwyczaj nie powinna różnić się o więcej niż 1,5 jednostki w ramach danego pojedynczego badania. Zaleca się, aby poziom twardości (wyrażony jako stężenie CaCO₃) przekraczał 140 mg/l. Wydajność reprodukcyjna odnotowana w badaniach przeprowadzonych przy takim i wyższym poziomie twardości spełniała kryteria ważności (11) (12).

Roztwory do badań

Roztwory do badań wybranych stężeń przygotowuje się zazwyczaj, rozcieńczając roztwór podstawowy. Roztwory podstawowe powinny być w miarę możliwości przygotowywane bez użycia jakichkolwiek rozpuszczalników lub środków dyspergujących, poprzez mechaniczne mieszanie lub wstrząsanie badanych substancji chemicznych w ośrodku wykorzystywanym w badaniu, np. poprzez wstrząsanie, bełtanie lub sonikację lub przy zastosowaniu innych stosownych metod. Przed wprowadzeniem organizmów doświadczalnych zaleca się poddanie układów badawczych działaniu badanej substancji chemicznej w stężeniach, które mają być zastosowane w badaniu, przez okres konieczny do wykazania utrzymania stabilnych stężeń ekspozycyjnych. Jeżeli badana substancja chemiczna jest trudno rozpuszczalna w wodzie, należy zastosować procedury postępowania z trudnymi substancjami opisane w wytycznych OECD (13). Należy unikać stosowania rozpuszczalników lub środków dyspergujących, choć w niektórych przypadkach może okazać się to konieczne, aby przygotować roztwór podstawowy o stężeniu odpowiednim do tego, by mógł być podawany zwierzętom w określonych dawkach.

Poza próbą kontrolną z wykorzystaniem badanych stężeń należy również wykorzystać próbę kontrolną z wodą rozcieńczającą wraz z odpowiednimi kontrpróbami oraz – jeżeli okaże się to nieuniknione – próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem wraz z odpowiednimi kontrpróbami. W badaniu należy korzystać wyłącznie z rozpuszczalników lub środków dyspergujących, co do których stwierdzono, że nie wywierają żadnego istotnego wpływu na zmienną zależną lub że wywierają wyłącznie minimalny wpływ na zmienną zależną. Przykłady odpowiednich rozpuszczalników (np. aceton, etanol, metanol, dimetyloformamid i glikol trietylenowy) i środków dyspergujących (np. Cremophor RH40, metyloceluloza 0,01 % i HCO-40) przedstawiono w (13). W przypadku zastosowania rozpuszczalnika lub środka dyspergującego stężenie końcowe tego rozpuszczalnika lub środka dyspergującego nie może przekraczać 0,1 ml/l (13) i powinno mieć taką samą wartość we wszystkich naczyniach badawczych z wyjątkiem naczynia wykorzystywanego na potrzeby próby kontrolnej z wodą rozcieńczającą. Należy jednak dołożyć wszelkich starań, aby utrzymać stężenie rozpuszczalnika na możliwie jak najniższym poziomie.

PROCEDURA

Warunki narażenia na działanie substancji

Czas trwania

Badanie trwa 21 dni.

Obciążenie

Zwierzęta rodzicielskie utrzymuje się pojedynczo, po jednym na naczynie badawcze, w osrodku o objętości wynoszącej zazwyczaj 50–100 ml w poszczególnych naczyniach badawczych (w przypadku *Daphnia magna* dopuszcza się możliwość zapewnienia osrodka o mniejszej objętości, w szczególności dla mniejszych rozwielitek, np. *Ceriodaphnia dubia*), chyba że w planie badania przewidziano konieczność przeprowadzenia badania przepływowego.

Zapewnienie osrodka o większej objętości może niekiedy okazać się konieczne, aby spełnić wymagania przewidziane w procedurze analitycznej wykorzystywanej w celu oznaczenia stężenia badanej substancji chemicznej, choć dopuszcza się również możliwość łączenia kontrprób na potrzeby analizy chemicznej. W przypadku zastosowania objętości wyższych niż 100 ml konieczne może okazać się zwiększenie dawki podawanej zwierzętom z gatunku *Daphnia*, aby zapewnić odpowiednią dostępność pokarmu i zgodność z kryteriami ważności.

Zwierzęta doświadczalne

Jeżeli chodzi o badania półstatyczne, takie badania przeprowadza się na co najmniej 10 zwierzętach utrzymywanych pojedynczo na potrzeby każdego badanego stężenia oraz na co najmniej 10 zwierzętach utrzymywanych pojedynczo w ramach serii kontrolnych.

Jeżeli chodzi o badania przepływowe, za odpowiednie uznano przeprowadzenie takiego badania na 40 zwierzętach podzielonych na cztery grupy liczące po 10 zwierząt na potrzeby każdego badanego stężenia (1). Dopuszcza się również możliwość wykorzystania mniejszej liczby organizmów doświadczalnych, przy czym zaleca się, aby badanie każdego stężenia przeprowadzać na co najmniej 20 zwierzętach podzielonych na dwie kontrpróby lub większą ich liczbę o równej liczbie zwierząt (np. cztery kontrpróby po pięć rozwielitek). Należy zwrócić uwagę na fakt, że w przypadku badań, w których zwierzęta przetrzymuje się w grupach, wykluczenie potomstwa z analizy statystycznej w przypadku wystąpienia niezamierzonej/przypadkowej upadkowości po rozpoczęciu aktywności rozrodczej nie będzie możliwe; dlatego też w takich przypadkach zdolność rozrodczą należy ujmować jako łączną liczbę żyjącego potomstwa wyprodukowanego przez zwierzę rodzicielskie, które żyło w chwili rozpoczęcia badania.

Do naczyń badawczych należy wprowadzić substancję chemiczną w odpowiednim stężeniu, a wszelkie dalsze czynności związane z naczyniami badawczymi należy przeprowadzać losowo. Niezastosowanie się do tych zasad może doprowadzić do wystąpienia błędów systematycznych, które mogą zostać uznane za skutek wywołany stężeniem substancji. W szczególności w przypadku, gdy jednostki doświadczalne obsługuje się zgodnie z porządkiem poddawania działaniu substancji chemicznej lub podawania substancji w określonych stężeniach, skutek wywołany upływem czasu, np. zmęczenie operatora lub innego rodzaju błąd, może wywołać poważniejszy wpływ przy wyższych stężeniach substancji. Ponadto jeżeli istnieje prawdopodobieństwo, że warunki początkowe lub warunki otoczenia w ramach badania, takie jak położenie w laboratorium, wywrą wpływ na wyniki badania, należy rozważyć możliwość wstrzymania badania.

Karmienie

Zaleca się, aby zwierzęta w badaniach półstatycznych były karmione codziennie, a w przypadku gdy nie będzie to możliwe – co najmniej trzy razy w tygodniu (tj. przy wymianie ośrodków). Należy wziąć pod uwagę możliwość rozcieńczenia stężeń ekspozycyjnych wskutek dodania paszy i należy w miarę możliwości nie dopuszczać do wystąpienia takich sytuacji poprzez korzystanie z zagęszczonych zawiesin z glonów. Należy zgłaszać wszelkie przypadki odejścia od tych zasad (np. przy przeprowadzaniu badań przepływowych).

Zaleca się, aby w trakcie badania zwierzęta rodzicielskie karmić żywymi komórkami glonów należących do jednego lub większej liczby następujących gatunków: *Chlorella*, *Pseudokirchneriella subcapitata* (dawniej *Selenastrum capricornutum*) oraz *Desmodesmus subspicatus* (dawniej *Scenedesmus subspicatus*). Podawany pokarm powinien zawierać odpowiednią ilość węgla organicznego (C), jaką należy dostarczyć poszczególnym zwierzętom rodzicielskim. Przeprowadzone badania (14) wykazały, że w przypadku *Daphnia magna* dawka pokarmu wynosząca od 0,1 mg do 0,2 mg C na zwierzę z gatunku *Daphnia* na dzień jest odpowiednia do tego, by dane zwierzę mogło wyprodukować liczbę żyjącego potomstwa wymaganą do spełnienia kryteriów ważności ustanowionych dla danego badania. Dawki pokarmu można podawać w regularnych odstępach czasu przez cały okres badania albo – w razie potrzeby – na początku badania można podawać pokarm z mniejszą częstotliwością, zwiększając ją w trakcie badania w miarę wzrostu zwierząt rodzicielskich. W takim przypadku dawki pokarmu powinny nadal utrzymywać się w zalecanym zakresie 0,1–0,2 mg C na zwierzę z gatunku *Daphnia* na dzień przez cały okres badania.

Jeżeli na potrzeby zapewnienia podania odpowiedniej dawki stosuje się wskaźniki zastępcze, np. liczbę komórek glonów lub absorbancję światła (tj. jeżeli takie wskaźniki stosuje się w celu usprawnienia przebiegu badania z uwagi na czasochłonność procesu pomiaru zawartości węgla), każde laboratorium powinno opracować swój własny nomogram zestawiający wartość danego wskaźnika zastępczego z zawartością węgla danej hodowli glonów (aby zapoznać się ze wskazówkami w zakresie sporządzania nomogramu, zob. dodatek 3). Nomogramy należy sprawdzać co najmniej raz do roku lub częściej, jeżeli doszło do zmiany warunków hodowli glonów. Ustalono, że absorbancja światła stanowi lepszy wskaźnik zastępczy dla zawartości węgla niż liczba komórek (15).

Zwierzęta z gatunku *Daphnia* należy karmić zagęszczoną zawiesiną z glonów, aby ograniczyć objętość przenieszonego do naczyń badawczych ośrodka zawierającego hodowlę glonów do minimum. Glony można zagęścić poprzez ich odwirowanie i ponowne utworzenie zawiesiny w ośrodku zawierającym hodowlę zwierząt z gatunku *Daphnia*.

Oświetlenie

Oświetlanie przez 16 godzin z intensywnością nieprzekraczającą $15\text{--}20 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ mierzoną na powierzchni wody w danym naczyniu. Dla przyrządów do pomiaru światła kalibrowanych w luksach zalecanej wartości światłości wynoszącej $15\text{--}20 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ odpowiada w przybliżeniu równoważny zakres 1 000–1 500 luksów dla chłodnego światła białego.

Temperatura

Temperatura ośrodków wykorzystywanych w badaniu powinna mieścić się w zakresie 18–22 °C. Jeżeli będzie to możliwe, w ramach żadnego pojedynczego badania temperatura w ujęciu dziennym nie powinna jednak odbiegać od tego zakresu o więcej niż 2 °C w (np. 18–20, 19–21 lub 20–22 °C). Właściwe może być użycie dodatkowego naczynia badawczego do celów monitorowania temperatury.

Napowietrzanie

W czasie trwania badania naczynia badawcze nie powinny być napowietrzane.

Plan badania

Badanie ustalające zakres

W razie potrzeby przeprowadzane jest badanie ustalające zakres, na przykład obejmujące pięć stężeń badanej substancji chemicznej i dwie kontrpróby dla każdej grupy badanej i kontrolnej. Dodatkowe informacje dotyczące ostrej toksyczności dla *Daphnia* lub innych organizmów wodnych, uzyskane na podstawie badań podobnych substancji chemicznych lub literatury, mogą okazać się przydatne również przy podejmowaniu decyzji dotyczącej zakresu stężeń, jakie mają zostać użyte w badaniu ustalającym zakres.

Badanie ustalające zakres trwa 21 dni albo dostateczny okres pozwalający w wiarygodny sposób prognozować poziom skutków. Na koniec badania oceniana jest rozrodczość *Daphnia*. Należy odnotować liczbę zwierząt rodzicielskich i występowanie potomstwa.

Badanie ostateczne

Zwykle powinno być co najmniej pięć badanych stężeń, w tym stężenie efektywne (np. EC_x), ułożonych w serii geometrycznej ze współczynnikiem rozdziału najlepiej nieprzekraczającym 3,2. Należy zastosować właściwą liczbę kontrprób dla każdego badanego stężenia (zob. pkt 24–25). Jeżeli użyto mniej niż pięć stężeń, należy podać uzasadnienie. Nie należy badać substancji chemicznych powyżej ich granicy rozpuszczalności w ośrodku użytym w badaniu. Przed przeprowadzeniem doświadczenia wskazane jest uwzględnienie mocy statystycznej planu badań i zastosowanie odpowiednich metod statystycznych (4). Przy ustalaniu zakresu stężeń należy uwzględnić następujące kwestie:

- (i) jeżeli szacowane jest EC_x odnoszące się do wpływu na rozrodczość, wskazane jest użycie wystarczających stężeń w celu określenia EC_x z właściwym poziomem ufności. Najlepiej byłoby, gdyby zastosowane badane stężenia zawierały w swoim zakresie szacowane EC_x , tak aby EC_x obliczane było w drodze interpolacji, a nie ekstrapolacji. Na potrzeby dalszej analizy statystycznej korzystne jest zastosowanie większej liczby badanych stężeń (np. 10) i mniejszej liczby kontrprób dla każdego stężenia (np. 5, dzięki czemu całkowita liczba pojemników będzie stała) oraz 10 prób kontrolnych.
- (ii) jeżeli szacowane jest LOEC lub NOEC, najniższe badane stężenie powinno być wystarczająco niskie, aby zdolność rozrodcza przy tym stężeniu nie była znacząco niższa niż w próbie kontrolnej. W innym przypadku badanie będzie musiało być powtórzone ze zmniejszonym najniższym stężeniem;
- (iii) jeżeli szacowane jest LOEC lub NOEC, najwyższe badane stężenie powinno być wystarczająco wysokie, aby zdolność rozrodcza przy tym stężeniu była znacząco niższa niż w próbie kontrolnej. W innym przypadku badanie należy powtórzyć z podwyższonym najwyższym stężeniem, chyba że w badaniu wstępnym jako najwyższe badane stężenie zastosowano maksymalne badane stężenie wymagane do badania wpływu długoterminowego (tj. 10 mg/l).

Jeżeli przy najwyższym stężeniu w badaniu ustalającym zakres (np. przy stężeniu wynoszącym 10 mg/l) nie obserwuje się wpływu lub jeżeli na podstawie braku toksyczności dla innych organizmów lub małego/braku wchłaniania istnieje duże prawdopodobieństwo, że badana substancja chemiczna ma niską toksyczność lub nie jest toksyczna, badanie wpływu na rozrodczość można przeprowadzić jako badanie graniczne, stosując badane stężenie wynoszące np. 10 mg/l oraz kontrolę. Należy zastosować dziesięć kontrprób zarówno w odniesieniu do grupy badanej, jak i grupy kontrolnej. W przypadku gdy konieczne jest przeprowadzenie badania granicznego metodą przepływu dyfuzyjnego, wystarczy mniejsza liczba kontrprób. Badanie graniczne będzie okazją do wykazania, że przy stężeniu granicznym nie występuje statystycznie istotny wpływ, ale jeśli wpływ jest rejestrowany, zazwyczaj wymagane będzie pełne badanie.

Kontrolne

Do serii badanej dodatkowo musi być włączona jedna seria kontrolna ośrodka użytego w badaniu oraz, w stosownych przypadkach, jedna seria kontrolna zawierająca rozpuszczalnik lub środek dyspergujący. Gdy stosowany jest rozpuszczalnik lub środek dyspergujący, ich stężenie powinno być takie samo jak używane w zbiornikach zawierających badaną substancję chemiczną. Należy zastosować właściwą liczbę kontrprób (zob. pkt 23–24).

Na ogół w dobrze przebiegającym badaniu współczynnik zmienności średniej liczby żyjącego potomstwa na zwierzę rodzicielskie w próbach kontrolnych powinien wynosić $\leq 25\%$; współczynnik ten należy podać w odniesieniu do planów badania z wykorzystaniem pojedynczo trzymany zwierząt.

Wymiana ośrodka użytego do badania

Częstotliwość wymiany ośrodka będzie zależała od stabilności badanej substancji chemicznej, lecz powinna wynosić co najmniej trzy razy na tydzień. Jeżeli z wstępnych badań stabilności (zob. pkt 7) wynika, że stężenie badanej substancji chemicznej nie jest stabilne (tj. poza zakresem 80–120 % stężenia nominalnego lub spada poniżej 80 % mierzonego stężenia początkowego) w maksymalnym okresie wymiany (tj. przez trzy dni), należy rozważyć częstszą wymianę ośrodka lub zastosowanie badania przepływowego.

Gdy ośrodek jest wymieniany w badaniach półstatycznych, przygotowuje się drugą serię naczyń badawczych, a zwierzęta rodzicielskie są do nich przenoszone, na przykład szklaną pipetą o odpowiedniej średnicy. Należy zminimalizować objętość ośrodka przenoszonego wraz z *Daphnia*.

Obserwacje

Wyniki obserwacji dokonanych w trakcie trwania badania należy odnotować w arkuszach danych (zob. przykłady w dodatkach 4 i 5). Jeśli inne pomiary są wymagane (zob. pkt 44), konieczne mogą być dodatkowe obserwacje.

Potomstwo

Potomstwo spłodzone przez każde zwierzę rodzicielskie najlepiej codziennie usuwać i liczyć od momentu pojawienia się pierwszego wylęgu, aby powstrzymać je przed zjadaniem pokarmu przeznaczonego dla zwierząt rodzicielskich. Do celów niniejszej metody badawczej potrzebne jest tylko liczenie żyjącego potomstwa, lecz obecność obumarłych jaj lub martwego potomstwa również należy odnotować.

Upadkowość

Upadkowość zwierząt rodzicielskich powinna być rejestrowana najlepiej codziennie albo przynajmniej tak często, jak liczone jest potomstwo.

Inne parametry

Chociaż niniejsza metoda badawcza jest zasadniczo przeznaczona do oceny skutków dla zdolności rozrodczej, możliwe jest, że inne skutki również zostaną oznaczone ilościowo w stopniu wystarczającym do przeprowadzenia analizy statystycznej. Można odnotować zdolność rozrodczą każdego zwierzęcia rodzicielskiego, które przeżyło badanie, tj. liczbę żyjącego potomstwa spłodzonego przez to zwierzę podczas badania. Tę zdolność rozrodczą można porównać z główną zmienną zależną (zdolnością rozrodczą zwierzęcia rodzicielskiego na początku badania, które to zwierzę nie padło w przypadkowy lub niezamierzony sposób w okresie badania). W przypadku wystąpienia upadkowości wśród zwierząt rodzicielskich w kontrpróbach narażonych na działanie substancji należy ustalić, czy taka upadkowość przebiega zgodnie z zależnością stężenie-odpowiedź, np. czy odnotowuje się istotną regresję odpowiedzi w stosunku do krzywej stężenia substancji chemicznej o nachyleniu dodatnim (w tym celu można zastosować badanie statystyczne zbliżone do badania tendencji Cochran-Armitage'a). Jeżeli upadkowość nie przebiega zgodnie z zależnością stężenie-odpowiedź, kontrpróby, w których odnotowano upadkowość zwierząt rodzicielskich, powinny zostać wykluczone z analizy wyniku badania. Jeżeli upadkowość przebiega zgodnie z zależnością stężenie-odpowiedź, upadkowość zwierząt rodzicielskich powinna zostać oznaczona jako skutek narażenia na działanie badanej substancji chemicznej, a kontrpróby nie powinny zostać wykluczone z analizy wyniku badania. Wysoce pożądane są pomiary rozwoju, ponieważ dostarczają one informacji dotyczących możliwych efektów subletalnych, które mogą być użyteczne jako uzupełnienie samych pomiarów rozrodczości; zalecany jest pomiar długości zwierząt rodzicielskich (tj. długość ciała, wyłączając kolec odbytowy) na końcu badania. Inne parametry, które można zmierzyć lub obliczyć, obejmują: czas do spłodzenia pierwszego wylęgu (i kolejnych wylęgów), liczbę i wielkość wylęgów na zwierzę, liczbę wylęgów przerwanych, obecność samców wśród osobników nowo wyklutych (OECD, 2008) lub obecność efiipiów oraz ewentualnie wewnętrzny wskaźnik przyrostu populacji (zob. definicja w dodatku 1 oraz informacje na temat określania płci osobników nowo wyklutych w dodatku 7).

Częstotliwość oznaczeń i pomiarów analitycznych

Stężenie tlenu, temperatura, wartości twardości i pH powinny być mierzone co najmniej raz tygodniowo, w świeżych i starych ośrodkach, w próbach kontrolnych i w najwyższym stężeniu badanej substancji chemicznej.

W trakcie badania stężenia badanej substancji chemicznej oznacza się w regularnych odstępach czasu.

W badaniach półstatycznych w przypadku gdy oczekuje się, że stężenie badanej substancji chemicznej pozostanie w zakresie $\pm 20\%$ stężenia nominalnego (tj. w zakresie 80–120% – zob. pkt 6, 7 i 39), zaleca się przeanalizowanie co najmniej najniższego i najwyższego badanego stężenia świeżo po przygotowaniu i przy wymianie jednokrotnie podczas pierwszego tygodnia badania (tj. analizy powinny być dokonane na próbce z tego samego roztworu – świeżo przygotowanego i przy wymianie). Później te oznaczenia należy powtarzać przynajmniej w odstępach tygodniowych.

W przypadku badań, w których nie oczekuje się, że stężenie badanej substancji chemicznej pozostanie w zakresie $\pm 20\%$ stężenia nominalnego, konieczne jest analizowanie wszystkich stężeń – roztworów świeżo przygotowanych i przy wymianie. W odniesieniu do tych badań, w których zmierzone stężenie wyjściowe badanej substancji chemicznej nie mieści się w zakresie $\pm 20\%$ stężenia nominalnego, lecz można przedstawić wystarczające dowody wykazujące, że stężenia początkowe są powtarzalne i stabilne (tj. w zakresie 80–120 % stężeń początkowych), oznaczenia chemiczne można ograniczyć w 2. i 3. tygodniu badania do najwyższego i najniższego badanego stężenia. We wszystkich przypadkach oznaczenie stężeń badanej substancji chemicznej przed wymianą należy przeprowadzić tylko na jednym naczyniu z kontrpróbą dla każdego badanego stężenia.

Jeżeli stosowane jest badanie przepływowe, odpowiednim schematem pobierania próbek jest schemat podobny do opisanego w odniesieniu do badań półstatycznych (lecz pomiar „starych” roztworów nie ma zastosowania w tym przypadku). Wskazane może być jednak zwiększenie liczby pobrań próbek podczas pierwszego tygodnia (np. wykonanie trzech zestawów pomiarów) w celu zapewnienia, aby badane stężenia pozostawały stałe. W tego typu badaniu należy codziennie sprawdzać natężenie przepływu rozcieńczalnika i badanej substancji chemicznej.

Jeśli istnieją dowody na to, że stężenie badanej substancji chemicznej było zadowalająco utrzymywane w granicach $\pm 20\%$ nominalnego lub zmierzonego początkowego stężenia przez cały czas trwania badania, to wyniki mogą opierać się na wartości nominalnej lub zmierzonej wartości początkowej. Jeśli odchylenie od nominalnego lub zmierzonego początkowego stężenia jest większe niż $\pm 20\%$, wyniki należy wyrazić w średniej ważonej w czasie (zob. wytyczne dotyczące obliczeń w dodatku 6).

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

Celem niniejszego badania jest określenie wpływu badanej substancji chemicznej na zdolność rozrodczą. W odniesieniu do każdego naczynia badawczego (tj. kontrpróby) należy obliczyć całkowitą liczbę żyjącego potomstwa na zwierzę rodzicielskie. Ponadto rozrodczość można obliczyć na podstawie płodzenia żywego potomstwa przez żyjący organizm rodzicielski. Zmienną zależną najistotniejszą z ekologicznego punktu widzenia jest jednak całkowita liczba żyjącego potomstwa spłodzonego przez zwierzę rodzicielskie, które nie padło w sposób przypadkowy⁽¹⁾ lub niezamierzony⁽²⁾ w trakcie badania. Jeśli w trakcie badania zwierzę rodzicielskie padnie w sposób przypadkowy lub niezamierzony lub okaże się samcem, daną kontrpróbę wyklucza się z analizy. Analiza jest wtedy oparta na zmniejszonej liczbie kontrprób. W przypadku wystąpienia upadkowości wśród zwierząt rodzicielskich w kontrpróbach narażonych na działanie substancji należy ustalić, czy taka upadkowość przebiega zgodnie z zależnością stężenie-odpowiedź, np. czy odnotowuje się istotną regresję odpowiedzi w stosunku do krzywej stężenia substancji chemicznej o nachyleniu dodatnim (w tym celu można zastosować badanie statystyczne zbliżone do badania tendencji Cochran-Armitage'a). Jeżeli upadkowość nie przebiega zgodnie z zależnością stężenie-odpowiedź, kontrpróby, w których odnotowano upadkowość zwierząt rodzicielskich, powinny zostać wykluczone z analizy wyniku badania. Jeżeli upadkowość przebiega zgodnie z zależnością stężenie-odpowiedź, upadkowość zwierząt rodzicielskich powinna zostać oznaczona jako skutek narażenia na działanie badanej substancji chemicznej, a kontrpróby nie powinny zostać wykluczone z analizy wyniku badania.

Podsumowując, jeżeli do wyrażenia wpływu wykorzystuje się LOEC i NOEC lub EC_x , zalecane jest obliczenie wpływu na rozrodczość przy użyciu obu wyżej wspomnianych zmiennych zależnych, tj.

- całkowitej liczby żyjącego potomstwa spłodzonego przez zwierzę rodzicielskie, które nie padło w sposób przypadkowy lub niezamierzony w trakcie badania, oraz
- liczby żyjącego potomstwa spłodzonego przez zwierzę rodzicielskie, które przeżyło badanie,

a następnie wykorzystanie jako wynik końcowy najniższej wartości NOEC i LOEC lub EC_x obliczonej przy użyciu jednej z tych dwóch zmiennych zależnych.

Przed zastosowaniem analiz statystycznych, np. procedur ANOVA, porównania grup badanych z grupami kontrolnymi w ramach testu t-Studenta, testu Dunnetta, testu Williama lub regresyjnego testu Jonckheere'a-Terpstry, zalecane jest rozważenie przekształcenia danych, jeśli jest to konieczne do spełnienia wymogów określonego testu statystycznego. Jako alternatywne metody nieparametryczne można rozważyć test Dunna lub test Manna-Whitneya. Przedziały ufności wynoszące 95 % oblicza się w odniesieniu do średnich z poszczególnych grup badanych.

⁽¹⁾ Upadkowość przypadkowa: upadkowość niezwiązana z substancją chemiczną, spowodowana zdarzeniem przypadkowym (tj. znaną przyczyną).

⁽²⁾ Upadkowość niezamierzona: upadkowość niezwiązana z substancją chemiczną, spowodowana nieznaną przyczyną.

Liczba zwierząt rodzicielskich, które przeżyły badanie, w próbach kontrolnych niepoddawanych działaniu substancji stanowi kryterium ważności i powinna być udokumentowana i odnotowana. W sprawozdaniu końcowym należy również przedstawić wszelkie inne szkodliwe skutki, np. nietypowe zachowanie, oraz ustalenia istotne pod względem toksykologicznym.

ECx

Wartości ECx, w tym powiązane z nimi górne i dolne granice ufności, oblicza się przy użyciu odpowiednich metod statystycznych (np. funkcji logistycznej lub Weibulla, zmodyfikowanej metody Spearmana-Kärbera lub prostej interpolacji). Aby obliczyć EC10, EC₅₀ lub dowolną inną wartość ECx, należy zastosować analizę regresji w odniesieniu do kompletnego zbioru danych.

NOEC/LOEC

Jeżeli celem analizy statystycznej ma być ustalenie NOEC/LOEC, należy zastosować odpowiednie metody statystyczne zgodnie z wytycznymi OECD nr 54 „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application” (4). Ogólnie rzecz biorąc, niekorzystne skutki podania badanej substancji chemicznej w porównaniu z grupą kontrolną bada się, stosując test jednostronnej hipotezy na poziomie $p \leq 0,05$.

Rozkład normalny i jednorodność wariancji można zbadać za pomocą odpowiedniego testu statystycznego, np. za pomocą odpowiednio testu Shapiro-Wilka i testu Levene'a ($p \leq 0,05$). Można wykonać jednokierunkową analizę ANOVA i kolejne testy wielokrotnego porównywania. Testy wielokrotnego porównywania (np. test Dunnetta) lub testy regresyjne (np. test Williama lub regresyjny test Jonckheere'a-Terpstry) mogą być stosowane w celu obliczenia, czy istnieją znaczące różnice ($p \leq 0,05$) między próbami kontrolnymi i różnymi stężeniami badanej substancji chemicznej (wybór zalecanego testu zgodnie z wytycznymi OECD nr 54 (4)). W przeciwnym razie NOEC i LOEC można określić za pomocą metod nieparametrycznych (np. za pomocą testu Bonferroni-Wilcoxa zgodnie z testem trendu Holma lub Jonckheere'a-Terpstry).

Badanie graniczne

Jeżeli przeprowadzono badanie graniczne (porównanie próby kontrolnej z jedną tylko próbą poddaną działaniu substancji chemicznej) i spełnione są warunki wstępne dotyczące parametrycznych procedur badawczych (normalność, jednorodność), odpowiedzi metryczne można ocenić za pomocą testu t-Studenta. Jeżeli warunki te nie zostały spełnione, można zastosować test t-Studenta (np. test Welcha) dla nierównych wariancji lub test nieparametryczny, np. test Manna-Whitneya-Wilcoxa.

Aby określić znaczące różnice między próbami kontrolnymi (próbą kontrolną i próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem lub środkiem dyspergującym), można wykonać badanie kontrprób każdej próby kontrolnej zgodnie z opisem dotyczącym badania granicznego. Jeżeli w wyniku tych badań nie zostaną wykryte znaczące różnice, wszystkie próby kontrolne i kontrpróby kontrolne z rozpuszczalnikiem mogą być połączone. W przeciwnym wypadku wszystkie próby poddawane działaniu substancji chemicznej należy porównać z próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem.

Sprawozdanie z badania

Sprawozdanie z badania zawiera następujące informacje.

Badana substancja chemiczna:

- stan skupienia i istotne właściwości fizykochemiczne;
- dane identyfikacyjne substancji chemicznej, w tym czystość.

Gatunek doświadczalny:

- klon (czy był typowany genetycznie), dostawca lub źródło (jeśli jest znane) i stosowane warunki hodowli. Jeśli użyto innego gatunku niż *Daphnia magna*, powinno to być odnotowane i uzasadnione.

Warunki badania:

- stosowana procedura badawcza (np. półstatyczna lub przepływowa, objętość, obciążenie pod względem ilości *Daphnia* na litr);

- fotoperiod i światłość;
- projekt badania (np. liczba kontrprób, liczba zwierząt rodzicielskich na kontrpróbę);
- szczegółowe informacje na temat zastosowanego podłoża;
- jeśli stosowano, dodatki materiałów organicznych, w tym ich skład, źródło, metoda przygotowania, TOC/COD preparatów podstawowych, oszacowanie wynikłego TOC/COD w ośrodku użytym w badaniu;
- szczegółowe informacje o karmieniu, w tym o ilości pokarmu (w mg C na *Daphnia* dziennie) i harmonogramie karmienia (np. typ pokarmu, w tym w odniesieniu do glonów właściwa nazwa (gatunek) i szczep, jeśli jest znany, oraz warunki hodowli);
- metoda przygotowania roztworów podstawowych i częstotliwość ich wymiany (jeżeli użyto rozpuszczalnika lub środka dyspergującego, należy to odnotować i podać jego stężenie).

Wyniki:

- wyniki ze wszystkich wstępnych badań stabilności badanej substancji chemicznej;
- nominalne badane stężenia i wyniki wszystkich analiz ustalających stężenie badanej substancji chemicznej w naczyniach badawczych (zob. przykładowe arkusze danych w dodatku 5); należy również podać sprawność odzyskową metody i granicę oznaczalności;
- jakość wody w naczyniach badawczych (tj. pH, temperatura, stężenie rozpuszczonego tlenu, TOC lub COD oraz twardość w stosownym przypadku) (zob. przykładowy arkusz danych w dodatku 4);
- pełny zapis płodzenia żyjącego potomstwa przez każde zwierzę rodzicielskie podczas badania (zob. przykładowy arkusz danych w dodatku 4);
- liczba padłych zwierząt rodzicielskich wraz z datą zgonu (zob. przykładowy arkusz danych w dodatku 4);
- współczynnik zmienności dla zdolności rozrodczej w grupie kontrolnej (oparty na całkowitej liczbie żyjącego potomstwa na zwierzę rodzicielskie żyjące na koniec badania);
- wykres całkowitej liczby żyjącego potomstwa spłodzonego przez zwierzę rodzicielskie w każdej kontrpróbce, z wyłączeniem wszelkich zwierząt rodzicielskich, które padły w sposób przypadkowy lub niezamierzony w trakcie badania, w stosunku do stężenia badanej substancji chemicznej;
- w stosownych przypadkach wykres całkowitej liczby żyjącego potomstwa spłodzonego przez zwierzę rodzicielskie, które przeżyło badanie, w każdej kontrpróbce w stosunku do stężenia badanej substancji chemicznej;
- w stosownych przypadkach najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC), w odniesieniu do rozrodczości, w tym opis zastosowanych procedur statystycznych i wskazanie spodziewanych rozmiarów wykrywanych skutków (w celu uzyskania tego wskaźnika można przed rozpoczęciem doświadczenia przeprowadzić analizę mocy wpływu), oraz najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC), w odniesieniu do rozrodczości; informacje o zmiennej zależnej, którą wykorzystano do obliczenia wartości LOEC i NOEC (całkowita liczba żyjącego potomstwa na organizm rodzicielski, który nie padł w sposób przypadkowy lub niezamierzony w trakcie badania, lub całkowita liczba żyjącego potomstwa na organizm rodzicielski, który przeżył badanie); w stosownych przypadkach należy także przedstawić LOEC/NOEC w odniesieniu do upadkowości zwierząt rodzicielskich;
- w stosownych przypadkach EC_x w odniesieniu do rozrodczości oraz przedziały ufności (np. 90 % lub 95 %) i wykres dopasowanego modelu wykorzystanego do obliczeń, nachylenie krzywej stężenie-efekt i jego błąd standardowy;
- inne obserwowane skutki biologiczne lub pomiary: przedstawienie wszystkich innych skutków biologicznych zaobserwowanych lub pomierzonych (np. wzrost zwierząt rodzicielskich) wraz z właściwym uzasadnieniem;
- wytłumaczenie wszelkich odchyłeń od metody badawczej.

BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, Zjednoczone Królestwo, 20–21 marca 1993 r.
- (2) OECD (1997). Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 6. OECD, Paryż.
- (3) OECD (2008). Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 88. OECD, Paryż.
- (4) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria dotycząca badań i oceny nr 54. OECD, Paryż.
- (5) Baird, D.J., *et al.* (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. *Ecotox. and Environ. Safety*, 21, s. 257–265.
- (6) Elendt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, s. 25–33.
- (7) EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Wydanie piąte. EPA/821/R-02/012. Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych, Urząd ds. Wody, Waszyngton, D.C. www.epa.gov/waterscience/methods
- (8) Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47, s. 775–782.
- (9) ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. W: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, t. 11.04; ASTM E729 – 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA
- (10) Baird, D.J., *et al.* (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. W: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Kopenhaga 1988. (H. Løkke, H. Tyle i F. Bro-Rasmussen. red.) s. 144–148.
- (11) Parkhurst, B.R., J.L. Forte, oraz G.P. Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.*, 26: s. 1–8.
- (12) Cowgill, U.M. i Milazzo, D.P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. *Arch. Hydrobiol.*, 120(2): s. 185–196.
- (13) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 23. OECD, Paryż.
- (14) Sims, I.R., S. Watson. i D. Holmes (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 12, s. 2053–2058.
- (15) Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. *Arch. Hydrobiol.*, 128, s. 459–466.

Dodatek 1

DEFINICJE

Dla celów niniejszej metody badawczej stosowane są następujące definicje:

Upadkowość przypadkowa: upadkowość niezwiązana z substancją chemiczną, spowodowana zdarzeniem przypadkowym (tj. znaną przyczyną).

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

ECx: stężenie badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w wodzie powodujące spadek rozrodczości *Daphnia* o x % w określonym okresie narażenia.

Upadkowość niezamierzona: upadkowość niezwiązana z substancją chemiczną, spowodowana nieznaną przyczyną.

Wewnętrzny wskaźnik przyrostu populacji: miara przyrostu populacji, która łączy zdolność rozrodczą i upadkowość swoistą dla wieku (1) (2) (3). W populacji w stanie równowagi będzie równy zero. W przypadku rosnących populacji wskaźnik ten będzie dodatni, a dla malejących populacji – ujemny. Jest oczywiste, że ten drugi wskaźnik jest niezrównoważony i ostatecznie doprowadzi do wymarcia danej populacji.

Granica wykrywalności: najniższe stężenie, które może być wykryte, ale nie może być ilościowo oznaczone.

Granica oznaczalności: najniższe stężenie, które można zmierzyć ilościowo.

Najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC): najniższe badane stężenie substancji chemicznej, przy którym obserwuje się statystycznie istotny wpływ tej substancji na rozrodczość i upadkowość zwierząt rodzicielskich (przy $p < 0,05$) w porównaniu z próbą kontrolną w określonym okresie narażenia. Jednakże wszystkie badane stężenia powyżej LOEC powinny wywierać szkodliwy skutek równy skutkom lub większy niż skutki obserwowane przy LOEC. W przypadku gdy oba warunki nie mogą być spełnione, należy szczegółowo wyjaśnić, w jaki sposób wybrano LOEC (a następnie NOEC).

Upadkowość: zwierzę jest rejestrowane jako martwe, gdy jest nieruchome, tj. gdy nie jest w stanie pływać lub nie jest obserwowany ruch przydatków lub odwłoka, w ciągu 15 sekund po łagodnym poruszeniu pojemnika badawczego. (Jeśli stosowana jest inna definicja, należy to zgłosić, podając jednocześnie odniesienie do niej).

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

Potomstwo: młode *Daphnia* spłodzone przez zwierzęta rodzicielskie w trakcie badania.

Zwierzęta rodzicielskie: samice *Daphnia* obecne na początku badania, których zdolność rozrodcza jest przedmiotem badania.

Zdolność rozrodcza: liczby żyjącego potomstwa spłodzonego przez zwierzęta rodzicielskie w okresie badania.

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

Bibliografia

- 1) Wilson, E.O. i Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.
- 2) Poole, R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, Nowy Jork, s. 532.
- 3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. i Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, s. 1156–1166.

Dodatek 2

PRZYGOTOWANIE W PEŁNI ZDEFINIOWANYCH OŚRODKÓW ELENDA M7 I M4

Aklimatyzacja do ośrodków Elendta M7 i M4

Niektóre laboratoria doświadczyły trudności w bezpośrednim przeniesieniu *Daphnia* do ośrodków M4 (1) i M7. Osiągnięto jednak pewne pomyślne wyniki, stosując aklimatyzację stopniową, tj. przenosząc rozwielitki z własnego ośrodka do 30-procentowego roztworu Elendta, następnie do 60-procentowego roztworu Elendta, a później do 100-procentowego roztworu Elendta. Konieczne może być stosowanie okresu aklimatyzacji trwającego nawet miesiąc.

Przygotowanie

Pierwiastki śladowe

Najpierw przygotowuje się osobne roztwory podstawowe (I) poszczególnych pierwiastków śladowych w wodzie o odpowiedniej czystości, np. dejonizowanej, destylowanej lub poddanej odwróconej osmozie. Z tych roztworów podstawowych (I) przygotowany jest drugi pojedynczy roztwór podstawowy (II), który zawiera wszystkie elementy śladowe (roztwór łączony), tj.:

Roztwory podstawowe (I) (pojedyncza substancja)	Ilość dodana do wody	Stężenie (odnoszące się do ośrodka M4)	W celu przygotowania łączonego roztworu podstawowego II dodać następujące ilości roztworu podstawowego I do wody	
			ml/l	
	mg/l		M 4	M 7
H ₃ BO ₃	57 190	20 000-krotne	1,0	0,25
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	7 210	20 000-krotne	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-krotne	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000-krotne	1,0	0,25
SrCl ₂ · 6 H ₂ O	3 040	20 000-krotne	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-krotne	1,0	0,25
Mo Na ₂ O ₄ · 2 H ₂ O	1 260	20 000-krotne	1,0	0,25
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	335	20 000-krotne	1,0	0,25
ZnCl ₂	260	20 000-krotne	1,0	1,0
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	200	20 000-krotne	1,0	1,0
KI	65	20 000-krotne	1,0	1,0
Na ₂ SeO ₃	43,8	20 000-krotne	1,0	1,0
NH ₄ VO ₃	11,5	20 000-krotne	1,0	1,0
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	5 000	2 000-krotne	—	—
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	1 991	2 000-krotne	—	—

Zarówno roztwór Na₂EDTA, jak i roztwór FeSO₄ są przygotowywane oddzielnie, zlewane razem i niezwłocznie umieszczane w autoklawie. Daje to:

roztwór Fe-EDTA		1 000-krotne	20,0	5,0
-----------------	--	--------------	------	-----

Ośrodki M4 i M7

Ośrodki M4 i M7 są przygotowane przy użyciu roztworu podstawowego II, makroskładników odżywczych i witamin w następujący sposób:

	Ilość dodana do wody	Stężenie (odnoszące się do ośrodka M4)	Ilość roztworu podstawowego dodanego w celu przygotowania ośrodka	
			ml/l	
	mg/l		M 4	M 7
Roztwór podstawowy II (połączone pierwiastki śladowe)		20-krotne	50	50
Roztwory podstawowe makroskładników odżywczych (pojedyncze substancje)				
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	293 800	1 000-krotne	1,0	1,0
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	246 600	2 000-krotne	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-krotne	0,1	0,1
NaHCO ₃	64 800	1 000-krotne	1,0	1,0
Na ₂ SiO ₃ · 9 H ₂ O	50 000	5 000-krotne	0,2	0,2
NaNO ₃	2 740	10 000-krotne	0,1	0,1
KH ₂ PO ₄	1 430	10 000-krotne	0,1	0,1
K ₂ HPO ₄	1 840	10 000-krotne	0,1	0,1
Łączony roztwór podstawowy witamin	—	10 000-krotne	0,1	0,1

Łączony roztwór podstawowy witamin przygotowuje się przez dodanie 3 witamin do 1 litra wody, jak przedstawiono poniżej:

	mg/l			
Chlorowodorek tiaminy	750	10 000-krotne		
Cyjanokobalamina (B12)	10	10 000-krotne		
Biotyna	7,5	10 000-krotne		

Łączony roztwór podstawowy witamin przechowuje się zamrożony w małych podwielokrotnościach. Witaminy są dodawane do ośrodka na krótko przed użyciem.

Uwaga: Aby uniknąć wytrącania się soli przy przygotowaniu kompletnego ośrodka, należy dodać podwielokrotności roztworów podstawowych do około 500–800 ml dejonizowanej wody, a następnie dopełnić do 1 litra.

Uwaga: Pierwszą publikację o ośrodku M4 można znaleźć w: Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, s. 25–33.

Dodatek 3

ANALIZA CAŁKOWITEGO WĘGLA ORGANICZNEGO (TOC) I WYKONANIE NOMOGRAMU ZAWARTOŚCI TOC W POKARMIE GLONOWYM

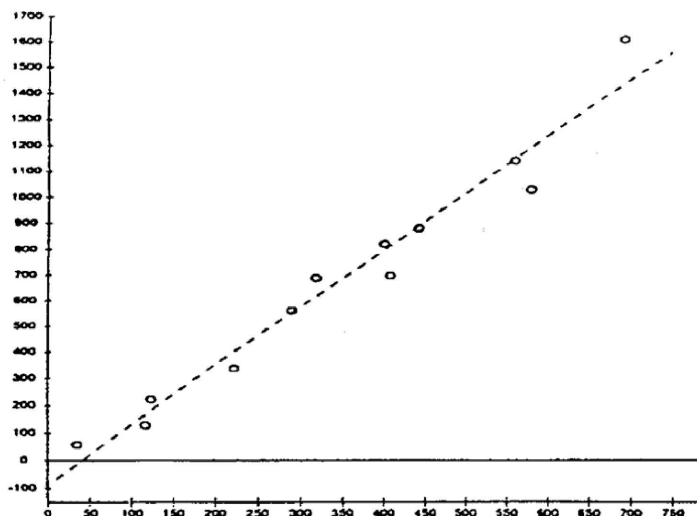
Należy uwzględnić, że zawartość węgla w pokarmie glonowym zwykle nie będzie mierzona bezpośrednio, ale z korelacji (tj. nomogramów) z pomiarami zastępczymi, takimi jak liczba komórek glonów lub absorpcja światła.

TOC powinien być mierzony raczej wysokotemperaturowym utlenieniem niż ultrafioletem lub metodą nadsiarczanową (zob. wskazówki w: *The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands* 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, Londyn WC1V 6HB).

Na potrzeby wykonania nomogramu glony należy oddzielić od pożywki przez wirowanie, a następnie ponowne zawieszenie w wodzie destylowanej. Należy trzykrotnie zmierzyć parametr zastępczy i stężenie TOC w każdej próbce. Ślepe próby z wodą destylowaną należy przeanalizować i odjąć stężenie TOC od stężenia TOC w próbce glonów.

Nomogramy powinny być liniowe ponad wymagany zakres stężenia węgla. Przykłady przedstawiono poniżej.

Uwaga: tych nomogramów nie należy używać do przeliczania; istotne jest, aby laboratoria przygotowały swoje własne nomogramy.



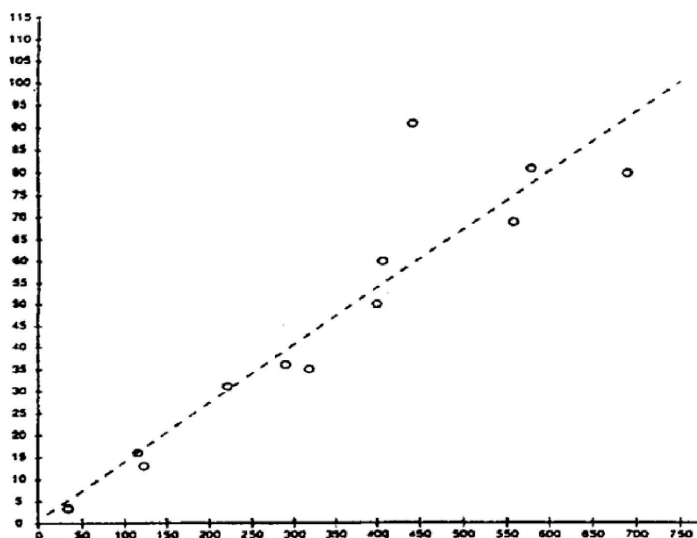
Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regresja w mg/l suchej masy na mg C/l. Dane ze stężonych zawiesin półciąglej partii wsadowej komórek hodowli, ponownie zawieszonych w wodzie destylowanej.

oś x: mg C/l stężonego pokarmu glonowego

oś y: sucha masa stężonego pokarmu glonowego w mg/l

Współczynnik korekty -0,980



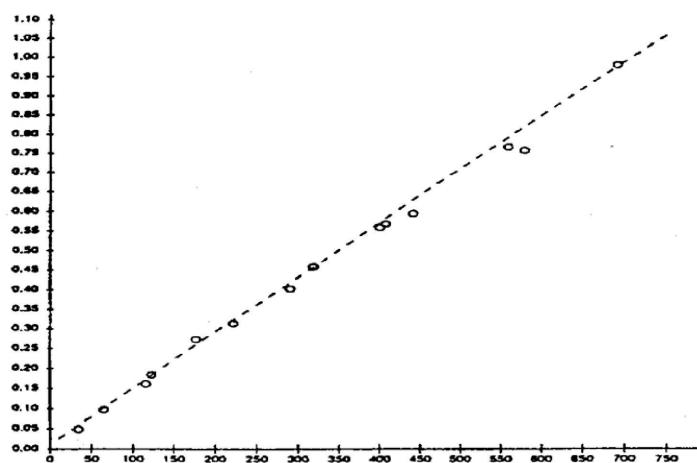
Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regresja liczby komórek na mg C/l. Dane ze stężonych zawiesin półciąglej partii wsadowej komórek hodowli, ponownie zawieszonych w wodzie destylowanej.

oś x: mg C/l stężonego pokarmu glonowego

oś y: Liczba komórek/l stężonego pokarmu glonowego

Współczynnik korekty – 0,926



Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regresja absorbancji na mg C/l (1 cm długości ścieżki). Dane ze stężonych zawiesin półciąglej partii wsadowej komórek hodowli, ponownie zawieszonych w wodzie destylowanej.

oś x: mg C/l stężonego pokarmu glonowego

oś y: Absorbancja przy 440 nm 1/10 rozcieńczenia stężonego pokarmu glonowego

Współczynnik korekty – 0,998

Dodatek 4

PRZYKŁADOWY ARKUSZ DANYCH NA POTRZEBY REJESTROWANIA WYMIANY OŚRODKA, DANYCH Z MONITOROWANIA STANU FIZYKOCHEMICZNEGO, KARMIENIA, ROZRODCZOŚCI DAPHNIA I UPADKOWOŚCI ZWIERZĄT RODZICIELSKICH

Doświadczenie nr:	Data rozpoczęcia:					Klon:				Ośrodek:				Typ pokarmu:				Badana substancja chemiczna:				Stężenie nominalne:			
	Dzień	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Wymiana ośrodka (zaznaczyć)																									
pH (*)																									nowe
																									stare
O ₂ (mg/l) (*)																									nowe
																									stare
Temperatura (° C) (*)																									nowe
																									stare
Dostarczony pokarm (zaznaczyć)																									
Liczba żywego potomstwa (**)																									Ogółem
Naczynie 1																									
2																									
3																									
4																									
5																									
6																									
7																									
8																									
9																									
10																									
																									Ogółem
Zbiorcza upadkowość zwierząt rodzicielskich (***)																									

(*) Należy wskazać, który pojemnik był użyty w doświadczeniu.
 (**) Należy odnotować przerwane wylęgi jako „AB” w stosownym okienku.
 (***) Należy odnotować upadkowość zwierząt rodzicielskich jako „M” w stosownym okienku.

Dodatek 6

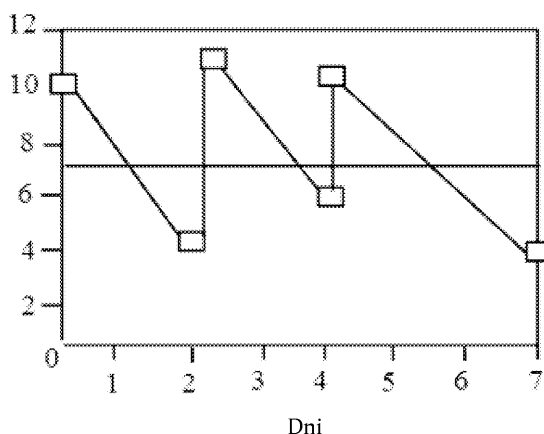
OBLICZANIE ŚREDNIEJ WAŻONEJ W CZASIE

Średnia ważona w czasie

Biorąc pod uwagę fakt, że stężenie badanej substancji chemicznej może z czasem maleć między poszczególnymi wymianami ośrodka, konieczne jest rozważenie, które stężenie należy wybrać jako reprezentatywne dla zakresu stężeń doświadczanych przez osobniki rodzicielskie *Daphnia*. Wybór powinien być oparty na zarówno względach biologicznych, jak i statystycznych. Na przykład, jeśli sądzi się, że największy wpływ na rozrodczość ma szczytowe stężenie doświadczane, należy zastosować maksymalne stężenie. Jeżeli jednak za ważniejszy uważa się skumulowany lub długotrwały wpływ toksycznej substancji chemicznej, bardziej właściwe jest średnie stężenie. W takim przypadku odpowiednim średnim stężeniem, które należy zastosować, jest średnie stężenie ważne w czasie, ponieważ uwzględnia zróżnicowanie chwilowego stężenia z czasem.

Wykres 1

Przykład średniej ważonej w czasie



Na wykresie 1 przedstawiono przykład (uproszczonego) badania trwającego siedem dni z wymianą ośrodka w dniach 0, 2 i 4.

- Cienka zygzakowata linia przedstawia stężenie w każdym punkcie czasu. Zakłada się, że spadek stężenia przebiega zgodnie z procesem rozpadu wykładniczego.
- Sześć wykreślonych punktów przedstawia zaobserwowane stężenia zmierzone na początku i na końcu każdego okresu wymiany.
- Gruba linia ciągła pokazuje położenie średniej ważonej czasem.

Średnia ważona w czasie jest obliczana tak, aby pole pod średnią ważoną w czasie było równe polu pod krzywą stężenia. Obliczenia w odniesieniu do powyższego przykładu przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Obliczanie średniej ważonej w czasie

Wymiana Liczba	Dni	Conc 0	Conc 1	Ln(Conc 0)	Ln(Conc 1)	Pole
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544

Wymiana Liczba	Dni	Conc 0	Conc 1	Ln(Conc 0)	Ln(Conc 1)	Pole
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Suma dni:	7				Całkowite pole:	50,092
					Średnia ważona w czasie:	7,156

Dni to liczba dni w okresie wymiany.

Conc 0 jest zmierzonym stężeniem na początku każdego okresu wymiany.

Conc 1 jest zmierzonym stężeniem na końcu każdego okresu wymiany.

$\ln(\text{Conc } 0)$ jest naturalnym logarytmem *Conc 0*.

$\ln(\text{Conc } 1)$ jest naturalnym logarytmem *Conc 1*.

Pole jest polem pod krzywą wykładniczą dla każdego okresu wymiany. Średnią ważoną w czasie oblicza się w następujący sposób:

$$\text{Area} = \frac{\text{Conc } 0 - \text{Conc } 1}{\ln(\text{Conc } 0) - \ln(\text{Conc } 1)} \times \text{Day}$$

Średnia ważona w czasie jest całkowitym polem podzielonym przez sumę dni.

Oczywiście w odniesieniu do badania rozrodczości *Daphnia* tabelę należy rozszerzyć, aby obejmowała 21 dni.

Oczywiste jest, że gdy przeprowadza się obserwacje tylko na początku i na końcu każdego okresu wymiany, nie jest możliwe potwierdzenie, że proces rozpadu rzeczywiście przebiega wykładniczo. Odmienna krzywa dawałaby odmienne wyliczenie pola. Proces rozpadu wykładniczego nie jest jednak nieprawdopodobny; jest prawdopodobnie najlepszą krzywą do zastosowania w przypadku braku innych informacji.

Należy jednak zachować ostrożność, jeśli analiza chemiczna na koniec okresu wymiany nie wykryje żadnej substancji chemicznej. Jeżeli nie jest możliwe oszacowanie, jak szybko substancja chemiczna zniknęła z roztworu, niemożliwe jest uzyskanie realistycznego pola pod krzywą, a zatem niemożliwe jest uzyskanie wiarygodnej średniej ważonej w czasie.

Dodatek 7

WYTYCZNE DOTYCZĄCE OKREŚLANIA PŁCI NOWO WYKLUTYCH OSOBNIKÓW

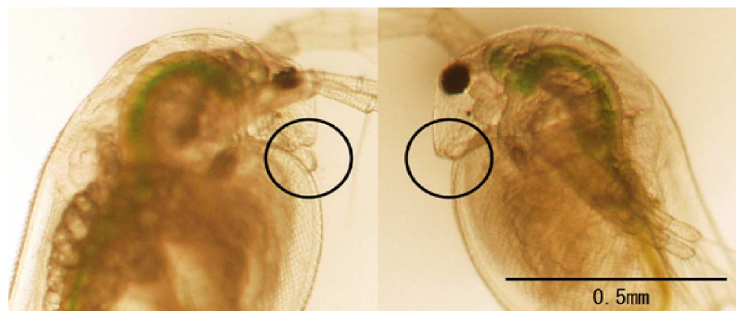
Do rodzenia się samców wśród osobników nowo wyklutych może dochodzić w zmieniających się warunkach otoczenia, takich jak skrócenie fotoperiodu, zmiana temperatury, malejące stężenie pokarmu i rosnąca gęstość populacji (Hobaek i Larson, 1990; Kleiven *et al.*, 1992). Rodzenie się samców jest także znaną reakcją na pewne regulatory wzrostu owadów (Oda *et al.*, 2005). W warunkach, w których drażniące substancje chemiczne wywołują spadek liczby zdolnego do rozmnażania się potomstwa samic rozmnażających się partenogenetycznie, można spodziewać się wzrostu liczby samców (OECD, 2008). Na podstawie dostępnych informacji nie jest możliwe przewidzenie, które z proporcji płci lub punktów końcowych rozrodczości będą bardziej czułe; istnieją jednak przesłanki (referencyjne „sprawozdanie z weryfikacji”, część 1), że wzrost liczby samców może być mniej czułym wskaźnikiem niż spadek liczby potomstwa. Ponieważ głównym celem metody badawczej jest oszacowanie liczby spłodzonego potomstwa, obserwacja pojawiania się samców jest nieobowiązkowa. Jeżeli ten fakultatywny punkt końcowy jest oceniany w ramach badania, należy zastosować dodatkowe kryterium ważności badania, zgodnie z którym w grupach kontrolnych powinno występować nie więcej niż 5 % samców.

Najpraktyczniejszym i najłatwiejszym sposobem rozróżniania płci rozwielitek jest wykorzystanie ich cech fenotypowych, ponieważ samce i samice są genetycznie identyczne, a ich płeć jest determinowana czynnikami środowiskowymi. Samce i samice różnią się długością ciała oraz morfologią pierwszej pary czułków, które u samców są dłuższe niż u samic (rys. 1). Różnicę tę można zaobserwować od razu po wykluciu, chociaż w miarę dojrzewania pojawiają się inne drugorzędowe cechy płciowe (np. zob. rys. 2 w: Olmstead i LeBlanc, 2000).

Aby przeprowadzić obserwację płci morfologicznej, należy nowo wyklute osobniki spłodzone przez każde zwierzę doświadczalne przenieść pipetą na szalkę Petriego z ośrodkiem użytym do badania. Ilość ośrodka powinna być minimalna, co ma na celu ograniczenie ruchu zwierząt. Obserwację pierwszej pary czułków można przeprowadzić pod mikroskopem stereoskopowym ($\times 10$ –60).

Rys. 1

24-godzinne samiec (po lewej) i samica (po prawej) *D. magna*. Samców można odróżnić od samic na podstawie długości ciała oraz morfologii pierwszej pary czułków, zaznaczonej okręgami (Tatarazako *et al.*, 2004).



BIBLIOGRAFIA

Hobaek A i Larson P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology 71: 2255–2268.

Kleiven O.T., Larsson P., Hobaek A. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. Oikos 65, s. 197–206.

Oda S., Tatarazako N, Watanabe H., Morita M., i Iguchi T. 2005. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. Chemosphere 61:1168–1174.

OECD, 2008. Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Seria OECD dotycząca badań i oceny nr 88. Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju, Paryż.

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19:2107–2113.

Tatarazako, N., Oda, S., Abe, R., Morita M. i Iguchi T., 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). *Environmental Science* 17, s. 439–449.”

18) w części C rozdział C.29 pkt 66 otrzymuje brzmienie:

„66. Badanie uznaje się za ważne, jeśli:

- a) średni procentowy rozkład w naczyniach F_c zawierających substancję chemiczną odniesienia wynosi > 60 % do 14. dnia inkubacji; oraz
- b) średnia ilość TIC obecnego w ślepych próbach kontrolnych F_b na koniec badania wynosi > 3 mg C/l.

Jeśli te pułapy nie zostały osiągnięte, badanie należy powtórzyć z wykorzystaniem inokulum z innego źródła lub należy dokonać przeglądu procedur. Na przykład jeśli problem stanowi wysoka wartość IC wytworzonego w próbie ślepej, należy zastosować procedurę opisaną w pkt 27–32.”

19) w części C dodaje się rozdział w brzmieniu:

„C.47 Badanie toksycznego wpływu substancji na ryby we wczesnych stadiach rozwoju

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 210 (2013). Celem badań prowadzonych na rybach we wczesnych stadiach rozwoju jest określenie letalnego i subletalnego wpływu substancji chemicznych na badanych stadiach rozwoju i na badane gatunki. Badania pozwalają na uzyskanie informacji istotnych do celów oszacowania długoterminowego letalnego i subletalnego wpływu substancji chemicznej na inne gatunki ryb.
2. Dotycząca badań wytyczna nr 210 opiera się na wniosku Zjednoczonego Królestwa, który omówiono na posiedzeniu ekspertów OECD zorganizowanym w Medmenham (Zjednoczone Królestwo) w listopadzie 1988 r. i uaktualniono w 2013 r. celem odzwierciedlenia doświadczenia zdobytego podczas wykonywania tego badania i zaleceń z warsztatów OECD dotyczących badania toksyczności na rybach, które to warsztaty odbyły się we wrześniu 2010 r. (1).

ZASADA BADANIA

3. Ryby we wczesnych stadiach rozwoju poddaje się narażeniu na działanie zakresu stężeń badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w wodzie. Preferowane są warunki przepływowe; jeżeli jednak ich zapewnienie jest niemożliwe, dopuszczalne jest zastosowanie warunków półstatycznych. W celu uzyskania szczegółowych informacji należy zapoznać się z wytyczną OECD „Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures” (2). Badanie rozpoczyna się od umieszczenia zapłodnionych jaj w komorach badawczych i kontynuuje się je przez okres specyficzny dla danego gatunku potrzebny do osiągnięcia stadium młodocianego przez ryby kontrolne. Dokonuje się oceny letalnego i subletalnego wpływu i porównuje się go z wartościami kontrolnymi w celu określenia najniższego stężenia, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC), aby ustalić (i) najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC), lub (ii) EC_x (np. EC₁₀, EC₂₀), stosując model regresji do oszacowania stężenia, które spowoduje zmianę mierzonego wpływu o x %. Zgłoszenie odpowiednich stężeń efektywnych i parametrów może zależeć od ram regulacyjnych. Badane stężenia powinny zawierać w swoim zakresie EC_x, tak aby EC_x wynikało raczej z interpolacji niż ekstrapolacji (definicje znajdują się w dodatku 1).

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

4. Badana substancja chemiczna oznacza substancję będącą przedmiotem badania. Rozpuszczalność w wodzie (zob. rozdział A.6 niniejszego załącznika) i prężność par (zob. rozdział A.4 niniejszego załącznika) badanej substancji chemicznej powinna być znana, przy czym należy przyjąć wiarygodną metodę analityczną wykorzystywaną do oznaczania ilościowego zawartości substancji chemicznej w roztworach do badań o znanej i udokumentowanej dokładności i granicy oznaczalności. Chociaż wyniki badania ostrej toksyczności (zob. rozdziały C.1 lub C.49 niniejszego załącznika) nie są niezbędne do przeprowadzenia przedmiotowego badania, mogą one dostarczyć użytecznych informacji, zwłaszcza gdy zostały przeprowadzone na gatunku wybranym do tego badania.

5. Jeżeli daną metodę badawczą stosuje się do badania mieszaniny, należy w miarę możliwości jak najdokładniej scharakteryzować skład tej mieszaniny, np. podając nazwę chemiczną jej składników, ich ilości oraz właściwości specyficzne dla poszczególnych substancji (podobnie jak właściwości wspomniane powyżej). Przed zastosowaniem metody badawczej w badaniu regulacyjnym mieszaniny należy zastanowić się nad tym, czy wyniki uzyskane w wyniku jej stosowania będą możliwe do zaakceptowania w odniesieniu do założonego celu regulacyjnego.
6. Użyteczne informacje obejmują wzór strukturalny, czystość substancji, rozpuszczalność w wodzie, stabilność w wodzie i przy narażeniu na działanie światła, pK_a , P_{ow} , a także wyniki badania szybkiej biodegradowalności (np. rozdział C.4 lub C.29 niniejszego załącznika).

WAŻNOŚĆ BADANIA

7. Aby badanie było ważne, spełnione muszą być następujące warunki:
 - stężenie rozpuszczonego tlenu powinno wynosić > 60 % wartości nasycenia powietrzem przez cały czas trwania badania;
 - różnica temperatury wody między komorami badawczymi lub kolejnymi dniami w dowolnym momencie w czasie trwania badania nie powinna przekraczać $\pm 1,5$ °C, a jej wartość należy utrzymywać w zakresie temperatur określonym dla danego gatunku doświadczalnego (dodatek 2);
 - pomiar analityczny badanych stężeń jest obowiązkowy;
 - ogólny wskaźnik przeżywalności zapłodnionych jaj i wskaźnik przeżywalności po wylęgu w próbach kontrolnych i, w stosownych przypadkach, w kontrolach z rozpuszczalnikiem powinien być większy niż wartości graniczne określone w dodatku 2 lub im równy.
8. Jeżeli zaobserwowane zostanie niewielkie odchylenie od kryteriów ważności, należy rozważyć konsekwencje dla wiarygodności danych z badania i należy uwzględnić takie rozważania w sprawozdaniu. Należy zgłosić i omówić wpływ na przeżywalność, wylęg lub wzrost w kontroli z rozpuszczalnikiem w porównaniu z kontrolną ujemną w kontekście wiarygodności danych z badania.

OPIS METODY

Komory badawcze

9. W badaniu można użyć dowolnych naczyń wykonanych ze szkła, stali nierdzewnej lub z innych chemicznie obojętnych materiałów. Ponieważ wiadomo, że silikon wykazuje wysoką zdolność do absorbowania substancji lipofilowych, należy zminimalizować wykorzystanie rur silikonowych w badaniach przepływowych i wykorzystanie uszczelek silikonowych mających kontakt z wodą i zastąpić je np. akwariami wykonanymi z jednego bloku szkła. Naczynia powinny być dostatecznie duże, aby umożliwić odpowiedni wzrost w próbie kontrolnej, utrzymanie stężenia rozpuszczonego tlenu (np. w przypadku małych gatunków ryb wystarczające będzie akwarium o objętości 7 l) oraz spełnienie kryteriów dotyczących wskaźnika obciążenia określonych w pkt 19. Zaleca się losowe rozmieszczenie komór badawczych w obszarze badania. Układ bloków losowanych, w ramach którego w każdym bloku następuje każde podanie substancji chemicznej, jest korzystniejszy niż układ całkowicie zrandomizowany. Komory badawcze powinny być zabezpieczone przed niepożądanymi zakłóceniami. Przed wprowadzeniem organizmów doświadczalnych zaleca się kondycjonowanie układu badawczego ze stężeniami badanej substancji chemicznej przez okres konieczny do wykazania stabilnych stężeń ekspozycyjnych.

Wybór gatunku

10. Zalecane gatunki ryb wymieniono w tabeli 1. Nie wyklucza to możliwości stosowania innych gatunków, lecz może się to wiązać z koniecznością dostosowania procedury badawczej w celu zapewnienia odpowiednich warunków badania. W takim przypadku należy podać uzasadnienie wyboru gatunku i metody doświadczalnej.

Utrzymywanie tarlaków

11. Szczegółowe informacje dotyczące utrzymywania tarlaków w zadowalających warunkach można znaleźć w dodatku 3 i w pozycjach (3)(4)(5) bibliografii.

Postępowanie z zapłodnionymi jajami, embrionami i larwami

12. Początkowo zapłodnione jaja, embriony i larwy można poddawać narażeniu w obrębie naczynia głównego w mniejszych naczyniach wykonanych ze szkła lub stali nierdzewnej, których ściany lub podstawy są wykonane z siatki w celu umożliwienia przepływu roztworu do badań przez naczynie. Nieburzliwy przepływ w tych małych naczyniach można wywołać przez zawieszenie ich na wysięgniku przemieszczającym naczynie w górę i w dół, przy czym organizmy powinny być zawsze zanurzone. Zapłodnione jaja ryb łososiowatych można umieścić na statywach lub siatkach, których szczeliny są wystarczająco duże, aby larwy mogły przez nie spadać po wylęgu.
13. Jeżeli w głównym naczyniu badawczym wykorzystywano pojemniki, kratki lub siatki na jaja do umocowania jaj, elementy te należy usunąć po wylęgu larw, zgodnie z wytycznymi w dodatku 3; należy jednak zachować siatki, aby uniemożliwić larwom ucieczkę. Jeśli zachodzi konieczność przeniesienia larw, nie można ich narażać na działanie powietrza i nie wolno używać siatek do wypuszczania larw z pojemników na jaja. Moment takiego przeniesienia jest różny w zależności od gatunku; przy czym fakt ten należy udokumentować w sprawozdaniu. Przeniesienie nie zawsze jest jednak konieczne.

Woda

14. Każda woda, w której gatunki doświadczalne wykazują odpowiednie długoterminowe przeżycie i wzrost, może być stosowana jako woda użyta do badania (dodatek 4). Powinna mieć ona stałą jakość w okresie trwania badania. Aby mieć pewność, że woda rozcieńczająca nie będzie wpływała zbyt mocno na wyniki badania (np. na skutek kompleksowania badanej substancji chemicznej) lub nie będzie wywierała szkodliwego wpływu na parametry tarlaków, należy co pewien czas pobierać próbki do analizy. Jeżeli wiadomo, że woda rozcieńczająca ma względnie stałą jakość, należy np. co dwa miesiące dokonywać pomiaru zawartości metali ciężkich (np. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd i Ni), głównych anionów i kationów (np. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- i SO_4^{2-}), amoniaku, całkowitego chloru resztkowego, pestycydów, całkowitego węgla organicznego i zawiesiny. Jeżeli wiadomo, że jakość wody jest zmienna, pomiary należy przeprowadzać częściej; częstotliwość przeprowadzania pomiarów zależy od tego, jak bardzo zmienna jest jakość wody. Niektóre właściwości chemiczne dopuszczalnej wody rozcieńczającej wymieniono w dodatku 4.

Roztwory do badań

15. W przypadku badań przepływowych wymagany jest system, który nieprzerwanie dozuje i rozcieńcza roztwór podstawowy badanej substancji chemicznej (np. pompa dozująca, rozcieńczalnik proporcjonalny, sytnik) w celu doprowadzenia serii stężeń do komór badawczych. W trakcie badania należy okresowo sprawdzać natężenia przepływu roztworów podstawowych i wody rozcieńczającej, które przez cały czas trwania badania nie powinny różnić się o więcej niż 10 %. Za odpowiednie uznano natężenie przepływu równe co najmniej pięciu objętościom komory badawczej w ciągu 24 godzin (3). Jeżeli jednak przestrzegana jest wartość wskaźnika obciążenia wskazana w pkt 19, możliwe jest zastosowanie mniejszego natężenia przepływu, np. wynoszącego 2–3 objętości komór badawczych, w celu uniknięcia szybkiego usunięcia paszy.
16. Roztwory do badań o wybranych stężeniach przygotowuje się przez rozcieńczenie roztworu podstawowego. Roztwór podstawowy najlepiej jest przygotowywać poprzez mechaniczne mieszanie lub wstrząsanie badanej substancji chemicznej z wodą rozcieńczającą (np. poprzez mieszanie lub sonikację). Można zastosować kolumny nasyceniowe (rozpuszczające) lub metody pasywnego dawkowania (6) w celu uzyskania odpowiednio stężonego roztworu podstawowego. Nie zaleca się stosowania nośnika rozpuszczalnikowego. W przypadku gdy rozpuszczalnik jest niezbędny, należy równolegle przeprowadzić próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem przy takim samym stężeniu rozpuszczalnika jak przy podaniach substancji chemicznej; tj. poziom rozpuszczalnika powinien być w miarę możliwości równy we wszystkich stężeniach oraz w kontroli z rozpuszczalnikiem. W przypadku niektórych układów z rozcieńczalnikiem może być to trudne z technicznego punktu widzenia; w takim przypadku stężenie rozpuszczalnika w kontroli z rozpuszczalnikiem powinno być równe najwyższemu stężeniu rozpuszczalnika w grupie badanej. W odniesieniu do substancji trudnych do zbadania należy zapoznać się z wytyczną OECD dotyczącą badania toksyczności wodnej trudnych substancji i mieszanin (Guidance Document No. 23 on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures) (2). W przypadku stosowania rozpuszczalnika wybór rozpuszczalnika będzie uwarunkowany właściwościami chemicznymi substancji. W wytycznej OECD nr 23 zaleca się, by maksymalne stężenie wynosiło 100 µl/l. W celu uniknięcia potencjalnego wpływu rozpuszczalnika na mierzone punkty końcowe (7) zaleca się utrzymywanie stężenia rozpuszczalnika na jak najniższym poziomie.
17. W badaniu półstatycznym można postępować zgodnie z dwoma różnymi procedurami wymiany. W czystych naczyniach przygotowuje się nowe roztwory do badań i do nowych naczyń ostrożnie przenosi się jaja i larwy, które przeżyły albo organizmy doświadczalne pozostawia się w naczyniach badawczych i wymienia się część (co najmniej dwie trzecie) objętości roztworu do badań / substancji kontrolnej.

PROCEDURA

Warunki narażenia na działanie substancji*Czas trwania*

18. Badanie należy rozpocząć najwcześniej jak to możliwe po zapłodnieniu jaj, przy czym najlepiej zanurzyć je w roztworach do badań przed rozpoczęciem bruzdkowania tarczy zarodkowej lub jak najszybciej po tym stadium. Czas trwania badania będzie zależny od wykorzystanego gatunku. W dodatku 2 przedstawiono niektóre zalecane czasy trwania badania.

Obciążenie

19. Liczba zapłodnionych jaj na początku badania musi być wystarczająca do spełnienia wymogów statystycznych. Należy je rozdzielić w taki sposób, by zostały poddane działaniu substancji chemicznej w sposób losowy, przy czym w każdym stężeniu należy wykorzystać co najmniej 80 jaj, rozdzielonych równo między co najmniej cztery komory badawcze będące kontrpróbami. Wskaźnik obciążenia (biomasa w przeliczeniu na objętość roztworu do badań) powinien być wystarczająco niski, by w stadium jaja i w stadium larwalnym możliwe było utrzymanie stężenia rozpuszczonego tlenu wynoszącego co najmniej 60 % wartości nasycenia powietrzem bez napowietrzania. Zaleca się, by wskaźnik obciążenia w badaniach przepływowym nie przekraczał 0,5 g/l mokrej masy na 24 godziny i by nie przekraczał 5 g/l roztworu w dowolnym momencie (3).

Światło i temperatura

20. Fotoperiod i temperatura wody powinny być odpowiednie dla gatunku doświadczalnego (zob. dodatek 2).

Karmienie

21. Pasza i karmienie są kluczowe, przy czym zasadnicze jest rozpoczęcie podawania paszy odpowiedniej dla każdego stadium życia w odpowiednim czasie i w ilości wystarczającej do utrzymania prawidłowego wzrostu. Wszystkie kontrpróby powinny otrzymywać w przybliżeniu takie same ilości paszy, chyba że zostały one dostosowane w celu uwzględnienia upadkowości. Aby zapobiec akumulacji odpadów, należy usuwać nadwyżkę paszy i ekskrementy. Szczegółowy opis schematów karmienia znajduje się w dodatku 3, lecz w miarę zdobywania doświadczenia schematy żywienia są stale udoskonalane, by poprawić przeżywalność i zoptymalizować wzrost. Pasza żywa stanowi źródło urozmaicenia warunków bytowania i w związku z tym należy stosować ją zamiast paszy suchej lub mrożonej lub jako dodatek do takiej paszy, gdy tylko jest ona odpowiednia dla danego gatunku i stadium rozwoju.

Badane stężenia

22. Zwykle wymagane jest zastosowanie pięciu stężeń badanej substancji chemicznej, z co najmniej czterema kontrpróbami na stężenie, które różnią się o taką samą wielokrotność nieprzekraczającą 3,2. Podczas wyboru badanych stężeń należy uwzględnić informacje dotyczące badania ostrej toksyczności, najlepiej z wykorzystaniem tego samego gatunku lub badania ustalającego zakres (1), jeżeli tylko takie informacje są dostępne. Podczas wyboru zakresu badanych stężeń należy jednak wziąć pod uwagę wszystkie źródła informacji, w tym takie źródła, jak np. podejście przekrojowe lub dane z badania ostrej toksyczności na rybnym embrionie. Jeżeli celem badania jest jedynie ustanowienie empirycznego NOEC, dopuszczalne jest przeprowadzenie badania granicznego lub rozszerzonego badania granicznego, w którym występuje mniej niż pięć stężeń, jako badania ostatecznego. Jeżeli użyto mniej niż pięć stężeń, należy podać uzasadnienie. Nie ma potrzeby przeprowadzania badania, gdy stężenia badanej substancji chemicznej są wyższe niż 96-godzinne LC₅₀ lub 10 mg/l, którakolwiek z tych wartości jest niższa.

Kontrole

23. Próba kontrolna z wodą rozcieńczającą i, w miarę potrzeby, kontrola z rozpuszczalnikiem zawierające nośnik rozpuszczalnikowy powinny być przeprowadzane wyłącznie jako dodatek do badania z wykorzystaniem serii stężeń badanej substancji chemicznej (zob. pkt 16).

Częstotliwość oznaczeń i pomiarów analitycznych

24. Przed rozpoczęciem okresu narażenia należy zapewnić (np. poprzez dokonanie pomiaru badanych stężeń) prawidłowe działanie układu podawania substancji chemicznej we wszystkich kontrpróbach. Należy ustalić wymagane metody analityczne, w tym odpowiednią granicę oznaczalności i dostateczną wiedzę na temat stabilności substancji w układzie badawczym. W trakcie badania stężenia badanej substancji chemicznej oznacza się w regularnych odstępach czasu w celu scharakteryzowania narażenia. Konieczne jest wykonanie co najmniej pięciu oznaczeń. W przypadku układów przepływowych pomiary analityczne badanej substancji chemicznej w jednej kontrpróbie na stężenie należy wykonywać co najmniej raz w tygodniu, systematycznie zmieniając kontrpróby. Dodatkowe oznaczenia analityczne często będą miały korzystny wpływ na podniesienie jakości wyniku badania. Próbkę mogą wymagać przefiltrowania w celu usunięcia ewentualnych cząstek stałych (np. przez filtr z porami o średnicy 0,45 µm) lub odwirowania, aby mieć pewność, że oznaczenia substancji chemicznej są wykonywane w rzeczywistym roztworze. Aby obniżyć adsorpcję badanej substancji chemicznej, należy nasączyć filtry przed ich użyciem. Jeżeli zmierzone stężenie nie utrzymuje się w granicach 80–120 % stężenia nominalnego, należy oznaczyć stężenia efektywne i wyrazić względem średniej arytmetycznej stężenia w badaniach przepływowych (zob. dodatek 6 metody badawczej C.20 w odniesieniu do obliczania średniej arytmetycznej(8)) i wyrazić względem średniej geometrycznej zmierzonych stężeń w przypadku badań półstatycznych (zob. rozdział 5 wytycznej OECD „Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures” (2)).
25. W trakcie badania należy dokonywać pomiarów rozpuszczonego tlenu, pH i temperatury we wszystkich naczyniach badawczych, a co najmniej raz w tygodniu należy mierzyć zasolenie i twardość, jeżeli jest to uzasadnione, na początku i pod koniec badania. Zalecane jest stałe monitorowanie temperatury w co najmniej jednym naczyniu badawczym.

Obserwacje

26. **Stadium rozwoju embrionalnego:** należy jak najdokładniej sprawdzić etap embrionalny na początku narażenia na działanie badanej substancji chemicznej. Można tego dokonać, stosując reprezentatywną próbkę jaj odpowiednio utrwalonych i oczyszczonych.
27. **Wylęg i przeżywalność:** obserwacje wylęgania i przeżywalności należy prowadzić co najmniej raz dziennie, a wartości liczbowe należy odnotowywać. W przypadku zaobserwowania pojawienia się grzyba we wczesnym stadium rozwoju embrionalnego (np. w pierwszym lub drugim dniu badania), należy takie jaja policzyć i usunąć. Martwe embriony, larwy i ryby młode należy usunąć bezzwłocznie po ich zauważeniu, ponieważ mogą szybko ulec rozkładowi i rozdrobnieniu w wyniku działalności pozostałych ryb. Należy zachować najwyższą ostrożność przy usuwaniu martwych osobników, aby nie uszkodzić fizycznie znajdujących się w pobliżu jaj/larw. Oznaki śmierci różnią się w zależności od gatunku i stadium rozwoju: Na przykład:
- w przypadku zapłodnionych jaj: w szczególności we wczesnych stadiach znacząca utrata przezroczystości i zmiana w zabarwieniu spowodowane koagulacją lub strącaniem białek, przez co jaja stają się białe i nieprzezroczyste;
 - w przypadku embrionów, larw i ryb młodych: bezruch lub brak ruchu oddechowego lub brak bicia serca lub brak reakcji na bodźce mechaniczne.
28. **Nietypowy wygląd:** należy odnotowywać liczbę larw lub ryb młodych o nieprawidłowym wyglądzie ciała w regularnych odstępach czasu, w zależności od czasu trwania badania, podając opis charakteru anomalii. Należy zwrócić uwagę, że larwy i ryby młode z anomaliami są zjawiskiem naturalnym i w próbach kontrolnych niektórych gatunków ich odsetek może być rzędu kilku procent. Jeżeli deformacje i związane z tym nietypowe zachowanie zostaną uznane za tak poważne, że sprawiają organizmowi duże cierpienie, oraz jeżeli organizm osiągnął punkt, po przekroczeniu którego powrót do zdrowia nie będzie możliwy, można taki organizm wyeliminować z badania. Zwierzęta takie należy uśmiercić i potraktować jako przypadki upadkowości dla potrzeb późniejszej analizy danych. Normalny rozwój embrionalny został udokumentowany w odniesieniu do większości gatunków zalecanych do wykorzystywania w niniejszej metodzie badawczej (9) (10) (11) (12).
29. **Nietypowe zachowanie:** należy odnotowywać anomalie, np. hiperwentylacja, nieskoordynowane ruchy w czasie pływania, nietypowy spokój i nietypowe zachowanie podczas pobierania pokarmu, w regularnych odstępach czasu w zależności od czasu trwania badania (np. raz dziennie w przypadku gatunków ciepłowodnych). Powyższe objawy, które trudno jednak ocenić ilościowo, mogą, w przypadku ich zaobserwowania, pomóc w interpretacji danych dotyczących upadkowości.

30. **Masa:** pod koniec badania wszystkie ryby, które przeżyły, są ważone co najmniej na podstawie kontrpróby (zgłoszenie liczby zwierząt w kontrpróbie i średniej masy zwierzęcia): preferowana jest mokra masa (po osuszeniu bibułą), można jednak zgłaszać również dane dotyczące suchej masy (13).
31. **Długość ciała:** pod koniec badania mierzy się długość ciała poszczególnych osobników. Zaleca się podawać długość całkowitą, jeżeli jednak ma miejsce martwica lub uszkodzenia płetwy ogonowej, można stosować długość standardową. W stosunku do wszystkich ryb wykorzystanych w badaniu należy stosować taką samą metodę. Długość ciała poszczególnych osobników można mierzyć za pomocą np. suwmiarki, kamery cyfrowej lub wzorcowanego mikrometru okularowego. Typowe minimalne długości ciała zostały zdefiniowane w dodatku 2.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

32. Zaleca się, aby plan doświadczenia i wybrany test statystyczny zapewniły dostateczną moc (80 % lub wyższą) do wykrycia zmian o znaczeniu biologicznym w punktach końcowych, w przypadku gdy należy zgłosić NOEC. Zgłoszenie odpowiednich stężeń efektywnych i parametrów może zależeć od ram regulacyjnych. Jeżeli należy zgłosić EC_x , układ doświadczalny i wybrany model regresji powinny umożliwiać oszacowanie EC_x , tak aby (i) 95-procentowy przedział ufności podany w odniesieniu do EC_x nie zawierał zera i nie był zbyt szeroki, (ii) 95-procentowy przedział ufności w odniesieniu do prognozowanej średniej przy EC_x nie zawierał średniej kontrolnej, (iii) nie istniało znaczące niedopasowanie modelu regresji do danych. Każde z tych podejść wymaga ustalenia procentowej zmiany w każdym punkcie końcowym, który jest ważny pod względem wykrycia lub oszacowania. Układ doświadczalny należy tak dostosować, aby to umożliwiał. Jeżeli nie zostaną spełnione powyższe warunki oznaczenia EC_x , należy zastosować podejście oparte na NOEC. Istnieje małe prawdopodobieństwo, aby do wszystkich punktów końcowych miała zastosowanie taka sama zmiana procentowa, i równie mało prawdopodobne jest, aby można było zaplanować wykonalne doświadczenie spełniające te kryteria dla wszystkich punktów końcowych, w związku z tym należy skupić się na tych punktach końcowych, które są istotne dla danego doświadczenia, planując doświadczenie w odpowiedni sposób. W dodatkach 5 i 6 można znaleźć schematy statystyczne i wytyczne dotyczące każdego podejścia, które można wykorzystać przy przetwarzaniu danych i wyborze najodpowiedniejszego testu lub modelu statystycznego. Można również zastosować inne podejścia statystyczne, pod warunkiem że są one uzasadnione z naukowego punktu widzenia.
33. Konieczna będzie analiza zmian w obrębie każdego zbioru kontrprób z zastosowaniem analizy wariancji lub procedur tablicy wielodzielczej oraz odpowiednich metod analizy statystycznej opartych na tej analizie. W celu dokonania porównania wielokrotnego wyników uzyskanych przy poszczególnych stężeniach z wynikami prób kontrolnych zaleca się stosowanie regresyjnego testu Jonckheere'a-Terpstry lub testu Williamsa w odniesieniu do reakcji ciągłych oraz testu Cochrańa-Armitage'a w odniesieniu do reakcji kwantowych, które są spójne z monotoniczną zależnością stężenie-odpowiedź oraz w przypadku braku dowodów na wariancję większą niż dwumianowa (14) W przypadku dowodu na wariancję większą niż dwumianowa zaleca się opracowaną przez Rao-Scotta korektę testu Cochrańa-Armitage'a (15) (16) lub test Williamsa lub Dunnetta (po przekształceniu za pomocą funkcji pierwiastek kwadratowy arcsin) lub test Jonckheere'a-Terpstry zastosowany do wartości procentowych odnotowanych w kontrpróbie. Jeżeli dane nie są spójne z monotoniczną zależnością stężenie-odpowiedź, metoda Dunnetta lub Dunna lub Manna-Whitneya może okazać się przydatna w odniesieniu do reakcji ciągłych, a dokładny test Fishera – w odniesieniu do reakcji kwantowych (14) (17) (18). Niezależnie od stosowanej metody statystycznej czy stosowanego modelu statystycznego należy zadbać o spełnienie wymogów danej metody lub danego modelu (np. w układzie doświadczalnym i zastosowanym teście lub modelu została oszacowana i uwzględniona zmienność między komorami). Dane należy oceniać pod kątem normalności, a w dodatku 5 podano sposób postępowania z resztami z ANOVA. W dodatku 6 omówione zostały dodatkowe względy dotyczące podejścia regresyjnego. Aby spełnić wymagania testu statystycznego, należy wziąć pod uwagę transformacje. Transformacje umożliwiające dopasowanie modelu regresji wymagają jednak dużej ostrożności, ponieważ np. 25-procentowa zmiana w nieprzekształconej reakcji nie odpowiada 25-procentowej zmianie w reakcji nieprzekształconej. W przypadku wszystkich analiz jednostką analizy jest komora badawcza, a nie pojedyncza ryba, i w związku z tym jednostka doświadczalna oraz testy hipotez i regresja powinny to odzwierciedlać (3) (14) (19) (20).

Sprawozdanie z badania

34. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna:

Substancja jednoskładnikowa

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

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:

- jak najdokładniejsza charakterystyka, np. nazwa chemiczna (zob. powyżej), ilość i istotne właściwości fizykochemiczne składników.

Gatunek doświadczalny:

- nazwa systematyczna, szczep, źródło i metoda pobierania zapłodnionych jaj i dalsza obróbka.

Warunki badania:

- zastosowana procedura badawcza (np. układ półstatyczny lub przepływowy, obciążenie);
- fotoperiod(-y);
- plan badania (np. liczba komór badawczych i kontrprób, liczba jaj w kontrpróbce, materiał i wielkość komory badawczej (wysokość, szerokość, objętość), objętość wody w każdej komorze badawczej);
- metoda przygotowania roztworów podstawowych i częstotliwość wymiany (należy określić środek zwiększający rozpuszczalność i jego stężenie, jeśli został zastosowany);
- metoda dawkowania badanej substancji chemicznej (np. pompy, układy rozcieńczające);
- sprawność odzyskowa metody i badane stężenia nominalne, granica oznaczalności, średnie wartości pomiarowych oraz ich odchylenia standardowe w naczyniach badawczych, a także metoda użyta do ich uzyskania oraz dowody świadczące o tym, że pomiary odnoszą się do stężeń badanej substancji chemicznej w rzeczywistym roztworze;
- cechy wody rozcieńczającej: pH, twardość, temperatura, stężenie rozpuszczonego tlenu, poziom chloru resztkowego (jeśli dokonano pomiaru), całkowity węgiel organiczny (jeśli dokonano pomiaru), zawiesina (jeśli dokonano pomiaru), zasolenie ośrodka użytego do badania (jeśli dokonano pomiaru) oraz wszelkie inne wykonane pomiary;
- jakość wody w naczyniach badawczych: pH, twardość, temperatura i stężenie rozpuszczonego tlenu;
- szczegółowe informacje dotyczące karmienia (np. rodzaj pokarmu, źródło, podawana ilość i częstotliwość podawania).

Wyniki zgłaszane indywidualnie (lub na podstawie kontrprób) oraz jako średnia i współczynnik zmienności, w stosownych przypadkach, w odniesieniu do następujących punktów końcowych:

- dowody, że próby kontrolne spełniają normę dopuszczalności ogólnego wskaźnika przeżywalności dla gatunku doświadczalnego (dodatek 2);
- dane dotyczące upadkowości w każdym stadium (embrionalnym, larwalnym i młodocianym) oraz upadkowość zbiorcza;
- liczba dni do wylęgu, liczba larw wylęgających się każdego dnia oraz zakończenie okresu wylęgu;
- liczba zdrowych ryb pod koniec badania;
- dane dotyczące długości ciała (podać długość standardową albo całkowitą) i masa ciała zwierząt, które przeżyły;
- częstość występowania, opis i liczba ewentualnych anomalii morfologicznych;
- częstość występowania, opis i liczba przypadków ewentualnego wpływu na zachowanie;

- metoda analizy statystycznej (analiza regresji lub analiza wariancji) oraz przetwarzanie danych (zastosowany test lub model statystyczny);
- najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian, w odniesieniu do każdej ocenianej reakcji (NOEC);
- najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany, (dla $p = 0,05$) w odniesieniu do każdej ocenianej reakcji (LOEC);
- EC_x w odniesieniu do każdej ocenianej reakcji, jeżeli dotyczy, i przedziały ufności (np. 90 % lub 95 %) oraz wykres dopasowanego modelu wykorzystanego do obliczeń, nachylenie krzywej stężenie-odpowiedź, wzór modelu regresji, szacowane parametry modelu i ich błędy standardowe.

Wszelkie odstępstwa od metody badawczej.

Omówienie wyników, w tym ewentualny wpływ odstępstw od niniejszej metody badawczej na wynik badania.

Tabela 1

Gatunki ryb zalecane do badania

SŁODKOWODNE	WODY ESTUARYJNE i MORSKIE:
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Pstrąg tęczowy	<i>Cyprinodon variegatus</i> Karpieńec zmienny
<i>Pimephales promelas</i> Strzebla wielkogłowa	<i>Menidia</i> sp. Menidia berylka
<i>Danio rerio</i> Danio pręgowany	
<i>Oryzias latipes</i> Ryżanka japońska lub ryżanka	

BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 171, OECD, Paryż.
- (2) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny. nr 23, OECD, Paryż.
- (3) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów. E 1241-88. 26.
- (4) Brauhn, J.L. i R.A. Schoettger (1975), Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.
- (5) Brungs, W.A. i B.R. Jones (1977), Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.
- (6) Adolfsson-Erici, *et al.* (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.
- (7) Hutchinson, T.H. *et al.* (2006), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review, Aquatic Toxicology, 76, s. 69-92.
- (8) Rozdział C.20 niniejszego załącznika, Badanie wpływu substancji na rozrodczość *Daphnia magna*.

- (9) Hansen, D.J. i P.R. Parrish (1977), Suitability of sheepshead minnows (*Cyprindon variegatus*) for life-cycle toxicity tests, In *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation* (red. F.L. Mayer i J.L. Hamelink), ASTM STP 634.
 - (10) Kimmel, H. B. *et al.* (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203:253–310.
 - (11) Gonzalez-Doncel, M. *et al.* (2005), A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrinichthyidae) *Journal of Applied Ichthyology*, 20:1–14.
 - (12) Devlin, E.W. *et al.* (1996), Prehatching Development of the Fathead Minnow, *Pimephales promelas* Rafinesque. EPA/600/R-96/079. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C..
 - (13) Oris, J.T., S.C. Belanger, i A.J. Bailer, (2012), Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test, *Environmental Toxicology and Chemistry* 31; 2, s. 370–376.
 - (14) OECD (2006). *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment nr 54, OECD, Paryż.
 - (15) Rao, J.N.K. i A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, *Biometrics* 48, s. 577–585.
 - (16) Rao, J.N.K. i A.J. Scott (1999), A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, *Statistics in Medicine* 18, s. 1373–1385.
 - (17) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of American Statistical Association*, 50, s. 1096–1121.
 - (18) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, s. 482–491.
 - (19) Rand, G.M. i S.R. Petrocelli (1985), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Publication Corporation, Nowy Jork.
 - (20) McClave, J.T., J.H. Sullivan i J.G. Pearson (1980). *Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data*, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Filadelfia.
-

Dodatek 1

DEFINICJE

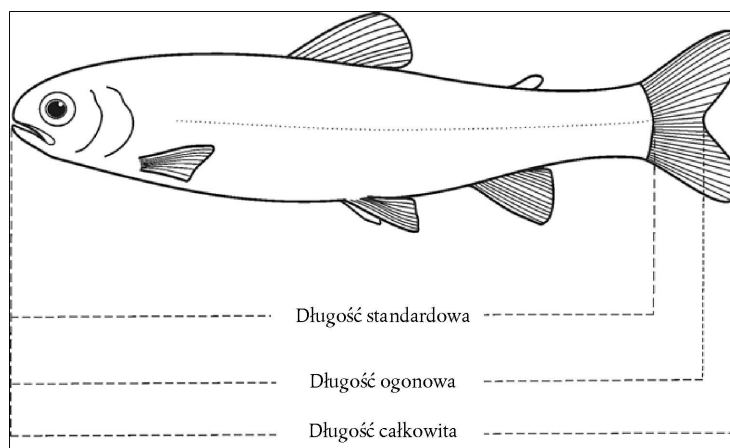
Długość ogonowa (FL): oznacza długość od czubka pyska do końca środkowego promienia płetwy ogonowej – parametr ten wykorzystuje się w odniesieniu do ryb, u których trudno jest wskazać miejsce, w którym kończy się kręgosłup (www.fishbase.org).

Długość standardowa (SL): oznacza długość ryby mierzoną od czubka pyska do tylnej krawędzi ostatniego kręgu lub do tylnej krawędzi środkowotylniej części urostylu. Krótko mówiąc, ramach tego pomiaru nie bierze się pod uwagę długości płetwy ogonowej (www.fishbase.org).

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

Wykres 1

Opis różnych stosowanych długości



Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

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

Najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany, (LOEC) oznacza najmniejsze badane stężenie badanej substancji chemicznej, przy którym obserwuje się wystąpienie statystycznie istotnego wpływu (przy $p \leq 0,05$) w porównaniu z próbą kontrolną. Jednakże wszystkie badane stężenia powyżej LOEC powinny wywierać szkodliwy skutek równy skutkom lub większy niż skutki obserwowane przy LOEC. W przypadku gdy oba warunki nie mogą być spełnione, należy szczegółowo wyjaśnić, w jaki sposób wybrano LOEC (a następnie NOEC). W dodatkach 5 i 6 przedstawiono dodatkowe wytyczne w tym zakresie.

Najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian, (NOEC) oznacza badane stężenie nieznacznie niższe niż LOEC, które nie wywiera statystycznie istotnego wpływu ($p < 0,05$) w ustalonym okresie narażenia w porównaniu z próbą kontrolną.

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

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

IUPAC: Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

WARUNKI BADANIA, CZAS TRWANIA BADANIA I KRYTERIA PRZEŻYCIA DLA ZALECANYCH GATUNKÓW

GATUNEK	WARUNKI BADANIA			ZALECANY CZAS TRWANIA BADANIA	Typowa minimalna średnia długość całkowita ryb kontrolnych pod koniec badania (mm) ⁽¹⁾	PRZEŻYWALNOŚĆ RYB KONTROLNYCH (minimalna)	
	Temperatura (° C)	Zasolenie (‰)	Fotoperiod (godziny)			Skuteczność wylęgu	Przeżywalność po wylęgu
Woda słodka:							
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Pstrąg tęczowy	10 ± 1,5 ⁽²⁾		12–16 ⁽³⁾	2 tygodnie po rozpoczęciu swobodnego karmienia prób kontrolnych (lub po upływie 60 dni od wylęgu)	40	75 %	75 %
<i>Pimephales promelas</i> Strzebla wielkogłowa	25 ± 1,5		16	32 dni od dnia rozpoczęcia badania (lub po upływie 28 dni od wylęgu)	18	70 %	75 %
<i>Danio rerio</i> Danio pręgowany	26 ± 1,5		12–16 ⁽⁴⁾	po upływie 30 dni od wy- lęgu	11	70 %	75 %
<i>Oryzias latipes</i> Ryżanka japońska lub ry- żanka	25 ± 2		12–16 ⁽⁴⁾	po upływie 30 dni od wy- lęgu	17	80 %	80 %
Wody estuaryjne i morskie:							
<i>Cyprinodon variegatus</i> Karpieńiec zmienny	25 ± 1,5	15–35 ⁽⁵⁾	12–16 ⁽⁴⁾	32 dni od dnia rozpoczęcia badania (lub po upływie 28 dni od wylęgu)	17	75 %	80 %
<i>Menidia sp.</i> Menidia beryłka	22–25	15–35 ⁽⁵⁾	13	28 dni	20	80 %	60 %

Legenda:

- (1) Choć typowa minimalna średnia długość całkowita nie stanowi kryterium ważności, wszelkie odchylenia poniżej podanej wartości powinny zostać szczegółowo zbadane, biorąc pod uwagę czułość badania. Minimalną średnią długość całkowitą wyprowadza się ze zbioru danych dostępnych w danym momencie.
- (2) Konkretny szczep pstrąga tęczowego wykorzystanego w badaniu może wymagać zastosowania innych temperatur. Tarlaki należy utrzymywać w takiej samej temperaturze jak temperatura, w której utrzymywane są jaja. Po otrzymaniu jaj od hodowcy prowadzącego działalność handlową konieczny jest krótki (np. 1–2 godzinny) okres adaptacji jaj do temperatury, w jakiej przeprowadza się badanie.
- (3) Ciemność w przypadku larw przez okres tygodnia od chwili wylęgu, chyba że są one poddawane analizie – wówczas przygaszone światło przez cały okres badania (12–16 godzinny fotoperiod) ⁽⁴⁾.
- (4) Dla wszelkich określonych warunków badania należy stosować te same warunki oświetlenia.
- (5) Niezależnie od rodzaju badania badanie należy przeprowadzać przy poziomym zasoleniu mieszczącym się w granicach ± 2‰ od tej wartości.

WYTYCZNE W ZAKRESIE KARMIEŃIA WYLĘGU I ZWIERZĄT DOŚWIADCZALNYCH ZALECANEGO GATUNKU ORAZ WYTYCZNE W ZAKRESIE POSTĘPOWANIA Z TYM WYLĘGIEM I Z TYMI ZWIERZĘTAMI DOŚWIADCZALNYMI

GATUNEK	PASZA (*)				CZAS PRZENIESIENIA PO WYLĘGU	CZAS PIERWSZEGO KARMIEŃIA
	Tarlaki	Nowo wyklute larwy	Osobniki młode			
			Rodzaj	Częstotliwość karmienia		
Woda słodka:						
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Pstrąg tęczy	pasza dla pstrągów	brak ^(a)	starter pstrągowy BSN	2–4 karmienia dziennie	14–16 dni od dnia wylęgu lub od dnia wypłynięcia narybku	19 dni od dnia wylęgu lub od dnia wypłynięcia narybku
<i>Pimephales promelas</i> Strzebla wielkogłowa	BSN, pasza w formie płatków, FBS	BSN	BSN48, pasza w formie płatków	2–3 razy dziennie	w momencie osiągnięcia skuteczności wylęgu na poziomie 90 %	2 dni po wylęgu
<i>Danio rerio</i> Danio pręgowany	BSN, pasza w formie płatków	Pasza dla larw dostępna na rynku, pierwotniaki ^(b) , białko ^(c)	BSN48, pasza w formie płatków	BSN raz dziennie; pasza w formie płatków dwa razy dziennie	w momencie osiągnięcia skuteczności wylęgu na poziomie 90 %	2 dni po wylęgu
<i>Oryzias latipes</i> Ryżanka japońska lub ryżanka	pasza w formie płatków	BSN, pasza w formie płatków (lub pierwotniaki lub wrotki)	BSN48, pasza w formie płatków (lub wrotki)	BSN raz dziennie; pasza w formie płatków dwa razy dziennie <u>lub</u> pasza w formie płatków i wrotki raz dziennie	nie dotyczy	6–7 dni po tarle
Wody estuaryjne i morskie:						
<i>Cyprinodon variegatus</i> Karpieńec zmienny	BSN, pasza w formie płatków, FBS	BSN	BSN48	2–3 karmienia dziennie	nie dotyczy	1 dzień po wylęgu / wypłynięciu narybku
<i>Menidia sp.</i> Menidia beryłka	BSN48, pasza w formie płatków	BSN	BSN48	2–3 karmienia dziennie	nie dotyczy	1 dzień po wylęgu / wypłynięciu narybku

Legenda:

(*) Paszę należy podawać do momentu osiągnięcia stanu sytości. Aby nie dopuścić do nagromadzenia się odpadów, należy w miarę potrzeby usuwać nadmiar paszy i odchody.

FBS mrożone artemie; dorosłe osobniki należące do gatunku Artemia

BSN nauplius artemii; nowo wykluty

BSN48 nauplius artemii; w wieku 48 godzin

^(a) larwy posiadające woreczek żółtkowym nie potrzebują pokarmu

^(b) odfiltrowane z mieszanej hodowli

^(c) granulki powstałe w procesie fermentacji

Dodatek 4

NIEKTÓRE WŁAŚCIWOŚCI CHEMICZNE DOPUSZCZALNEJ WODY ROZCIEŃZAJĄCEJ

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

Dodatek 5

WYTYCZNE STATYSTYCZNE W ZAKRESIE USTALANIA WARTOŚCI NOEC

Informacje ogólne

Za jednostkę analityczną uznaje się zbiornik z kontrpróbą. Dlatego też w przypadku ciągłych pomiarów, np. pomiarów wielkości, należy obliczyć średnią lub medianę kontrpróby – w takim przypadku wartości obliczone dla kontrpróby uznaje się za dane do analizy. Należy wykazać moc stosowanych testów, najlepiej w oparciu o bazę danych historycznych poszczególnych laboratoriów. W odniesieniu do każdego punktu końcowego należy określić wpływ na wielkość, który można wykryć z 75–80 % mocą, wraz z testem statystycznym, który należy zastosować.

Zgodnie z informacjami zawartymi w bazach danych dostępnych w chwili opracowywania niniejszej metody badawczej moc można określić zgodnie z zalecanymi procedurami statystycznymi. Poszczególne laboratoria powinny wykazać swoją zdolność do spełnienia wymogów w zakresie mocy testu, przeprowadzając swoją własną analizę mocy albo wykazując, że współczynnik zmienności (CV) dla każdej reakcji nie przekracza 90. percentyla CV wykorzystanych przy opracowywaniu wytycznej dotyczącej badań. Odpowiednie wartości CV przedstawiono w tabeli 1. Jeżeli w danym przypadku dostępne są wyłącznie średnie lub mediany dla kontrpróby, można pominąć wartości CV odnotowane w ramach kontrpróby.

Tabela 1

90. percentyl CV dla wybranych gatunków ryb słodkowodnych

Gatunek	Reakcja	CV_między kontrpróbami	CV_w ramach kontrprób
Pstrąg tęczowy	Długość	17,4	9,8
	Masa	10,1	28
Strzebla wielkogłowa	Długość	16,9	13,5
	Masa	11,7	38,7
Danio pręgowany	Długość	43,7	11,7
	Masa	11,9	32,8

W ramach praktycznie wszystkich testów statystycznych przeprowadzanych w celu oceny badań toksykologicznych prowadzonych przez dane laboratorium za porównania będące przedmiotem zainteresowania uznaje się porównania między grupami badanymi a grupą kontrolną. Z tego względu ustanowienie wymogu przeprowadzenia istotnego testu F w ramach analizy wariancji przed przeprowadzeniem testu Dunnetta lub Williamsa lub ustanowienie wymogu przeprowadzenia istotnego testu Kruskala-Wallisa przed przeprowadzeniem testu Jonckheere'a-Terpstry, Manna-Whitneya lub Dunna nie jest odpowiednie (Hochberg i Tamhane 1987, Hsu 1996, Dunnett 1955, 1964, Williams 1971, 1972, 1975, 1977, Robertson *et al.* 1988, Jonckheere 1954, Dunn 1964).

W ramach testu Dunnetta automatycznie dokonuje się korekty z tytułu wielokrotnych porównań, przy czym zastosowanie testu F jako tekstu kontrolnego (ang. *gatekeeper*) może niekorzystnie wpłynąć na odsetek wyników fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych uzyskiwanych w rezultacie zastosowania tego testu. Podobnie zastosowanie regresyjnego testu Williamsa i regresyjnego testu Jonckheere'a-Terpstry, w których wykorzystuje się poziom istotności wynoszący 0,05 na każdym etapie testu, prowadzi do zachowania ogólnego odsetka wyników fałszywie dodatnich na poziomie 5 % – zastosowanie testu-F lub testu Kruskala-Wallisa w celach weryfikacyjnych (ang. *gatekeeper*) wywiera niekorzystny wpływ na ten odsetek oraz na siłę testów. W przypadku przeprowadzenia testu Manna-Whitneya i testu Dunna należy zastosować korektę z tytułu wielokrotnych porównań – w tym przypadku zaleca się zastosowanie korekty Bonferroniego-Holma.

Większość zaleceń dotyczących testowania hipotez i weryfikacji założeń leżących u podstaw wspomnianych testów została szczegółowo omówiona w wytycznych OECD z 2006 r., w których przedstawiono również obszerną literaturę poświęconą tej problematyce.

Postępowanie próbami kontrolnymi w przypadku zastosowania rozpuszczalnika

W przypadku wykorzystania rozpuszczalnika należy uwzględnić zarówno próbę kontrolną z wodą rozcieńczającą, jak i próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem. Poszczególne reakcje odnotowane w tych dwóch grupach kontrolnych należy porównać i połączyć je do celów analizy statystycznej, jeżeli nie wykryto między nimi istotnej różnicy. W przeciwnym wypadku do celów oznaczenia NOEC lub oszacowania wartości EC_x należy wykorzystać próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem i nie należy opierać się na próbie kontrolnej z wodą. Zob. ograniczenie ustanowione w kryteriach ważności (pkt 7).

Jeżeli chodzi o dane dotyczące długości, masy, skuteczności wylęgu z jaj, upadkowości larw lub larw, u których zaobserwowano anomalie, a także dane dotyczące pierwszego lub ostatniego dnia wylęgu lub wypłynięcia narybku, do celów porównania próby kontrolnej z wodą rozcieńczającą z próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem przy poziomie istotności wynoszącym 0,05, należy stosować test t-Studenta lub test Manna-Whitneya, pomijając wszystkie grupy badane. Wyniki tych testów należy odnotować w sprawozdaniu.

Pomiary wielkości (długość i masa)

Wartości dotyczące długości i masy poszczególnych ryb mogą przebiegać zgodnie z funkcją rozkładu normalnego lub zgodnie z funkcją rozkładu logarytmiczno-normalnego. Niezależnie od danego przypadku średnie wartości dla kontrprób przebiegają zazwyczaj zgodnie z funkcją rozkładu normalnego na podstawie centralnego twierdzenia granicznego, co znajduje potwierdzenie w danych zgromadzonych w ponad 100 badaniach we wczesnym stadium rozwoju przeprowadzonych w odniesieniu do trzech gatunków słodkowodnych. Alternatywnie, jeżeli z danych lub informacji zawartych w bazach danych historycznych wynika, że wartości dotyczące wielkości poszczególnych ryb przebiegają zgodnie z funkcją rozkładu normalnego, można obliczyć średnią logarytmiczną wartości dotyczących poszczególnych ryb w kontrpróbach, co umożliwi przeprowadzenie analizy na antylogarytmach średnich logarytmicznych obliczonych dla kontrprób.

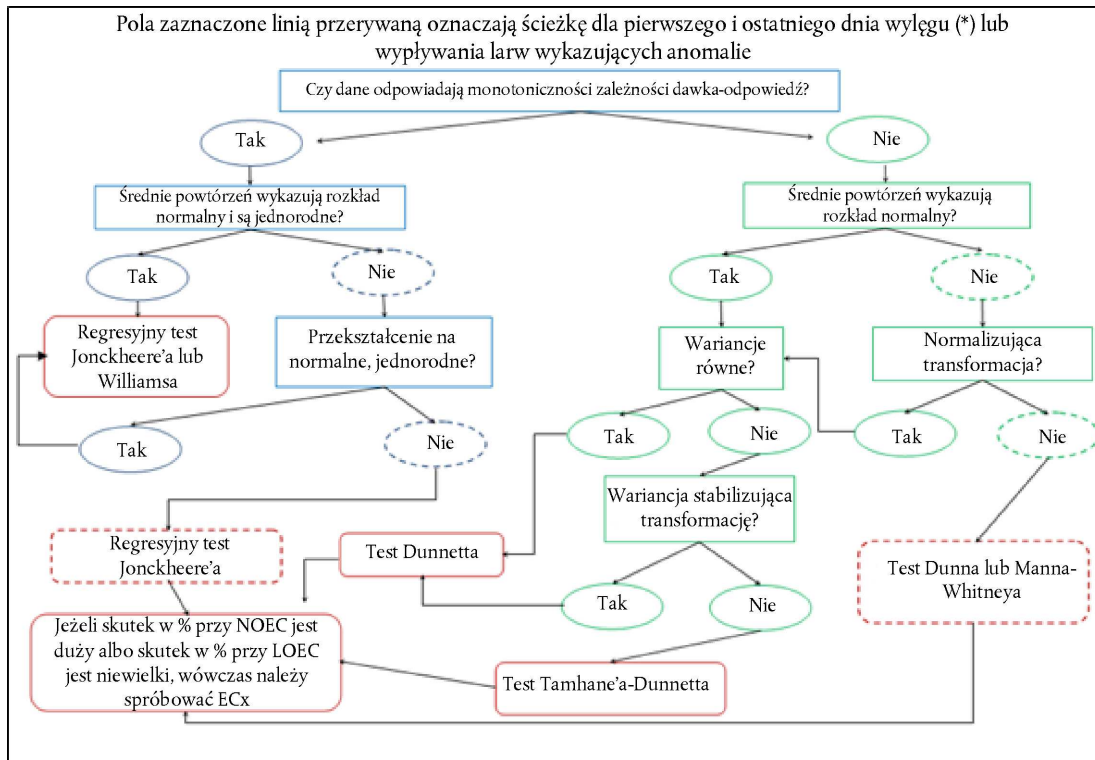
Dane należy ocenić pod kątem spójności przy założeniu rozkładu normalnego i jednorodności wariancji. W tym celu należy skorzystać z reszt uzyskanych po zastosowaniu modelu ANOVA, wykorzystując stężenie jako jedyną zmienną objaśniającą. Dopuszcza się możliwość przeprowadzania analizy wzrokowej na podstawie wykresów punktowych i histogramów lub na podstawie szeregów rozdzielczych. Alternatywnie można zastosować test formalny, np. test Shapiro-Wilka lub test Andersona-Darlinga. Zgodność z jednorodnością wariancji można ocenić, poddając ten sam wykres punktowy analizie wzrokowej lub przeprowadzając formalny test Levene'a. Wymóg przeprowadzenia oceny zgodności z rozkładem normalnym lub oceny jednorodności wariancji obowiązuje wyłącznie w przypadku testów parametrycznych (np. testu Williamsa, testu Dunnetta).

Należy pamiętać o możliwości wystąpienia wartości odstających i o ich wpływie na analizę. W tym kontekście dopuszcza się możliwość zastosowania testu Tukeya na wartość odstającą oraz przeprowadzenia analizy wzrokowej tych samych wykresów reszt, o której mowa powyżej. Należy pamiętać, że przedmiotem obserwacji są całe kontrpróby, dlatego też decyzję o pominięciu wartości odstającej w analizie należy podjąć wyłącznie po dokładnym rozpatrzeniu danego przypadku.

Do testów statystycznych, w których wykorzystuje się specyficzne elementy związane z układem doświadczalnym i oczekiwanymi wartościami biologicznymi, zalicza się regresyjne testy tendencji, np. test Williamsa i test Jonckheere'a-Terpstry. W ramach tych testów zakłada się monotoniczność zależności stężenie-odpowiedź, przy czym dane powinny zostać ocenione pod kątem zgodności z tym założeniem. Taką ocenę można przeprowadzić, dokonując analizy wzrokowej wykresu punktowego, na którym średnie wartości odnotowane dla poszczególnych kontrprób zostały zestawione z badanym stężeniem. W tym kontekście pomocne może okazać się nałożenie segmentowego wykresu liniowego łączącego wartości średnich stężeń ważonych wielkością kontrprób na wykres punktowy. Znaczne odchylenie segmentowego wykresu liniowego od monotoniczności może świadczyć o konieczności zastosowania testów innych niż testy tendencji. Alternatywnie można zastosować testy formalne. W ramach podstawowego testu formalnego oblicza się kontrasty liniowe i kwadratowe dla średnich wartości stężenia. Jeżeli po przeprowadzeniu stosownych obliczeń okaże się, że kontrast kwadratowy jest istotny, a kontrast liniowy nie, może to świadczyć o wystąpieniu problemu związanego z monotonicznością, który powinien zostać poddany dalszej analizie w oparciu o wykresy. Jeżeli podejrzewa się, że źródłem problemu mogą być kwestie związane z rozkładem normalnym lub jednorodnością wariancji, wspomniane kontrasty można sporządzić w oparciu o dane pozyskane w rezultacie przeprowadzenia transformacji pozycyjno-rangowej. Dopuszcza się również możliwość zastosowania alternatywnych procedur, np. testu monotoniczności Bartholomew'a, ale takie procedury zwiększają złożoność analizy.

Rysunek 2

Schemat pomiarów wielkości (długość i masa) NOEC



O ile dane nie będą sprzeczne z wymogami przewidzianymi dla tego rodzaju testów, wartość NOEC ustala się, stosując regresyjny test Williamsa lub regresyjny test Jonckheere'a-Terpstry. Szczegółowe informacje na temat stosowanych procedur przedstawiono w wytycznych OECD z 2006 r. W odniesieniu do danych, które nie spełniają wymogów regresyjnego testu tendencji, dopuszcza się możliwość zastosowania testu Dunnetta lub testu Tamhane'a-Dunnetta (T3), ponieważ w ramach tych testów automatycznie dokonuje się korekty z tytułu wielokrotnych porównań. Testy te bazują na założeniu rozkładu normalnego, a w przypadku testu Dunnetta – jednorodności wariancji. Jeżeli wspomniane warunki nie zostaną spełnione, można zastosować nieparametryczny test Dunna. Szczegółowe informacje na temat wszystkich wspomnianych testów zawarto w wytycznych OECD z 2006 r. Na podstawie ogólnych informacji przedstawionych na rys. 2 można ustalić, który test należy zastosować w danym przypadku.

Wylęg z jaj i przeżywalność larw

Dane przyjmują postać wartości procentowej wskazującej odsetek jaj, z których wykluły się nowe osobniki, lub odsetek larw, które przeżyły, w poszczególnych kontrpróbach. Takie dane powinny zostać ocenione pod kątem wariancji większej niż dwumianowa, co stanowi typową, ale nie powszechnie stosowaną, metodę oceny stosowaną w odniesieniu do tego rodzaju pomiarów. Informacje zawarte na schemacie przedstawionym na rys. 3 dostarczają wskazówek przydatnych przy dokonywaniu wyboru odpowiedniego testu; testy zostały szczegółowo omówione w tekście.

W tym kontekście zazwyczaj stosuje się dwa testy: test Tarone'a C(α) (Tarone, 1979) i test chi kwadrat, każdy z nich przeprowadzany niezależnie dla poszczególnych badanych stężeń. Jeżeli w przynajmniej jednym badanym stężeniu odnotowana zostanie wariancja większa niż dwumianowa, należy zastosować metody zapewniające możliwość należytego uwzględnienia tego faktu.

Wzór 1

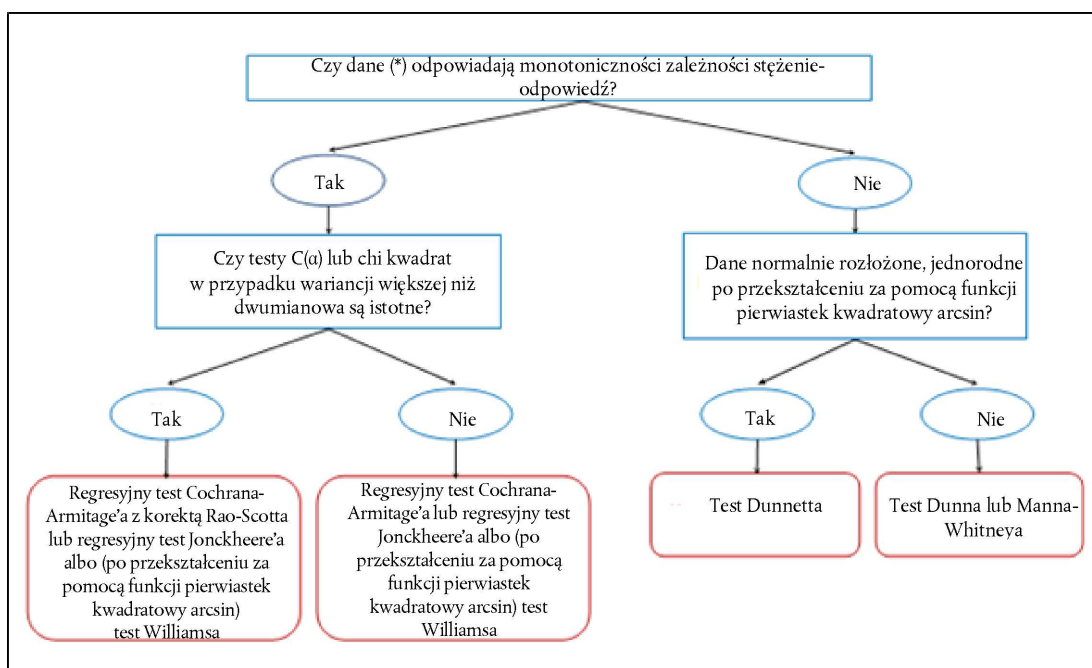
Test Tarone'a C (α) (Tarone 1979)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^m \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1 - \hat{p})} - \sum_{j=1}^m n_j}{\left\{ 2 \sum_{j=1}^m n_j (n_j - 1) \right\}^{1/2}}$$

gdzie \hat{p} oznacza średnią wartość procentową dla danego stężenia, m oznacza liczbę zbiorników z kontrpróbą, n_j oznacza liczbę osobników w kontrpróbie j , a x_j oznacza liczbę osobników reagujących w danej kontrpróbie, tj. niewyklutych lub martwych. Test ten przeprowadza się dla każdego stężenia z osobna. Test ten można przeprowadzić w formie dostosowanego testu chi kwadrat, ale z przeprowadzonych przez Tarone'a ograniczonych symulacji mocy wynika, że moc testu Tarone'a jest większa niż moc testu chi kwadrat.

Rysunek 3

Schemat wylęgu z jaj i upadkowości larw NOEC



(*) Dane mają postać wartości procentowej odnotowanej w kontrpróbie

W przypadku braku istotnych dowodów wskazujących na wystąpienie wariancji większej niż dwumianowa można zastosować regresyjny test Cochрана-Armitage'a. W ramach tego testu pomija się kontrpróby, a więc w przypadku wystąpienia dowodów świadczących o wystąpieniu wariancji większej niż dwumianowa, zaleca się zastosowanie korekty Rao-Scotta w odniesieniu do testu Cochрана-Armitage'a (RSCA), co pozwoli wziąć pod uwagę kontrpróby, wielkość kontrprób i wariancję większą niż dwumianowa. Alternatywne testy, jakie można zastosować w tym kontekście, to regresyjny test Williamsa, regresyjny test Jonckheere'a-Terpstry oraz regresyjny test Dunnetta, jak opisano w sekcji poświęconej pomiarom wielkości. Testy te można zastosować niezależnie od tego, czy w danym przypadku występuje wariancja większa niż dwumianowa, przy czym ich moc jest nieco mniejsza (Agresti 2002, Morgan 1992, Rao i Scott 1992, 1999, Fung *et al.* 1994, 1996).

Pierwszy lub ostatni dzień wylęgu lub wypłynięcia narybku

Reakcja jest liczbą całkowitą i wskazuje dzień badania, w którym dokonano określonej obserwacji w danym zbiorniku z kontrpróbą. Zakres wartości jest zazwyczaj bardzo ograniczony i często charakteryzuje się znacznym udziałem wartości powiązanych, np. pierwszy dzień wylęgu odnotowuje się we wszystkich kontrpróbach, a także – potencjalnie – w jednej lub dwóch próbach kontrolnych poddanych działaniu niższych badanych stężeń. Zastosowanie testów parametrycznych – takich jak test Williamsa i Dunnetta – w odniesieniu do takich danych nie jest odpowiednie. W przypadku braku dowodów świadczących o wystąpieniu poważnego przypadku braku monotoniczności uznaje się, że zastosowanie regresyjnego testu Jonckheere'a-Terpstry zapewnia dostateczną moc, aby wykryć wpływ poddania działaniu badanej substancji chemicznej. W przeciwnym razie można zastosować test Dunna.

Anomalie u larw

Reakcja odpowiada liczbie larw, u których stwierdzono wystąpienie określonych anomalii. Przedmiotowa reakcja często cechuje się niską incydencją i wiąże się z podobnymi problemami jak te odnotowywane w przypadku pierwszego dnia wylęgu; ponadto niekiedy można zaobserwować jej zmienność, jeżeli chodzi o zależność stężenie-odpowiedź. Jeżeli rozkład danych jest przynajmniej w ogólnym zarysie zbliżony do rozkładu właściwego dla stężenia monotonicznego, uznaje się, że zastosowanie regresyjnego testu Jonckheere'a-Terpstry zapewnia dostateczną moc, aby wykryć wpływ poddania działaniu substancji chemicznej. W przeciwnym razie można zastosować test Dunna.

BIBLIOGRAFIA

Agresti, A. (2002); *Categorical Data Analysis*, wydanie drugie, Wiley, Hoboken.

Dunn C. W. (1955); A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, *J. American Statistical Association* 50, s. 1096–1121.

Dunn O. J. (1964); Multiple Comparisons Using Rank Sums, *Technometrics* 6, s. 241–252.

Dunn C. W. (1964); New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics* 20, s. 482–491.

Fung, K.Y., D. Krewski, J.N.K. Rao, A.J. Scott (1994); Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data, *Risk Analysis* 14, s. 639–648.

Fung, K.Y., D. Krewski, R.T. Smythe (1996); A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay, *Canadian Journal of Statistics* 24, s. 431–454.

Hochberg, Y. i A. C. Tamhane (1987); *Multiple Comparison Procedures*, Wiley, Nowy Jork.

Hsu, J.C. (1996); *Multiple Comparisons: Theory and Methods*; Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.

Jonckheere A. R. (1954); A distribution-free k-sample test against ordered alternatives, *Biometrika* 41, s. 133.

Morgan, B.J.T. (1992); *Analysis of Quantal Response Data*, Chapman and Hall, Londyn.

OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Seria dotycząca badań i oceny, nr 54. Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju, OECD, Paryż.

Rao, J.N.K. i Scott, A.J. (1992) – A simple method for the analysis of clustered binary data, *Biometrics* 48, s. 577–585.

Rao, J.N.K. i Scott, A.J. (1999) – A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, *Statistics in Medicine* 18, s. 1373–1385.

Robertson, T., Wright F.T. i Dykstra R.L. (1988); *Order restricted statistical inference*, Wiley.

Tarone, R.E. (1979); Testing the goodness of fit of the Binomial distribution, *Biometrika* 66, s. 585–590.

Williams, D.A. (1971); A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics* 27, s. 103–117.

Williams, D.A. (1972); The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics* 28, s. 519–531.

Williams D. A. (1975); The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratology, *Biometrics* 31, s. 949–952.

Williams, D.A. (1977); Some inference procedures for monotonically ordered normal means, *Biometrika* 64, s. 9–14.

Dodatek 6

WYTYCZNE STATYSTYCZNE W ZAKRESIE SZACOWANIA REGRESJI

Informacje ogólne

Obserwacje wykorzystywane w modelu to średnie wartości odnotowane w kontrpróbie (długość i masa) lub wartości procentowe odnotowane w kontrpróbie (skuteczność wylęgu z jaj i upadkowość larw) (OECD 2006).

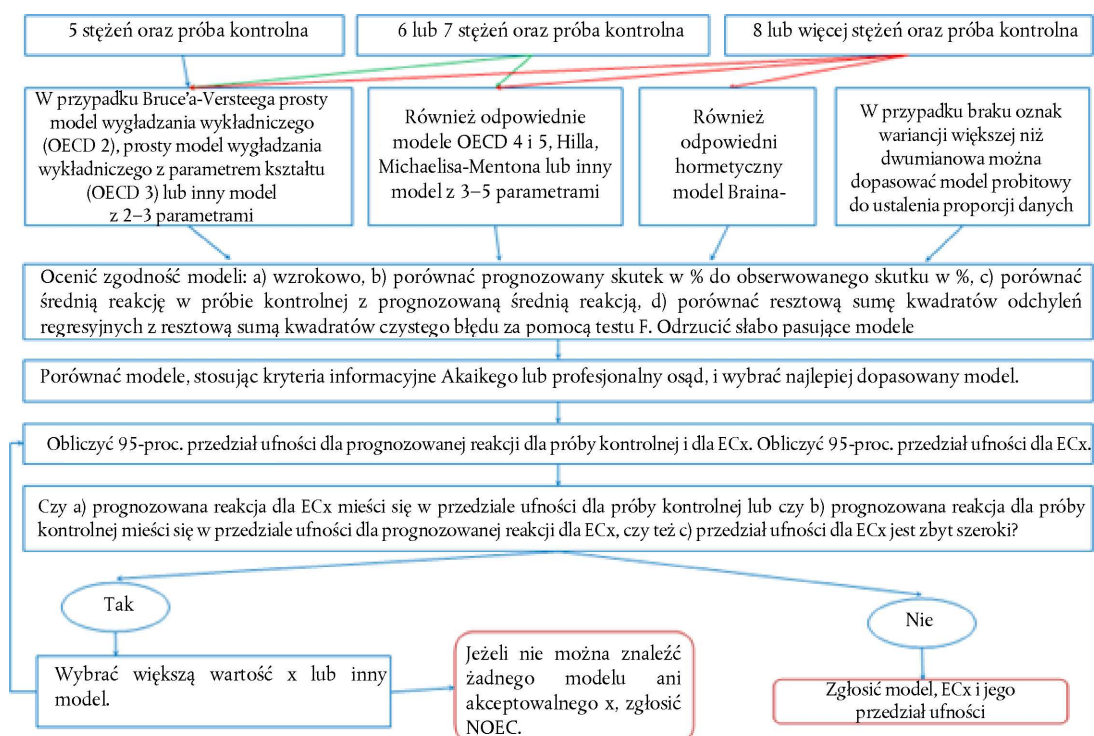
Zasadniczo zaleca się stosowanie regresji ważonej wielkością próbki pobranej z kontrpróbki. Dopuszcza się również możliwość zastosowania innych systemów ważenia, takich jak ważenie przewidywaną średnią reakcją lub połączenie tej metody ważenia z ważeniem wielkością próbki pobranej z kontrpróbki. Ważenie odwrotnością wariancji stężenia wewnątrz próbki nie jest zalecane (Bunke *et al.* 1999, Seber i Wild, 2003, Motulsky i Christopoulos 2004, Huet *et al.* 2003).

Wszelkie transformacje reakcji przed analizą powinny zapewnić możliwość zachowania niezależności obserwacji i EC_x, a granice ufności powinny zostać wyrażone w pierwotnych jednostkach miary, a nie w jednostkach po transformacji. Na przykład zmiana wartości logarytmu długości o 20 % nie jest równoważna 20-procentowej zmianie długości (Lyles *et al.* 2008, Draper i Smith 1999).

Schemat przedstawiony na rys. 4 zawiera ogólne informacje dotyczące sporządzania szacunków EC_x. Bardziej szczegółowe informacje na ten temat przedstawiono poniżej.

Rysunek 4

Schemat sporządzania szacunków EC_x dotyczących średniej długości i masy lub procentowej wartości wylęgu z jaj lub upadkowości larw w kontrpróbie – bardziej szczegółowe informacje w tym zakresie znajdują się w tekście.



Kwestie związane z wylęgiem z jaj i upadkowością larw

Jeżeli chodzi o wylęg z jaj i upadkowość larw, zasadniczo najlepiej jest dopasować model spadkowy, chyba że dopasowuje się model probitowy, jak opisano poniżej. Oznacza to, że w modelu należy wziąć pod uwagę odsetek jaj, z których nie wylężyły się nowe osobniki, lub odsetek padłych larw. Wynika to z faktu, że wartość EC_x oznacza stężenie, w przypadku którego odnotowuje się zmianę odpowiadającą x % średniej reakcji w danej próbie kontrolnej. Jeżeli z 5 % jaj w próbie kontrolnej nie wylęgną się nowe osobniki, a stosowany model bazuje na wskaźniku niewylęgnięcia się nowych osobników z jaj, wartość EC₂₀ odpowiada stężeniu, przy którym odnotowuje się zmianę odpowiadającą 20 % wartości 5-procentowego wskaźnika niewylęgnięcia się nowych osobników z jaj w próbie kontrolnej, co odpowiada zmianie o $0,2 \cdot 0,05 = 0,01$ lub 1 punkt procentowy – w rezultacie wartość wskaźnika niewylęgnięcia się nowych osobników z jaj wynosi 6 %. Takiej niewielkiej zmiany nie można oszacować w rozsądny sposób na podstawie dostępnych danych i nie jest ona istotna z biologicznego punktu widzenia. Jeżeli jednak stosowany model bazuje na wartości procentowej określającej odsetek jaj, z których wylężyły się nowe osobniki, wartość procentowa dla próby kontrolnej wyniosłaby w omawianym przypadku 95 %, a 20-procentowy spadek w stosunku do średniej dla próby kontrolnej oznaczałby zmianę o $0,95 \cdot 0,2 = 0,18$, a zatem skuteczność wylęgu zmniejszyłaby się z 95 % do 77 % (= 95 – 18) – w takim przypadku można oszacować wpływ na stężenie, a opisane obliczenia mają istotniejsze znaczenie. Opisana problematyka nie ma większego znaczenia w kontekście pomiarów wielkości, choć niekorzystny wpływ na wielkość zasadniczo oznacza spadek wielkości.

Modele wykorzystywane przy pomiarze wielkości (długości lub masy) oraz skuteczności wylęgu z jaj lub przeżywalności larw.

Poza hormetycznym modelem Braina-Cousensa wszystkie te modele zostały opisane w wytycznych OECD z 2006 r. i zgodnie z treścią tych wytycznych zaleca się ich stosowanie. Modele określane jako OECD 2–5 zostały również omówione w kontekście doświadczeń w dziedzinie ekotoksyczności w Slob (2002). Istnieje oczywiście wiele innych modeli, które mogą okazać się przydatne. Bunke *et al.* (1999) wymienia szereg modeli, które nie zostały omówione w niniejszym opracowaniu, przy czym w literaturze przedmiotu można znaleźć liczne odniesienia do innych modeli. Zaproponowane poniżej powszechnie stosowane modele uznano za szczególnie odpowiednie w kontekście doświadczeń w dziedzinie ekotoksyczności.

Modele z pięcioma badanymi stężeniami i próbą kontrolną

- model Bruce'a-Versteega
- prosty model wykładniczy (OECD 2)
- prosty model wygładzania wykładniczego z parametrem kształtu (OECD 3)
- prosty model wykładniczy z metodą zerową (OECD 4)

Modele z sześcioma lub większą liczbą badanych stężeń i próbą kontrolną

- model wygładzania wykładniczego z parametrem kształtu i metodą zerową (OECD 5)
- model Michaelisa-Mentena
- model Hilla

W przypadku odnotowania metodą wzrokową symptomów świadczących o wystąpieniu hormezy (której wystąpienie jest mało prawdopodobne w przypadku skutecznego wylęgu z jaj lub przeżywalności larw, ale która może wystąpić w ramach obserwacji wielkości)

- hormetyczny model Braina-Cousensa; Brain i Cousens (1989)

Alternatywne modele, które można zastosować przy przeprowadzaniu pomiarów poziomu niewylęgnięcia się nowych osobników z jaj i upadkowości larw

- modele bazujące na wzroście stosowane w przypadku tych reakcji mogą zostać dopasowane w oparciu o modele probitowe (lub logistyczne), jeżeli nie istnieją dowody świadczące o wystąpieniu wariacji większej niż dwumianowa, a poziom incydencji w próbie kontrolnej szacuje się przy dopasowywaniu modelu. Stosowanie takiej metody dopasowywania nie jest zalecane, ponieważ w jej ramach za jednostkę analizy uznaje się pojedyncze osobniki, a nie kontrpróbę (Morgan 1992, O'Hara Hines i Lawless 1993, Collett 2002, 2003).

Zgodność pojedynczego modelu

- należy przeprowadzić analizę wzrokową zaobserwowanego i przewidywanego spadku wartości procentowej poszczególnych badanych stężeń (Motulsky i Christopoulos 2004, Draper i Smith 1999);

- korzystając z testu F, należy porównać błąd średniokwadratowy regresji z czystym błędem średniokwadratowym (Draper i Smith 1999);
- należy sprawdzić, czy wszystkie parametry stosowane w modelu są istotnie różne od zera (tj. należy ustalić, czy wszystkie parametry stosowane w modelu są istotne) (Motulsky i Christopoulos 2004);
- należy zestawić reszty z regresji z wartością badanego stężenia na wykresie, najlepiej stosując skalę $\log(\text{stężenie})$. Wykresu nie należy wykreślać w oparciu o jakikolwiek schemat; punkty należy rozmieścić losowo wzdłuż linii poziomej na wysokości zerowej;
- dane należy ocenić pod kątem zgodności z rozkładem normalnym i jednorodności wariancji zgodnie z metodą opisaną w dodatku 5;
- ponadto należy ocenić zgodność rozkładu reszt pozostałych po zastosowaniu modelu regresji z rozkładem normalnym, stosując te same metody co opisane w dodatku 5 metody dotyczące reszt z analizy ANOVA.

Porównywanie modeli

- należy stosować kryteria informacyjne Akaikego (AICc). Niższe wartości uzyskane po zastosowaniu kryteriów informacyjnego Akaikego świadczą o lepszym dopasowaniu, a jeżeli $AICc(B) - AICc(A) \geq 10$, wówczas model A jest prawie na pewno lepszy niż model B (Motulsky i Christopoulos (2004));
- należy porównać dwa modele metodą wzrokową, koncentrując się na tym, w jakim stopniu spełniają one przedstawione powyżej kryteria dotyczące pojedynczego modelu;
- zaleca się zastosowanie zasady prostoty, która stanowi, że należy korzystać z najprostszego modelu, który można w rozsądny sposób dopasować do danych (Ratkowsky 1993, Lyles et al. 2008).

Jakość szacunków EC_x

Przedział ufności (CI) dla EC_x nie powinien być zbyt szeroki. Przy podejmowaniu decyzji dotyczącej szerokości przedziału ufności dla EC_x , jaką można przyjąć, by zachować użyteczność EC_x , należy kierować się właściwym osądem statystycznym. Wyniki symulacji modeli regresji dopasowanych do danych dotyczących wylęgu z jaj i wielkości wskazują, że około 75 % przedziałów ufności dla EC_x ($x=10, 20$ lub 30) obejmuje co najwyżej dwa badane stężenia. Symulacje dostarczają ogólnych wskazówek na temat wartości, jakie można uznać za dopuszczalne, oraz praktycznych wskazówek na temat wartości, jakie są możliwe do osiągnięcia. Szereg autorów zwraca uwagę na konieczność ujawniania przedziałów ufności dla wszystkich parametrów wykorzystywanych w modelu oraz podkreśla, że ustanowienie szerokich przedziałów ufności w odniesieniu do parametrów wykorzystywanych w modelach skutkuje tym, że takie modele należy uznać za niedopuszczalne (Ott i Longnecker 2008, Alvord i Rossio 1993, Motulsky i Christopoulos 2004, Lyles et al. 2008, Seber i Wild 2003, Bunke et al. 1999, Environment Canada 2005).

Przedział ufności dla EC_x (lub dla jakiegokolwiek innego parametru wykorzystywanego w modelu) nie powinien zawierać zera (Motulsky i Christopoulos 2004). Wartość ta odpowiada regresji równoważnej najmniejszej istotnej różnicy często przywoływanej w podejściach dotyczących testowania hipotez (np. Wang et al. 2000). Odpowiada ona również przedziałowi ufności, ponieważ średnie reakcje przy LOEC nie obejmują średniej dla próby kontrolnej. Należy ocenić, czy szacunki dotyczące danego parametru są wiarygodne z naukowego punktu widzenia. Na przykład jeżeli przedział ufności dla y_0 wynosi ± 20 %, żadne szacunki EC_{10} nie będą wiarygodne. Jeżeli w modelu przewiduje się 20-procentowy wpływ przy stężeniu C, a maksymalny zaobserwowany wpływ przy stężeniu C i przy niższych stężeniach wynosi 10 %, wówczas wartość EC_{20} należy uznać za niewiarygodną (Motulsky i Christopoulos 2004, Wang et al. 2000, Environment Canada 2005).

Oszacowanie wartości EC_x nie powinno wiązać się z koniecznością dokonania ekstrapolacji wykraczającej poza zakres stężeń dodatnich (Draper i Smith 1999, OECD 2006). Na przykład orientacyjnie można przyjąć, że wartość EC_x nie powinna być niższa od najniższego zbadanego stężenia o więcej niż 25 % lub nie powinna być wyższa od najwyższego zbadanego stężenia o więcej niż 25 %.

BIBLIOGRAFIA

Alvord, W.G., Rossio, J.L. (1993); Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, *Journal of Immunological Methods* 157, s. 155–163.

Brain P. i Cousens R. (1989); An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed res.* 29: s. 93–96.

Bunke, O., Droge, B. i Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33, s. 197–240.

Collett, D. (2002); *Modelling Binary Data*, wydanie drugie, Chapman and Hall, Londyn.

Collett, D. (2003); *Modelling Survival Data in Medical Research*, wydanie drugie, Chapman and Hall, Londyn.

Draper, N.R. i Smith, H. (1999); *Applied Regression Analysis*, wydanie trzecie. Nowy Jork: John Wiley & Sons.

Environment Canada (2005); *Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests*, sprawozdanie EPS 1/RM/46

Huet, S., A. Bouvier, M.-A. Poursat, E. Jolivet (2003); *Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples*, Springer Series in Statistics, Nowy Jork.

Lyles, R. H., C. Poindexter, A. Evans, M. Brown, i C.R. Cooper (2008); Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data, *Contemp Clin Trials*. listopad 2008; 29(6): s. 878–886.

Morgan, B.J.T. (1992); *Analysis of Quantal Response Data*, Chapman and Hall, Londyn.

Motulsky, H., A. Christopoulos (2004); *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting*, Oxford University Press, USA.

O'Hara Hines, R. J. i J. F. Lawless (1993); *Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time*, *Biometrics* t. 49, s. 107–121.

OECD (2006); *Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application*. Seria dotycząca badań i oceny, nr 54, Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju, OECD, Paryż.

Ott, R.L., M.T. Longnecker, *An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis*, wydanie szóste, 2008, Brooks-Cole, Belmont, CA.

Ratkowsky, D.A. (1993); Principles of nonlinear regression, *Journal of Industrial Microbiology* 12, s. 195–199.

Seber, G.A.F., C.J. Wild, *Nonlinear Regression*, Wiley, 2003.

Slob W. (2002); Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.*, 66, s. 298–312.

Wang, Q., D.L. Denton i R. Shukla (2000); Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program, *Environmental Toxicology and Chemistry*, t. 19, s. 113–117, 2000.

C.48. Krótkoterminowe badanie rozrodczości ryb

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 229 (2012). Konieczność opracowania i zweryfikowania badania ryb umożliwiającego wykrycie substancji chemicznych zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego wynika z obawy, że środowiskowe poziomy substancji chemicznych mogą wywoływać działania niepożądane zarówno u ludzi, jak i w przypadku dzikiej flory i fauny ze względu na interakcję tych substancji chemicznych z układem hormonalnym. W 1998 r. OECD zapoczątkowała działania o najwyższym priorytecie mające na celu przegląd istniejących wytycznych dotyczących badań i opracowanie nowych wytycznych dotyczących odsiewania i badania potencjalnych substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego. Jednym z elementów tych działań było opracowanie wytycznej dotyczącej badań w odniesieniu do odsiewania substancji chemicznych oddziałujących na układ hormonalny określonych gatunków ryb. Krótkoterminowe badanie rozrodczości ryb poddano zakrojonomu na szeroką skalę programowi weryfikacji, który obejmował badania międzylaboratoryjne z wykorzystaniem wybranych substancji chemicznych, aby wykazać, że badanie przesiewowe stanowi istotną i wiarygodną metodę wykrywania substancji chemicznych, które mają wpływ na rozrodczość ryb, za pomocą różnych mechanizmów, w tym zmian hormonalnych (1, 2, 3, 4, 5). Wszystkie punkty końcowe określone w dotyczącej badań wytycznej OECD zostały zweryfikowane na strzebli wielkogłowej, przy czym podzbiór punktów końcowych zostały zweryfikowany na ryżance japońskiej (tj. witellogenina i drugorzędowe cechy płciowe) oraz na danio pręgowanym (tj. witellogenina). Działania weryfikacyjne zostały zrecenzowane częściowo przez panel ekspertów powołanych przez koordynatorów krajowych programu wytycznych dotyczących badań OECD (6), a częściowo przez niezależny panel ekspertów powołany przez Agencję Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (29). Przedmiotowe badanie nie ma na celu zidentyfikowania konkretnych mechanizmów zaburzeń hormonalnych, ponieważ zwierzęta doświadczalne mają nieuszkodzoną oś podwzgórze-przysadka-gonady, która może reagować na substancje chemiczne wywierające wpływ na tę oś na różnych poziomach.
2. W niniejszej metodzie badawczej opisuje się badanie przesiewowe *in vivo*, w którym dojrzałe płciowo samce ryb i samice ryb w okresie tarła utrzymuje się razem i poddaje działaniu substancji chemicznej przez ograniczoną część ich cyklu życia (21 dni). Na zakończenie 21-dniowego okresu narażenia mierzy się dwa punkty końcowe biomarkerów u samców i samic jako wskaźniki oddziaływania badanej substancji chemicznej na układ hormonalny; te punkty końcowe to witellogenina i drugorzędowe cechy płciowe. Witellogeninę mierzy się u strzebli wielkogłowej, ryżanki japońskiej i danio pręgowanego, natomiast drugorzędowe cechy płciowe mierzy się u strzebli wielkogłowej i ryżanki japońskiej. Ponadto przez cały czas trwania badania codziennie przeprowadza się pomiar płodności w ujęciu ilościowym. Zachowuje się również gonady, dzięki czemu można przeprowadzić analizę histopatologiczną i ocenić sprawność rozrodczą zwierząt doświadczalnych, co zwiększa wagę dowodów zgromadzonych dla innych punktów końcowych.
3. Niniejszy test biologiczny pełni rolę badania przesiewowego rozrodczości *in vivo*, a kwestie związane z jego stosowaniem regulują postanowienia dokumentu pt. „OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals” (30). W ramach koncepcyjnych ustanowionych w przywołanym powyżej dokumencie krótkoterminowe badanie rozrodczości ryb zostało wstępnie sklasyfikowane na poziomie 3 jako badanie *in vivo* dostarczające danych na temat wybranych mechanizmów/ścieżek wywierania wpływu na funkcjonowanie układu hormonalnego.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

4. Witellogenina (VTG) jest normalnie wytwarzana w wątrobie jajorodnych kręgowców płci żeńskiej w reakcji na endogenne estrogeny w układzie krążenia. Jest ona prekursorem białek żółtka i po wytworzeniu w wątrobie jest przenoszona przez krew do jajnika, gdzie jest pobierana i modyfikowana przez rozwijające się jaja. Witellogenina jest niemalże niewykrywalna w osoczu niedojrzałych samic i samców ryb, ponieważ nie mają one wystarczającej ilości estrogenu w krwiobiegu; wątroba ma jednak zdolność syntezy i wydzielania witellogeniny w reakcji na egzogenną stymulację estrogenem.
5. Pomiar witellogeniny służy wykrywaniu substancji chemicznych o różnych estrogennych charakterach działania. Wykrycie estrogennych substancji chemicznych jest możliwe dzięki pomiarowi indukcji witellogeniny u samców ryb i zostało bogato udokumentowane w recenzowanej literaturze naukowej (np. (7)). Indukcję witellogeniny wykazano również po narażeniu na działanie aromatyzowalnych androgenów (8, 9). Obniżenie poziomu estrogenu w układzie krążenia w przypadku samic, na przykład na skutek inhibicji aromatazy przekształcającej endogenne androgeny w naturalny estrogen 17 β -estradiol, powoduje zmniejszenie poziomu VTG, którą wykorzystuje się do wykrywania substancji chemicznych działających jak inhibitory aromatazy (10, 11). Biologiczne znaczenie reakcji witellogeniny po inhibicji aktywności substancji estrogennej/aromatazy zostało ustalone i szeroko udokumentowane. Możliwe jest jednak, że na wytwarzanie VTG u samic mogą również wpływać ogólna toksyczność i niehormonalne sposoby działania toksycznego, np. hepatotoksyczność.

6. Opracowano i znormalizowano z dobrym wynikiem kilka metod pomiaru w celu rutynowego wykorzystywania. Dotyczy to metod opartych na właściwym dla danego gatunku teście immunoenzymatycznym (ELISA), w którym wykorzystuje się immunochemię do oznaczenia ilościowego wytworzonej VTG w małych próbkach krwi lub wątroby pobranych od pojedynczych osobników ryb (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). W celu dokonania pomiaru VTG pobiera się próbki krwi strzebli wielkogłowej, krwi lub homogenatu głowy/ogona danio przegowanego i wątroby ryżanki. W przypadku ryżanki istnieje dobra korelacja między VTG mierzoną w próbkach krwi i wątroby (19). W dodatku 6 przedstawiono zalecane procedury pobierania próbek do celów analizy VTG. Zestawy do pomiaru VTG są powszechnie dostępne; powinny one opierać się na zweryfikowanej, właściwej dla danego gatunku metodzie ELISA.
7. Drugorzędowe cechy płciowe samców niektórych gatunków ryb są widoczne na zewnątrz, są kwantyfikowalne oraz reagują na poziom endogennych androgenów w krwiobiegu; dotyczy to strzebli wielkogłowej i ryżanki, lecz nie danio przegowanego, który nie posiada kwantyfikowalnych drugorzędowych cech płciowych. Samice zachowują zdolność do wykształcania drugorzędowych męskich cech płciowych, gdy zostaną narażone na działanie androgennych substancji chemicznych w wodzie. W literaturze przedmiotu można znaleźć kilka badań, które dokumentują tego rodzaju reakcję u strzebli wielkogłowej (20) i ryżanki (21). Zmniejszenie nasilenia drugorzędowych cech płciowych u samców należy interpretować ostrożnie ze względu na niską wartość mocy statystycznej, opierając się na specjalistycznej opinii i wadze dowodów. Istnieją ograniczenia w zakresie wykorzystania danio przegowanego w tym badaniu ze względu na brak kwantyfikowalnych drugorzędowych cech płciowych, które reagują na substancje chemiczne o działaniu androgennym.
8. W przypadku strzebli wielkogłowej głównym wskaźnikiem egzogennej narażenia na działanie androgenne jest liczba guzków godowych na pysku samic ryb. W przypadku ryżanki liczba procesów tworzenia się brodawek stanowi główny marker egzogennej narażenia samic ryb na substancje chemiczne o działaniu androgennym. W dodatkach 5A i 5B wskazano zalecane procedury, które należy stosować do oceny cech płciowych odpowiednio u strzebli wielkogłowej i ryżanki.
9. W ramach 21-dniowego badania ryb przeprowadza się ilościową ocenę wytwarzania jaj oraz zachowuje się gonady na potrzeby ewentualnej analizy histopatologicznej. Niektóre organy regulacyjne mogą ustanowić wymóg stosowania takiego dodatkowego punktu końcowego, aby zapewnić możliwość przeprowadzenia bardziej kompletnej oceny sprawności rozrodczej zwierząt doświadczalnych lub w przypadkach, gdy witellogenina i drugorzędowe cechy płciowe nie reagują na narażenie na działanie substancji chemicznej. Choć niektóre punkty końcowe mogą mieć wysoce diagnostyczny charakter (np. indukcja VTG u samców i tworzenie się guzków u samic), nie wszystkie punkty końcowe (np. płodność i histopatologia gonad) wykorzystywane w badaniu mają w założeniu umożliwić jednoznaczną identyfikację określonych mechanizmów oddziaływania komórkowego. Zestaw punktów końcowych, traktowanych zbiorczo, zapewnia możliwość wyciągnięcia pewnych wniosków dotyczących potencjalnych zaburzeń funkcjonowania układu hormonalnego i tym samym zapewnia wskazówki w zakresie prowadzenia dalszych badań. Choć płodność nie stanowi parametru specyficznego dla funkcjonowania układu hormonalnego, z uwagi na jej udowodnioną wrażliwość na znane substancje chemiczne zaburzające funkcjonowanie układu hormonalnego (5), stanowi ona istotny punkt końcowy, który należy wziąć pod uwagę, ponieważ jeżeli ten i pozostałe punkty końcowe pozostaną niezmienione, pozwoli to uzyskać większy poziom pewności co do tego, że dany związek chemiczny prawdopodobnie nie zaburzy funkcjonowania układu hormonalnego. Jeżeli jednak odnotowany zostanie wpływ na płodność, będzie to miało istotne znaczenie dla wniosków wyciągniętych na podstawie wagi dowodów. Wytyczne w zakresie interpretacji danych i przyjmowania wyników badań przedstawiono w dalszej części niniejszej metody badawczej.
10. Definicje stosowane w niniejszej metodzie badawczej przedstawiono w dodatku 1.

ZASADA BADANIA

11. W trakcie badania samce i samice ryb w stanie reprodukcyjnym poddaje się wspólnie narażeniu w naczyniach badawczych. Ich status osobników dorosłych oraz ich stan reprodukcyjny pozwalają na wyraźne rozróżnienie płci, a tym samym na przeprowadzenie związanej z płcią analizy każdego punktu końcowego, jak również zapewniają wrażliwość na egzogenne substancje chemiczne. Po zakończeniu badania płęć potwierdza się w badaniu makroskopowym gonad po otwarciu brzucha wzdłuż linii środkowej za pomocą nożyczek. Przegląd odpowiednich warunków testu biologicznego przedstawiono w dodatku 2. Badanie zwykle rozpoczyna się od

pobrania próbki ryb z populacji w okresie tarła; nie należy wykorzystywać starzejących się zwierząt. Wytyczne dotyczące wieku ryb i stanu reprodukcyjnego podano w części dotyczącej wyboru ryb. Badanie przeprowadza się z zastosowaniem trzech stężeń ekspozycyjnych, jak również próby kontrolnej z wodą oraz, w razie potrzeby, próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem. W przypadku danio pręgowanego stosuje się dwa naczynia lub kontrpróby na zabieg (każde naczynie zawiera 5 samców i 5 samic). W przypadku strzebli wielkogłowej stosuje się cztery naczynia lub kontrpróby na zabieg (każde naczynie zawiera 2 samce i 4 samice). Służy to odzwierciedleniu zachowania terytorialnego samców strzebli wielkogłowej, przy równoczesnym utrzymaniu wystarczającej mocy testu. W przypadku ryżanki stosuje się cztery naczynia lub kontrpróby na zabieg (każde naczynie zawiera 3 samce i 3 samice). Narażenie trwa 21 dni, a pobieranie próbek ryb odbywa się w 21. dniu narażenia. Pomiar płodności w ujęciu ilościowym przeprowadza się codziennie.

12. Po pobraniu próbek w 21. dniu wszystkie zwierzęta uśmierca się w sposób humanitarny. Drugorzędowe cechy płciowe mierzy się u strzebli wielkogłowej i ryżanki (zob. dodatek 5A i dodatek 5B); próbki krwi pobiera się w celu oznaczenia VTG u danio pręgowanego i strzebli wielkogłowej, ewentualnie można pobrać głowę/ogon w celu oznaczenia VTG u danio pręgowanego (dodatek 6); w celu analizy VTG u ryżanki pobiera się wątrobę (dodatek 6); gonady utrwała się w całości albo poddaje się je sekcji na potrzeby ewentualnej analizy histopatologicznej (22).

KRYTERIA DOPUSZCZALNOŚCI BADANIA

13. Aby wyniki badania były dopuszczalne, muszą zostać spełnione następujące warunki:
- upadkowość w próbach kontrolnych z wodą (lub rozpuszczalnikiem) nie powinna przekraczać 10 procent na koniec okresu narażenia;
 - stężenie rozpuszczonego tlenu powinno wynosić co najmniej 60 procent wartości nasycenia powietrzem (ASV) w trakcie okresu narażenia;
 - różnica temperatury wody między naczyniami badawczymi przez cały okres narażenia nie może być większa niż $\pm 1,5$ °C i musi być utrzymywana w obrębie 2 °C w zakresie temperatur określonym w odniesieniu do gatunku doświadczalnego (dodatek 2);
 - powinny być dostępne dowody pozwalające wykazać, że stężenia badanej substancji chemicznej w roztworze utrzymano w granicach ± 20 % średnich wartości pomiarowych;
 - powinny być dostępne dowody świadczące o aktywnym wylęgu we wszystkich kontrpróbach przed narażeniem na działanie substancji chemicznej oraz w kontrpróbach kontrolnych w trakcie badania.

OPIS METODY

Aparatura

14. Zwykły sprzęt laboratoryjny, w szczególności:
- a) mierniki tlenu i pehametry;
 - b) sprzęt do oznaczania twardości i zasadowości wody;
 - c) odpowiednia aparatura do pomiaru temperatury, zalecane jest stałe monitorowanie;
 - d) zbiorniki wykonane z chemicznie obojętnego materiału o odpowiedniej objętości w zależności od zalecanego obciążenia i obsady (zob. dodatek 2);
 - e) podłoże tarłowe dla strzebli wielkogłowej i danio pręgowanego, niezbędne informacje szczegółowe podano w dodatku 4;
 - f) waga o odpowiedniej dokładności (tj. dokładności do $\pm 0,5$ mg).

Woda

15. Badanie można przeprowadzić w każdej wodzie, w której gatunki doświadczalne wykazują odpowiednie długoterminowe przeżycie i wzrost. Powinna mieć ona stałą jakość w okresie trwania badania. Wartość pH wody powinna mieścić się w zakresie 6,5–8,5, lecz w trakcie danego badania powinna wynosić $\pm 0,5$ jednostek pH. Aby upewnić się, że woda rozcieńczająca nie będzie wpływała zbyt mocno na wyniki badania (np. na skutek kompleksowania badanej substancji chemicznej), należy okresowo pobierać próbki wody do analizy. Jeżeli wiadomo, że woda rozcieńczająca ma względnie stałą jakość, należy dokonywać pomiaru, np. co trzy miesiące, zawartości metali ciężkich (np. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd i Ni), głównych anionów i kationów (np. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- i SO_4^{2-}), pestycydów (np. całkowitej zawartości pestycydów fosforoorganicznych i chloroorganicznych), całkowitego węgla organicznego i zawiesiny. Jeśli można wykazać, że jakość wody była stała przez co najmniej rok, oznaczeń można dokonywać rzadziej i w większych odstępach czasu (np. co sześć miesięcy). Niektóre właściwości chemiczne dopuszczalnej wody rozcieńczającej wymieniono w dodatku 3.

Roztwory do badań

16. Roztwory do badań o wybranych stężeniach przygotowuje się przez rozcieńczenie roztworu podstawowego. Zalecane jest przygotowanie roztworu podstawowego przez zwykłe wymieszanie lub zbełtanie badanej substancji chemicznej w wodzie rozcieńczającej w sposób mechaniczny (np. za pomocą mieszadła lub ultradźwięków). Kolumny nasyceniowe (rozpuszczające) stosuje się w celu uzyskania odpowiednio stężonego roztworu podstawowego. Nie zaleca się stosowania nośnika rozpuszczalnikowego. W przypadku gdy rozpuszczalnik jest niezbędny, należy równolegle przeprowadzić próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem w tym samym stężeniu rozpuszczalnika, które zastosowano przy podaniach substancji chemicznej. W przypadku substancji chemicznych, których badanie nastęcza trudności, rozpuszczalnik można stanowić najlepsze rozwiązanie z technicznego punktu widzenia; należy zapoznać się z wytyczną OECD „Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures” (23). Wybór rozpuszczalnika będzie uwarunkowany właściwościami chemicznymi danej substancji lub mieszaniny. W wytycznych OECD zaleca się maksymalne stężenie 100 $\mu\text{l/l}$, które należy zachować. W ostatnim przeglądzie (24) podkreślono jednak dodatkowe obawy związane ze stosowaniem rozpuszczalników do badania funkcjonowania układu hormonalnego. W związku z tym zaleca się, aby w razie konieczności minimalizować stężenie rozpuszczalnika, jeżeli tylko jest to technicznie wykonalne (w zależności od właściwości fizykochemicznych badanej substancji chemicznej).
17. Zastosowany zostanie przepływowy układ badawczy. System taki ciągle dozuje i rozcieńcza roztwór podstawowy badanej substancji chemicznej (np. pompa dozująca, rozcieńczalnik proporcjonalny, układ nasycalnika) do przesyłania szeregu stężeń do komór badawczych. W trakcie badania należy okresowo, najlepiej codziennie, sprawdzać natężenia przepływu roztworów podstawowych i wody rozcieńczającej, które przez cały czas trwania badania nie powinny różnić się o więcej niż 10 %. Należy starać się unikać stosowania rur z tworzywa sztucznego niskiej klasy lub innych materiałów, które mogą zwierać aktywne biologicznie substancje chemiczne. Podczas selekcji materiału do przepływowego układu badawczego należy rozważyć możliwość adsorpcji badanej substancji chemicznej do danego materiału.

Utrzymywanie ryb

18. Ryby doświadczalne należy wybrać z populacji laboratoryjnej, najlepiej z jednego stada, które przez co najmniej dwa tygodnie przed badaniem było aklimatyzowane w warunkach jakości wody i oświetlenia zbliżonych do stosowanych w badaniu. Ważne jest, aby wskaźnik obciążenia i obsada (definicje można znaleźć w dodatku 1) były odpowiednie dla gatunków doświadczalnych (zob. dodatek 2).
19. Po 48-godzinnym okresie adaptacji odnotowuje się upadkowość i zastosowanie mają następujące kryteria:
 - upadkowość przekracza 10 % populacji w ciągu siedmiu dni: należy odrzucić całą partię;
 - upadkowość na poziomie 5–10 % populacji: aklimatyzacja przez siedem dodatkowych dni; jeżeli upadkowość przekroczy 5 % w ciągu tych kolejnych siedmiu dni, należy odrzucić całą partię;
 - upadkowość mniejsza niż 5 % populacji w ciągu siedmiu dni: dopuszczyć partię.
20. Ryby nie powinny być leczone na żadną chorobę w okresie aklimatyzacji, w okresie poprzedzającym narażenie ani w okresie narażenia.

Okres poprzedzający narażenie i wybór ryb

21. Zaleca się tygodniowy lub dwutygodniowy okres poprzedzający narażenie, w którym zwierzęta umieszcza się w naczyniach podobnych do faktycznych naczyń użytych do badania. Ryby należy karmić *bez ograniczeń* przez cały okres trzymania i na etapie narażenia. Etap narażenia rozpoczyna się z wykorzystaniem dymorficznych płciowo dorosłych ryb z laboratoryjnego źródła zwierząt dojrzałych płciowo (np. o wyraźnych drugorzędowych cechach płciowych widocznych w przypadku strzebli wielkogłowej i ryżanki), które wykazują aktywność tarlową. Zgodnie z ogólną wytyczną (której nie należy stosować w oderwaniu od obserwacji rzeczywistego stanu reprodukcyjnego danej partii ryb) strzebli wielkogłowe powinny być w wieku około 20 tygodni (± 2 tygodnie), zakładając, że były hodowane w temperaturze 25 ± 2 °C przez całą długość życia. Ryżanki japońskie powinny być w wieku około 16 tygodni (± 2 tygodnie), zakładając, że były hodowane w temperaturze 25 ± 2 °C przez całą długość życia. Danio pręgowane powinny być w wieku około 16 tygodni (± 2 tygodnie), zakładając, że były hodowane w temperaturze 26 ± 2 °C przez całą długość życia. Ocenę wytwarzania jaj powinno się przeprowadzać na etapie poprzedzającym narażenie na działanie substancji. Zaleca się obserwację tarła we wszystkich zbiornikach z kontrolną próbą przed włączeniem go do etapu badania, na którym następuje narażenie na działanie substancji. Na tym etapie orientacyjne ustalenie pożądanej liczby jaj, jaka powinna zostać wytworzona każdego dnia, nie jest możliwe, ale z ogólnych obserwacji można wywnioskować, że średnia liczba jaj jest większa niż 10 jaj na samicę dziennie dla poszczególnych gatunków. Aby zapewnić równomierny rozkład kontrolnych prób, przy przypisywaniu kontrolnych prób do poszczególnych poziomów doświadczalnych należy stosować układ bloków losowanych sporządzony w oparciu o dane dotyczące wytwarzania jaj.

PLAN BADANIA

22. Stosuje się trzy stężenia badanej substancji chemicznej, jedną próbę kontrolną (z wodą) i, w razie potrzeby, jedną próbę kontrolną z rozpuszczalnikiem. Dane można analizować w celu określenia statystycznie istotnych różnic między reakcjami w grupie badanej i grupie kontrolnej. Analizy te dostarczą informacji, czy wymagane jest dalsze długoterminowe badanie substancji chemicznej pod kątem działania niepożądanego (mianowicie wpływu na przeżycie, rozwój, wzrost i rozrodczość), czy też badanie takie ma służyć do wykorzystania w ocenie ryzyka (25).
23. W przypadku danio pręgowanego w 21. dniu doświadczenia pobiera się próbkę samców i samic z każdej grupy poddanej działaniu substancji chemicznej o określonym stężeniu (5 samców i 5 samic z każdej z dwóch kontrolnych) i z grup kontrolnych w celu dokonania pomiaru witellogeniny. W przypadku ryżanki w 21. dniu doświadczenia pobiera się próbkę samców i samic z każdej grupy poddanej działaniu substancji chemicznej o określonym stężeniu (3 samców i 3 samic z każdej z dwóch kontrolnych) i z grup kontrolnych w celu dokonania pomiaru witellogeniny i, w stosownych przypadkach, drugorzędowych cech płciowych. W przypadku strzebli wielkogłowej w 21. dniu narażenia pobiera się próbkę samców i samic (2 samce i 4 samice z każdej z czterech kontrolnych i z grup kontrolnych) w celu dokonania pomiaru witellogeniny i drugorzędowych cech płciowych. Należy przeprowadzić ilościową ocenę płodności, przy czym w stosownych przypadkach należy utrwalić tkanki gonad w całości lub poddać je sekcji do celów ewentualnej oceny histopatologicznej.

Dobór badanych stężeń

24. Do celów niniejszego badania najwyższym badanym stężeniem substancji chemicznej powinna być wartość maksymalnego tolerowanego stężenia wyznaczonego w badaniu ustalającym zakres lub za pomocą innych danych dotyczących toksyczności, 10 mg/l albo wartość maksymalnej rozpuszczalności w wodzie, w zależności od tego, która wartość jest niższa. Maksymalne tolerowane stężenie definiuje się jako najwyższe badane stężenie substancji chemicznej, którego skutkiem jest upadkowość na poziomie poniżej 10 %. Przy zastosowaniu tego podejścia zakłada się istnienie empirycznych danych dotyczących przypadków ostrej toksyczności lub innych danych dotyczących toksyczności, na podstawie których można oszacować maksymalne tolerowane stężenie. Oszacowanie MTC może być niedokładne i zazwyczaj wymaga jeszcze oceny specjalistów.
25. Wymagane są trzy badane stężenia, które różnią się o taką samą wielokrotność nieprzekraczającą 10, oraz próba kontrolna z wodą rozcieńczającą (oraz, w razie potrzeby, z rozpuszczalnikiem). Zaleca się krotność odstępu wynoszącą od 3,2 do 10.

PROCEDURA

Wybór i ważenie ryb doświadczalnych

26. Istotne jest, aby zminimalizować zmienność masy ryb na początku badania. Odpowiedni zakres wielkości dla różnych gatunków zalecanych do wykorzystania w tym badaniu podano w dodatku 2. W odniesieniu do całej partii ryb wykorzystanych w badaniu zakres poszczególnych mas samców i samic ryb na początku badania należy w miarę możliwości utrzymać w zakresie $\pm 20\%$ średniej arytmetycznej masy dla tej samej płci. Zaleca się zważenie próbki ze stada ryb przed rozpoczęciem badania w celu oszacowania średniej masy.

Warunki narażenia na działanie substancji*Czas trwania*

27. Czas trwania badania, następujący po okresie poprzedzającym narażenie, wynosi 21 dni. Zalecany okres poprzedzający narażenie wynosi dwa tygodnie.

Karmienie

28. Ryby należy karmić *bez ograniczeń*, podając odpowiedni pokarm (dodatek 2), w porcjach wystarczających do utrzymania stanu zdrowia. Należy dołożyć starań, aby zapobiec rozwojowi mikroorganizmów i mętności wody. Zgodnie z ogólną wytyczną dzienną dawkę pokarmową można podzielić na dwie lub trzy równe porcje podawane w kilku posiłkach dziennie w odstępach co najmniej trzech godzin między poszczególnymi posiłkami. Dopuszczalna jest jedna większa dawka, w szczególności w weekendy. Karmienia ryb należy zaprzestać na 12 godzin przed pobraniem próbek/sekcją.
29. Paszę dla ryb należy ocenić pod kątem obecności zanieczyszczeń takich jak pestycydy chloroorganiczne, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), polichlorowane bifenyle (PCB). Należy unikać pokarmów o podwyższonej zawartości fitoestrogenów, które mogłyby wypaczyć reakcję w trakcie badania na znanego agonistę estrogenu (np. 17 β -estradiol).
30. Niespożyty pokarm i odchody należy usuwać z naczyń badawczych co najmniej dwa razy w tygodniu, np. ostrożnie czyszcząc dno każdego zbiornika za pomocą syfonu.

Światło i temperatura

31. Fotoperiod i temperatura wody powinny być odpowiednie dla gatunku doświadczalnego (zob. dodatek 2).

Częstotliwość oznaczeń i pomiarów analitycznych

32. Przed rozpoczęciem okresu narażenia należy upewnić się, że system podawania substancji chemicznej działa prawidłowo. Należy ustalić wszystkie potrzebne metody analityczne, w tym zgromadzić dostateczną wiedzę na temat stabilności chemicznej układu badawczego. W trakcie badania stężenia badanej substancji chemicznej oznacza się w regularnych odstępach czasu w następujący sposób: natężenia przepływu rozcieńczalnika i roztworu podstawowego substancji toksycznej należy sprawdzać najlepiej codziennie, a co najmniej dwa razy na tydzień, przy czym nie powinny one różnić się o więcej niż 10% przez cały czas trwania badania. Zaleca się, aby faktyczne stężenia badanej substancji chemicznej mierzyć we wszystkich naczyniach na początku badania, a następnie w odstępach tygodniowych.
33. Zaleca się, aby wyniki były oparte na mierzonych stężeniach. Jeżeli jednak stężenie badanej substancji chemicznej w roztworze można z powodzeniem utrzymywać w zakresie $\pm 20\%$ stężenia nominalnego przez cały czas trwania badania, wówczas wyniki mogą opierać się albo na wartościach nominalnych, albo na wartościach pomiarowych.

34. Próbkę mogą wymagać przefiltrowania (np. przez filtr z porami o średnicy 0,45 µm) lub odwirowania. Jeżeli jest to konieczne, wówczas zalecaną procedurą jest odwirowanie. Jeżeli jednak badany materiał nie ulega adsorpcji na filtrze, dopuszczalna jest też filtracja.
35. Podczas badania we wszystkich naczyniach badawczych co najmniej raz na tydzień należy zmierzyć stężenie rozpuszczonego tlenu, temperaturę i pH. Całkowitą twardość i zasadowość należy mierzyć w próbach kontrolnych i w jednym naczyniu przy najwyższym stężeniu co najmniej raz na tydzień. Zalecane jest stałe monitorowanie temperatury w co najmniej jednym naczyniu badawczym.

Obserwacje

36. W czasie trwania badania albo po jego zakończeniu ocenia się szereg reakcji ogólnych (np. przeżycie) i reakcji biologicznych (np. poziomy VTG). Należy codziennie monitorować płodność w ujęciu ilościowym. Procedurę pomiaru i oceny tych punktów końcowych i ich przydatność opisano poniżej.

Przeżycie

37. W okresie badania ryby należy badać codziennie i odnotowywać wszelkie przypadki śmiertelne, zaś martwe ryby należy jak najszybciej usuwać. Martwych ryb nie należy zastępować ani w naczyniu kontrolnym, ani w naczyniu z badaną substancją. Płeć ryb, które umierają w trakcie badania, należy ustalić poprzez makroskopową ocenę gonad.

Zachowanie i wygląd

38. Należy odnotować wszelkie przypadki nietypowego zachowania (w porównaniu z grupami kontrolnymi), które mogą obejmować oznaki ogólnej toksyczności, w tym hiperwentylację, nieskoordynowane pływanie, utratę równowagi i nietypowy spokój lub zerowanie. Dodatkowo należy odnotować anomalie zewnętrzne (takie jak krwotoki, sinica). Do takich oznak toksyczności należy podchodzić ostrożnie podczas interpretacji danych, ponieważ mogą one wskazywać na stężenia, przy których biomarkery aktywności hormonalnej nie są wiarygodne. Takie obserwacje zachowania mogą również dostarczyć przydatnych informacji jakościowych na potrzeby potencjalnych przyszłych wymogów dotyczących badań ryb. Na przykład zaobserwowano agresję terytorialną u normalnych samców lub zmaskulinizowanych samic strzebli wielkogłowej po narażeniu na substancję o działaniu androgennym; u danio przegowanego charakterystyczne zachowania związane z kryciem i tarłem po pojawieniu się światła o brzasku ulegają ograniczeniu lub zmniejszeniu wskutek narażenia na substancję o działaniu estrogennym i antyandrogennym.
39. Ponieważ niektóre aspekty wyglądu (przede wszystkim zabarwienie) mogą zmieniać się szybko w zależności od sposobu postępowania, ważne jest, aby obserwacje jakościowych dokonywać przed usunięciem zwierząt z układu badawczego. Jak wynika z dotychczasowych doświadczeń ze strzeblami wielkogłowymi, niektóre substancje chemiczne zaburzające funkcjonowanie układu hormonalnego mogą początkowo wywoływać zmiany w następujących cechach zewnętrznych: zabarwieniu ciała (jasne albo ciemne), wzorze zabarwienia (występowanie pionowych pręg) i kształcie ciała (głowa i obszar piersiowy). Dlatego też wygląd fizyczny ryb należy obserwować w trakcie badania i po jego zakończeniu.

Płodność

40. Rezultaty codziennych obserwacji ilościowych tarła powinny być zapisywane dla poszczególnych kontrprób. Dane dotyczące wytwarzania jaj powinny być zapisywane dla poszczególnych kontrprób w następującym formacie: liczba jaj / żywą samicę / dzień. Jaja będą codziennie usuwane z komór badawczych. W przypadku strzebli wielkogłowej i danio przegowanego podłoża tarłowe powinny zostać umieszczone w komorze badawczej, aby zapewnić rydom możliwość tarła w normalnych warunkach. W dodatku 4 przedstawiono dalsze szczegółowe informacje na temat zalecanych podłoży tarłowych dla danio przegowanego (dodatek 4A) i strzebli wielkogłowej (dodatek 4B). Zapewnienie podłoża tarłowego dla ryżanki nie jest konieczne.

Humanitarne uśmiercanie ryb

41. W 21. dniu, tj. po zakończeniu narażenia, ryby należy uśmiercić, podając im odpowiednie ilości tricainy (MS-222) (CAS 886-86-2) 100-500 mg/l buforowanej 300 mg/l NaHCO₃ (wodorowęglanu sodu, CAS 144-55-8) w celu ograniczenia podrażnienia błon śluzowych; następnie pobiera się próbki krwi lub tkanek w celu oznaczenia witellogeniny, jak wyjaśniono w części dotyczącej witellogeniny.

Obserwacja drugorzędowych cech płciowych

42. Niektóre substancje chemiczne zaburzające funkcjonowanie układu hormonalnego mogą wywoływać zmiany w wyspecjalizowanych drugorzędowych cechach płciowych (liczbie guzków godowych u strzebli wielkogłowej, procesie tworzenia się brodawek u samców ryżanki). Zwłaszcza substancje chemiczne o określonym charakterze działania mogą powodować nietypowe pojawianie się drugorzędowych cech płciowych u zwierząt przeciwnej płci; na przykład substancje będące agonistami receptorów androgenowych, takie jak trenbolon, metylotestosteron i dihydrotestosteron, mogą spowodować powstawanie u samic strzebli wielkogłowej widocznych guzków godowych lub tworzenie się brodawek u samic ryżanki (11, 20, 21). Odnotowano również, że agonisty receptorów estrogenowych mogą zmniejszać liczebność guzków godowych i wielkość wysięćki tłuszczowej na grzbiecie u dorosłych samców strzebli wielkogłowej (26, 27). Takie całościowe obserwacje morfologiczne mogą również dostarczyć przydatnych informacji ilościowych i jakościowych na potrzeby potencjalnych przyszłych wymogów dotyczących badań ryb. Liczbę i wielkość guzków godowych u strzebli wielkogłowej i procesów tworzenia się brodawek u ryżanki można określić ilościowo bezpośrednio albo, co jest bardziej praktycznym sposobem, u utrwalonych okazów. Zalecane procedury oceny drugorzędowych cech płciowych u strzebli wielkogłowej i ryżanki znaleźć odpowiednio w dodatkach 5A i 5B.

Witellogenina (VTG)

43. Krew pobiera się z tętnicy/żyły ogonowej za pomocą kapilary mikrohematokrytovej powlekaney heparyną lub ewentualnie przez nakłucie serca za pomocą strzykawki. W zależności od wielkości ryby objętość krwi, jaką można pobrać, wynosi zwykle 5–60 µl na osobnika w przypadku strzebli wielkogłowej i 5–15 µl na osobnika w przypadku danio przegowanego. Osocze oddziela się od krwi przez odwirowanie i przechowuje z inhibitorami proteaz w temperaturze -80 °C do czasu przeprowadzenia analizy pod kątem VTG. Alternatywnym źródłem tkanki do oznaczenia VTG u ryżanki będzie wątroba, zaś u danio przegowanego można wykorzystać homogenat głowy/ogona (dodatek 6). Pomiar VTG powinien opierać się na zweryfikowanej homologicznej metodzie ELISA, w której wykorzystuje się homologiczną normę VTG i homologiczne przeciwciała. Zaleca się stosowanie metody pozwalającej na wykrycie poziomów VTG wynoszących zaledwie kilka ng/ml osocza (lub ng/ml tkanki), co stanowi poziom tła w przypadku samców ryb nienarażonych na działanie substancji.
44. Kontrola jakości analizy poziomu VTG zostanie przeprowadzona z wykorzystaniem norm, prób ślepych i przynajmniej analiz powtórnych. W przypadku każdej metody ELISA należy przeprowadzić test na wpływ matrycy (wpływ rozcieńczenia próbki) w celu oznaczenia minimalnego współczynnika rozcieńczenia próbki. Każda płytka do testu ELISA wykorzystana do badań VTG powinna zawierać następujące próbki kontroli jakości: co najmniej 6 wzorców kalibracyjnych obejmujących zakres oczekiwanych stężeń VTG i co najmniej jedną niespecyficzną, wiążącą próbę ślepą badania (poddawaną analizom powtórny). Absorbancja tych prób ślepych powinna wynosić poniżej 5 % maksymalnej absorbancji wzorca kalibracyjnego. Analizę przeprowadza się dla co najmniej dwóch podwielokrotności (zduplikowane dołki) każdej rozcieńczonej próbki. Zduplikowane dołki, które różnią się o więcej niż 20 %, należy poddać ponownej analizie.
45. Współczynnik korelacji (R^2) w przypadku krzywych wzorcowych powinien być wyższy niż 0,99. Wysoka korelacja nie jest jednak wystarczająca, aby zagwarantować odpowiednią prognozę stężenia we wszystkich zakresach. Oprócz wystarczająco wysokiej korelacji dla krzywej wzorcowej stężenie każdego wzorca, obliczone na podstawie krzywej kalibracyjnej, powinno mieścić się w przedziale 70–120 % stężenia nominalnego. Jeżeli stężenia nominalne oddalają się od kalibracyjnej linii regresji (np. przy niższych stężeniach), konieczny może być podział krzywej wzorcowej na zakresy niskie i wysokie lub zastosowanie modelu nieliniowego, aby odpowiednio dopasować dane dotyczące absorbancji. Jeżeli krzywa zostanie podzielona, oba odcinki linii powinny mieć $R^2 > 0,99$.
46. Granicę wykrywalności definiuje się jako najniższe stężenie wzorca analitycznego, a granicę oznaczalności definiuje się jako najniższe stężenie wzorca analitycznego pomnożone przez najniższy współczynnik rozcieńczenia.
47. Każdego dnia, w którym przeprowadza się badania VTG, analizie zostanie poddana próbka wzmocniona przygotowana z zastosowaniem międzylaboratoryjnego wzorca referencyjnego (dodatek 7). Stosunek oczekiwanego stężenia do zmierzonego stężenia zostanie odnotowany wraz z wynikami każdego zbioru badań przeprowadzonych w danym dniu.

Ocena badania histopatologicznego gonad

48. Organy regulacyjne mogą ustanowić wymóg przeprowadzenia badania histopatologicznego gonad w celu zbadania organu docelowego wzdłuż osi podwzgórze-przysadka-gonady po narażeniu na działanie substancji chemicznej. W tym względzie gonady utrwała się wraz z resztą ciała albo wycina się je. W przypadku konieczności przeprowadzenia badania histopatologicznego w ramach oceny wpływu badanej substancji chemicznej na układ hormonalny poszukuje się konkretnych związków związanych z układem hormonalnym reakcji odnotowywanych w gonadach. Wspomniane reakcje diagnostyczne zasadniczo obejmują występowanie oocytów androgennych, hiperplazję komórek Leydiga, obniżenie sprawności żółtka, wzrost liczby spermatozoniów i hiperplazję folikuliny. Inne zmiany patologiczne gonad, takie jak atrezja oocytów, degeneracja jąder oraz zmiany cyklu, mogą mieć różne przyczyny. W wytycznych dotyczących histopatologii gonad ryb określono procedury, jakie należy stosować przy wycinaniu, utrwalaniu i sekcji gonad oraz przy przeprowadzaniu oceny histopatologicznej gonad (22).

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Ocena reakcji biomarkerów za pomocą analizy wariancji (ANOVA)

49. W celu zidentyfikowania potencjalnego działania substancji chemicznej porównuje się reakcje grup badanych i grup kontrolnych z zastosowaniem analizy wariancji (ANOVA). W przypadku wykorzystania próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem należy przeprowadzić odpowiedni test statystyczny dla próby kontrolnej z wodą rozcieńczającą i próby kontrolnej z rozpuszczalnikiem w odniesieniu do każdego punktu końcowego. Wytyczne dotyczące wykorzystania danych dotyczących kontroli z wodą rozcieńczającą i kontroli z rozpuszczalnikiem w późniejszej analizie statystycznej można znaleźć w OECD, 2006c (28). Wszystkie dane na temat reakcji biologicznej należy analizować i odnotowywać oddzielnie dla każdej płci. Jeśli wymagane założenia dotyczące metod parametrycznych nie zostaną spełnione – rozkład nienormalny (np. test Shapiro-Wilka) lub niejednorodna wariancja (test Bartletta lub Levene'a), należy rozważyć przekształcenie danych w celu ujednorodnienia wariancji przed przeprowadzeniem ANOVA lub ważonej ANOVA. W przypadku niemonotonicznej zależności dawka-odpowiedź można zastosować test Dunnetta (parametryczny) wielokrotnych porównań w parach lub test Manna-Whitneya z korektą Bonferroniego (nieparametryczny). Inne testy statystyczne (np. test Jonckheere'a-Terpstra lub test Williamsa) można zastosować, jeżeli zależność dawka-odpowiedź jest w przybliżeniu monotoniczna. W dodatku 8 przedstawiono schemat statystyczny, który ma pomóc w wyborze najodpowiedniejszego testu statystycznego. Dodatkowe informacje można również znaleźć w dokumencie OECD „Document on Current Approaches to Statistical Analysis of Ecotoxicity Data” (28).

Sprawozdawczość w zakresie wyników testów

50. Dane dotyczące badania powinny obejmować poniższe informacje.

Placówka badawcza:

- szczegółowe informacje na temat odpowiedzialnych pracowników i ich obowiązków w zakresie badań;
- każde laboratorium powinno wykazać się biegłością w stosowaniu szeregu reprezentatywnych substancji chemicznych.

Badana substancja chemiczna:

- charakterystyka badanej substancji chemicznej;
- właściwości fizyczne i stosowne właściwości fizykochemiczne;
- metody i częstotliwości przygotowywania badanych stężeń;
- informacje dotyczące stabilności i biodegradowalności.

Rozpuszczalnik:

- charakterystyka rozpuszczalnika (charakter, wykorzystane stężenie);
- uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika (jeśli jest inny niż woda).

Zwierzęta doświadczalne:

- gatunek i szczerp;
- dostawca i określony zakład dostawcy;
- wiek ryb na początku badania i stan reprodukcyjny/okres tarła;
- szczegóły dotyczące procedur aklimatyzacji zwierząt;
- masa ciała ryb na początku okresu narażenia (na podstawie próbki ze stada ryb).

Warunki badania:

- zastosowana procedura badawcza (rodzaj badania, wskaźnik obciążenia, obsada itd.);
- metoda przygotowania roztworów podstawowych i natężenie przepływu;
- badane stężenia nominalne, mierzone cotygodniowo stężenia roztworów do badań i zastosowana metoda analityczna, średnie wartości pomiarowych oraz odchylenia standardowe w naczyniach badawczych, a także dowody świadczące o tym, że pomiary odnoszą się do stężeń badanej substancji chemicznej w rzeczywistym roztworze;
- charakterystyka wody rozcieńczającej (w tym pH, twardość, zasadowość, temperatura, stężenie rozpuszczonego tlenu, poziom chloru resztkowego, całkowity węgiel organiczny, zawiesina i wszelkie inne wykonane pomiary);
- Jakość wody w naczyniach badawczych: pH, twardość, temperatura i stężenie rozpuszczonego tlenu;
- szczegółowe informacje dotyczące karmienia (np. rodzaj pokarmu, źródło, podana ilość i częstotliwość podawania oraz analiza pod kątem odpowiednich zanieczyszczeń (np. PCB, WWA oraz pestycydów chloroorganicznych), jeżeli jest dostępna).

Wyniki

- dowody świadczące o tym, że próby kontrolne spełniają kryteria dopuszczalności badania;
- dane na temat upadkowości w dowolnym z badanych stężeń i prób kontrolnych;
- zastosowane techniki statystyczno-analityczne, przetwarzanie danych i uzasadnienie zastosowanych technik;
- dane dotyczące biologicznych obserwacji morfologii makroskopowej, z uwzględnieniem drugorzędowych cech płciowych, wytwarzania jaj i VTG;
- wyniki analiz danych, przedstawione najlepiej w formie tabelarycznej i graficznej;
- przypadki wszystkich nietypowych reakcji ryb i wszystkie widoczne efekty spowodowane przez badaną substancję chemiczną.

WYTYCZNE DOTYCZĄCE INTERPRETACJI I AKCEPTACJI WYNIKÓW BADANIA

51. W niniejszej części przedstawiono kilka kwestii, które należy uwzględnić przy interpretacji wyników badania w odniesieniu do różnych zmierzonych punktów końcowych. Wyniki te należy interpretować ostrożnie, ilekroć wydaje się, że badana substancja chemiczna powoduje widoczną toksyczność lub wpływa na ogólny stan zwierzęcia doświadczalnego.
52. Ustalając zakres badanych stężeń, należy dołożyć starań, aby nie przekroczyć maksymalnego tolerowanego stężenia i umożliwić wymierną interpretację danych. Ważne jest, aby otrzymać co najmniej jedną próbę poddaną narażeniu, w której nie ma oznak skutków toksycznych. Oznaki choroby i skutków toksycznych należy dokładnie ocenić i odnotować. Możliwe jest na przykład, że na wytwarzanie VTG u samic mogą również wpływać ogólna toksyczność i niehormonalne sposoby działania toksycznego, np. hepatotoksyczność. Interpretację skutków mogą jednak wzmocnić inne poziomy zabiegu, które nie są zakłócone przez toksyczność ogólnoustrojową.

53. Istnieje kilka aspektów, które należy rozważyć do celów akceptacji wyników badania. Jako wytyczną można przyjąć, że poziomy VTG w grupach kontrolnych samców i samic powinny być odmienne i powinny się różnić o około trzy rzędy wielkości w przypadku strzebli wielkogłowej i danio przegowanego oraz o około jeden rząd wielkości w przypadku ryżanki. Przykłady zakresu wartości osiąganych w grupach kontrolnych i badanych są dostępne w sprawozdaniach z weryfikacji (1, 2, 3, 4). Wysokie wartości VTG u samców w grupie kontrolnej mogą zakłócić czułość badania i jego zdolność do wykrywania słabych agonistów estrogeny. Niskie wartości VTG u samic w próbie kontrolnej mogą zakłócić czułość badania i jego zdolność do wykrywania inhibitorów aromatazy i agonistów estrogeny. Do opracowania tej wytycznej wykorzystano badania weryfikacyjne.
54. Jeżeli chodzi o ilościowy pomiar wytwarzania jaj, wskaźnik ten podlega istotnym wahaniom (wartość współczynnika zmienności (CV) może wahać się między 20 % a 60 %), co niekorzystnie odbija się na możliwości wykrycia znacznego spadku ilości wytwarzanych jaj, w przypadku gdy ilość ta jest mniejsza niż 70 %, w miarę jak wartość CV zbliża się do 50 % lub przekracza ten poziom. Jeżeli wartość CV utrzymuje się na niższym poziomie (około 20–30 %), uznaje się, że moc badania jest wystarczająca (80 %) do tego, by wykryć spadek liczby wytwarzanych jaj o 40–50 %. Plan badania stosowany w przypadku strzebli wielkogłowej, zgodnie z którym każdy poziom stężenia substancji bada się w zestawieniu z czterema podpróbami, powinien przyczynić się do zwiększenia mocy punktu końcowego dotyczącego płodności w porównaniu z planem badania zakładającym wykorzystanie zaledwie dwóch kontrprób.
55. Jeżeli laboratorium nie przeprowadzało jeszcze takiego badania albo wprowadzono istotne zmiany w badaniu (takie jak zmiana gatunku lub dostawcy ryb), zaleca się przeprowadzenie badania biegłości technicznej. Zaleca się stosowanie substancji chemicznych, które obejmują szereg sposobów działania lub wpływają na wiele punktów końcowych badania. W praktyce zachęca się każde laboratorium do zgromadzenia własnych danych historycznych dotyczących kontroli w odniesieniu do samców i samic oraz do przeprowadzenia kontroli dodatniej pod kątem działania estrogennego (np. 17β -estradiolu w stężeniu 100 ng/l lub znanego słabego agonisty), które prowadzi do podwyższenia poziomu VTG u samców ryb, kontroli dodatniej pod kątem inhibicji aromatazy (np. fadrozolu lub prochlorazu w stężeniu 300 μ g/l), które prowadzi do zmniejszenia poziomu VTG u samic ryb, oraz kontroli dodatniej pod kątem działania androgenowego (np. 17β -trenbolonu w stężeniu 5 μ g/l), które prowadzi do wykształcenia drugorzędowych cech płciowych u strzebli wielkogłowej i ryżanki. Aby zapewnić biegłość laboratorium, wszystkie te dane można porównać z danymi dostępnymi z badań walidacyjnych (1, 2, 3).
56. Zasadniczo pomiary VTG należy uznać za dodatnie, jeżeli występuje statystycznie istotny wzrost poziomu VTG u samców ($p < 0,05$) lub statystycznie istotny spadek poziomu u samic ($p < 0,05$) przynajmniej przy najwyższej badanej dawce w porównaniu z grupą kontrolną i przy braku oznak ogólnej toksyczności. Wynik dodatni jest poparty ponadto wykazaniem biologicznie wiarygodnej zależności między dawką i krzywą odpowiedzi. Jak już wspomniano, spadek poziomu VTG może nie mieć wyłącznie hormonalnego pochodzenia; wynik dodatni należy jednak zasadniczo interpretować jako dowód na działanie zaburzające funkcjonowanie układu hormonalnego *in vivo* i powinien on zwykle inicjować podjęcie działań w celu dalszego wyjaśnienia.
57. Organy regulacyjne mogą ustanowić obowiązek przeprowadzenia analizy histopatologicznej gonad, aby ocenić sprawność rozrodczą zwierząt doświadczalnych i aby zapewnić możliwość ocenienia wagi dowodów wyników badania. Przeprowadzenie badania histopatologicznego gonad może nie być konieczne w przypadku uzyskania dodatniego wyniku VTG albo dodatniego wyniku w odniesieniu do drugorzędowych cech płciowych (tj. wzrost lub spadek VTG lub indukcja drugorzędowych cech płciowych).

BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria OECD dotycząca badań i oceny nr 60, Paryż.
- (2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria OECD dotycząca badań i oceny nr 61, Paryż.
- (3) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria OECD dotycząca badań i oceny nr 78, Paryż.

- (4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. <http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects> (data uzyskania dostępu: 18/09/08).
- (5) Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. 15 grudnia 2007 r. Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych, Waszyngton DC. 104 s.
- (6) OECD (2008). Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 94, Paryż.
- (7) Sumpter J.P. i S. Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*; 103 supl. 7, s. 173–8 Review.
- (8) Pawlowski S., *et al.* (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology*; 68(3), s. 277–91.
- (9) Andersen L., *et al.* (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*; 76(3-4), s. 343–52.
- (10) Ankley G.T., *et al.* (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*; 67(1), s. 121–30.
- (11) Panter G.H., *et al.* (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. *Aquatic Toxicology*; 70(1), s. 11–21.
- (12) Parks L.G., *et al.* (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 123(2), s. 113–25.
- (13) Panter G.H., *et al.* (1999). Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG odniesienie do raportu z badania AQ001. CEFIC, Bruksela, Belgia.
- (14) Fenske M., *et al.* (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comp. Biochem. Phys. C* 129 (3), s. 217–232.
- (15) Holbech H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 130, s. 119–131.
- (16) Surralles, J. *et al.* (2002). Vitellogenin induction by 17b-estradiol and 17a-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 131, s. 531–539.
- (17) Brion F., *et al.* (2002). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; t. 21, s. 1699–1708.
- (18) Yokota H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4, s. 87–98.
- (19) Tatarazako N., *et al.* (2004). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50, s. 301–308.
- (20) Ankley G.T., *et al.* (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 22(6), s. 1350–60.

- (21) Seki M, *et al* (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on Medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; 23(3), s. 774–81.
 - (22) OECD (2010). Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 123, Paryż.
 - (23) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Publikacje na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa. Seria dotycząca badań i oceny. Nr 23. Paryż.
 - (24) Hutchinson T.H., *et al.* (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Review. Aquatic Toxicology*, 76, s. 69–92.
 - (25) Hutchinson T.H., *et al.* (2006b). Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as „signposts”, not „traffic lights”, in risk assessment. *Environmental Health Perspectives*; 114 suplement 1, s. 106–114.
 - (26) Miles-Richardson S.R., *et al.* (1999). Effects of waterborne exposure to 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 47, s. 129–145.
 - (27) Martinovic D., *et al.* (2008). Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, s. 478–488.
 - (28) OECD (2006c), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria dotycząca badań i oceny, nr 54, OECD, Paryż.
 - (29) US EPA (2008), Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay, 30 stycznia 2008 r., Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych, Waszyngton DC. 110 s.
 - (30) OECD (2012), *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters*, Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria dotycząca badań i oceny, nr 150, OECD, Paryż.
-

Dodatek 1

SKRÓTY I DEFINICJE

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

CV: współczynnik zmienności.

ELISA: test immunoenzymatyczny.

Oś HPG: oś podwzgórze–przysadka–gonady.

Wskaźnik obciążenia: mokra masa ryb na objętość wody.

MTC: maksymalne tolerowane stężenie, stanowiące około 10 % LC₅₀.

Obsada: liczba ryb na objętość wody.

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

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

Dodatek 2

WARUNKI DOŚWIADCZALNE BADANIA PRZESIEWOWEGO UKŁADU HORMONALNEGO RYB

1. Zalecany gatunek	Strzebla wielkogłowa (<i>Pimephales promelas</i>)	Ryżanka (<i>Oryzias latipes</i>)	Danio pęgowany (<i>Danio rerio</i>)
2. Rodzaj badania	Przepływowe	Przepływowe	Przepływowe
3. Temperatura wody	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Jakość oświetlenia	Fluorescencyjne żarówki (szerokie spektrum)	Fluorescencyjne żarówki (szerokie spektrum)	Fluorescencyjne żarówki (szerokie spektrum)
5. Światłość	10-20 μE/m ² /s, 540–1 000 luksów lub 50–100 ft-c (poziomy w laboratoryjnych warunkach otoczenia)	10-20 μE/m ² /s, 540–1 000 luksów lub 50–100 ft-c (poziomy w laboratoryjnych warunkach otoczenia)	10-20 μE/m ² /s, 540–1 000 luksów lub 50–100 ft-c (poziomy w laboratoryjnych warunkach otoczenia)
6. Fotoperiod (fazy brzasku/zmierzchu są fakultatywne, nie są jednak uważane za niezbędne)	16 godzin światła, 8 godzin bez dostępu światła	12–16 h światła, 12–8 h bez dostępu światła	12–16 h światła, 12–8 h bez dostępu światła
7. Wskaźnik obciążenia	<5 g na l	<5 g na l	<5 g na l
8. Wielkość komory badawczej	10 l (minimum)	2 l (minimum)	5 l (minimum)
9. Objętość roztworu do badań	8 l (minimum)	1,5 l (minimum)	4 l (minimum)
10. Wymiana objętości roztworów do badań	Minimum 6 razy dziennie	Minimum 5 razy dziennie	Minimum 5 razy dziennie
11. Wiek organizmów doświadczalnych	Zob. pkt 21	Zob. pkt 21	Zob. pkt 21
12. Przybliżona mokra masa dorosłych ryb (g)	Samice: 1,5 ± 20 % Samce: 2,5 ± 20 %	Samice: 0,35 ± 20 % Samce: 0,35 ± 20 %	Samice: 0,65 ± 20 % Samce: 0,4 ± 20 %
13. Liczba ryb na naczynie badawcze	6 (2 samce i 4 samice)	6 (3 samce i 3 samice)	10 (5 samców i 5 samic)
14. Liczba zabiegów	= 3 (oraz odpowiednie próby kontrolne)	= 3 (oraz odpowiednie próby kontrolne)	= 3 (oraz odpowiednie próby kontrolne)
15. Liczba naczyń na zabieg	Minimum 4	Minimum 4	Minimum 2
16. Liczba ryb na badane stężenie	16 dorosłych samic i 8 samców (4 samice i 2 samce w każdym naczyniu z kontrpróbą)	12 dorosłych samic i 12 samców (3 samice i 3 samców w każdym naczyniu z kontrpróbą)	10 dorosłych samic i 10 samców (5 samic i 5 samców w każdym naczyniu z kontrpróbą)

17. Schemat żywienia	Żywe lub zamrożone dorosłe solowce lub naupliusy dwa lub trzy razy dziennie (<i>bez ograniczeń</i>), pokarm dostępny na rynku lub połączenie obu wariantów	Naupliusy solowca dwa lub trzy razy dziennie (<i>bez ograniczeń</i>), pokarm dostępny na rynku lub połączenie obu wariantów	Naupliusy solowca dwa lub trzy razy dziennie (<i>bez ograniczeń</i>), pokarm dostępny na rynku lub połączenie obu wariantów
18. Napowietrzanie	Bez napowietrzania dopóki stężenie rozpuszczonego tlenu (DO) nie spadnie poniżej 60 % nasycenia	Bez napowietrzania dopóki stężenie rozpuszczonego tlenu (DO) nie spadnie poniżej 60 % nasycenia	Bez napowietrzania dopóki stężenie rozpuszczonego tlenu (DO) nie spadnie poniżej 60 % nasycenia
19. Woda rozcieńczająca	Czysta woda powierzchniowa, woda ze studni lub regenerowana lub odchlorowana woda wodociągowa	Czysta woda powierzchniowa, woda ze studni lub regenerowana lub odchlorowana woda wodociągowa	Czysta woda powierzchniowa, woda ze studni lub regenerowana lub odchlorowana woda wodociągowa
20. Okres poprzedzający narażenie	Zaleca się 7–14 dni	Zaleca się 7–14 dni	Zaleca się 7–14 dni
21. Czas trwania narażenia na substancję chemiczną	21 dni	21 dni	21 dni
22. Biologiczne punkty końcowe	— przeżycie — zachowanie — płodność — drugorzędowe cechy płciowe — VTG — opcjonalna histopatologia gonad	— przeżycie — zachowanie — płodność — drugorzędowe cechy płciowe — VTG — opcjonalna histopatologia gonad	— przeżycie — zachowanie — płodność — VTG — opcjonalna histopatologia gonad
23. Dopuszczalność badania	Rozpuszczony tlen ≥ 60 % nasycenia; średnia temperatura 25 ± 2 °C; 90 % przeżywalności ryb w próbach kontrolnych; zmierzone badane stężenia w granicach 20 % średnich wartości pomiarowych na każdy poziom podania substancji.	Rozpuszczony tlen ≥ 60 % nasycenia; średnia temperatura 25 ± 2 °C; 90 % przeżywalności ryb w próbach kontrolnych; zmierzone badane stężenia w granicach 20 % średnich wartości pomiarowych na każdy poziom podania substancji.	Rozpuszczony tlen ≥ 60 % nasycenia; średnia temperatura 26 ± 2 °C; 90 % przeżywalności ryb w próbach kontrolnych; zmierzone badane stężenia w granicach 20 % średnich wartości pomiarowych na każdy poziom podania substancji.

Dodatek 3

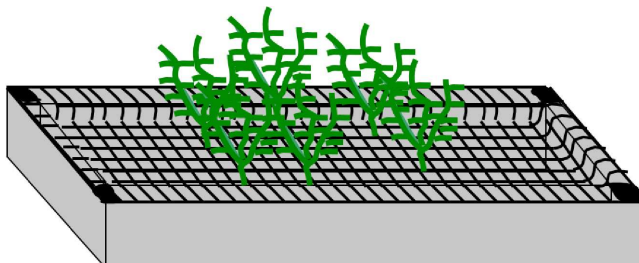
NIEKTÓRE WŁAŚCIWOŚCI CHEMICZNE DOPUSZCZALNEJ WODY ROZCIEŃZAJĄCEJ

SKŁADNIK	STĘŻENIA
Cząstki stałe	<20 mg/l
Całkowity węgiel organiczny	<2 mg/l
Niezjonizowany amoniak	<1 µg/l
Chlor resztkowy	<10 µg/l
Pestycydy fosforoorganiczne ogółem	<50 ng/l
Całkowita zawartość pestycydów chloroorganicznych oraz polichlorowanych bifenyli	<50 ng/l
Całkowity chlor organiczny	<25 ng/l

Dodatek 4A

PODŁOŻE TARŁOWE DLA DANIO PRĘGOWANEGO

Tacka na ikrę: naczynie na narzędzia w całości wykonane ze szkła na przykład o wymiarach $22 \times 15 \times 5,5$ cm ($D \times S \times W$), przykryte zdejmowaną pokrywą z siatki z drutu ze stali nierdzewnej (oczka o średnicy 2 mm). Siatka powinna przykrywać naczynie na narzędzia na poziomie poniżej brzegu.



Do siatki należy przymocować podłoże tarłowe. Powinno ono stworzyć strukturę, w którą mogą wpłynąć ryby. Odpowiednie są na przykład sztuczne rośliny akwariowe wykonane z zielonego tworzywa sztucznego (uwaga: należy uwzględnić możliwą adsorpcję badanej substancji chemicznej do tworzywa sztucznego). Należy wypłukać tworzywo sztuczne w wystarczającej ilości ciepłej wody przez wystarczająco długi czas, aby upewnić się, że żadne substancje chemiczne nie zostaną uwolnione do wody użytej do badania. W przypadku zastosowania materiałów szklanych należy dopilnować, aby ryby nie odniosły obrażeń ani nie były stłoczone w trakcie aktywności tarłowej.

Odległość między tacką i szklanymi szybkami powinna wynosić co najmniej 3 cm, aby upewnić się, że tarło nie odbywa się poza tacką. Jaja złożone na tackę spadają przez siatkę i po upływie 45–60 minut od rozpoczęcia naświetlania można pobrać próbki. Przezroczyste jaja nie są lepkie i można je łatwo policzyć, używając światła poprzecznego. Jeżeli zastosowano pięć samic na naczynie, liczebność jaj na poziomie do 20 dziennie można uznać za niską, do 100 za średnią i powyżej 100 za wysoką. Tackę na ikrę należy wyjąć, zebrać jaja, a następnie ponownie umieścić tackę w naczyniu badawczym jak najpóźniej wieczorem albo bardzo wczesnie rano. Czas do ponownego umieszczenia tacki nie powinien przekraczać jednej godziny, w przeciwnym razie bodźce z podłoża tarłowego mogą wywołać indywidualne tarło i złożenie ikry w nietypowym czasie. Jeżeli okoliczności wymagają późniejszego wprowadzenia tacki na ikrę, należy to zrobić co najmniej 9 godzin po rozpoczęciu naświetlania. O tak później porze dnia nie można już wywołać tarła.

Dodatek 4B

PODŁOŻE TARŁOWE DLA STRZEBLI WIELKOGŁOWEJ

Dwie lub trzy połączone płytki i tacki na ikrę wykonane z tworzywa sztucznego, ceramiczne, szklane lub ze stali nierdzewnej umieszcza się w każdej komórce badawczej (np. szara półkolistą rynną o długości 80 mm umieszczoną na tacce z krawędziami o długości 130 mm) (zob. rysunek). Wykazano, że odpowiednio przygotowane płytki z polichlorku winylu lub ceramiczne nadają się na podłoże tarłowe (Thorpe *et al.*, 2007).

Zaleca się, aby płytki były oszlifowane, w celu zapewnienia lepszej przyczepności. Tacka powinna być również osłonięta, aby ryby nie miały dostępu do złożonej ikry, chyba że wykazano wysoką przyczepność zastosowanego podłoża tarłowego dla ikry.



Podstawę zaprojektowano tak, aby pomieściła wszystkie jaja, które nie przyczepią się do powierzchni płytki i w związku z tym spadłyby na dno zbiornika (lub jaja złożone bezpośrednio na płaską podstawę z tworzywa sztucznego). Przed zastosowaniem wszystkie podłoża tarłowe należy płukać przez co najmniej 12 godzin w wodzie rozcieńczającej.

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Aquatic Toxicology*, 81, 90–98.

Dodatek 5A

OCENA DRUGORZĘDOWYCH CECH PŁCIOWYCH U STRZEBLI WIELKOGŁOWEJ W CELU WYKRYCIA OKREŚLONYCH SUBSTANCJI CHEMICZNYCH ZABURZAJĄCYCH FUNKCJONOWANIE UKŁADU HORMONALNEGO**Przegląd**

Potencjalnie istotne cechy wyglądu fizycznego osobników dorosłych strzebli wielkogłowej w badaniu substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego obejmują zabarwienie ciała (tj. jasne/ciemne), wzór zabarwienia (tj. występowanie lub brak pionowych pręg), kształt ciała (tj. kształt głowy i obszaru piersiowego, wydęcie jamy brzusznej) i wyspecjalizowane drugorzędowe cechy płciowe (tj. liczba i wielkość guzków godowych, wielkość wyściółki tłuszczowej na grzbiecie i pokładka).

Guzki godowe znajdują się na głowie (wyściółce grzbietowej) aktywnych rozrodczo samców strzebli wielkogłowej i zwykle układają się w dwustronny symetryczny wzór (Jensen *et al.* 2001). Samice z próby kontrolnej oraz młodociane samce i samice nie wykształcają guzków (Jensen *et al.* 2001). Wokół oczu i między nozdrzami samców może występować do ośmiu pojedynczych guzków. Największa liczba guzków i największe guzki są rozmieszczone w dwóch równoległych liniach tuż poniżej nozdrzy i powyżej otworu gębowego. U wielu ryb skupiska guzków występują poniżej dolnej szczęki; te, które znajdują się najbliżej otworu gębowego, zwykle występują jako pojedyncza para, zaś te znajdujące się bliżej brzucha mogą obejmować do czterech guzków. Faktyczna liczba guzków rzadko wynosi więcej niż 30 (zakres: 18–28; Jensen *et al.* 2001). Dominujące guzki (pod względem liczby) pojawiają się jako pojedyncze, względnie okrągłe struktury o wysokości w przybliżeniu równej promieniowi. U większości aktywnych rozrodczo samców przynajmniej niektóre guzki są powiększone i wyraźniejsze, tak że nie da się ich odróżnić jako pojedynczych struktur.

Niektóre rodzaje substancji chemicznych o działaniu zaburzającym funkcjonowanie układu hormonalnego mogą powodować nietypowe pojawianie się drugorzędowych cech płciowych u zwierząt przeciwnej płci; na przykład substancje będące agonistami receptora androgenowego, takie jak 17 α -metylotestosteron lub 17 β -trenbolon, mogą spowodować powstawanie u samic strzebli wielkogłowej guzków godowych (Smith 1974; Ankley *et al.* 2001; 2003), zaś agonisty receptorów estrogenu mogą obniżać liczbę guzków godowych u samców (Miles-Richardson *et al.* 1999; Harries *et al.* 2000).

Poniżej znajduje się opis charakterystyki guzków godowych u strzebli wielkogłowej opracowany na podstawie procedur stosowanych w laboratorium amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska w Duluth w stanie Minnesota. Poszczególne produkty lub sprzęt można zastąpić dostępnymi porównywalnymi materiałami.

Najlepszy ogląd otrzymuje się, stosując podświetlane szkło powiększające lub mikroskop zabiegowy 3X z podświetleniem. Ryby należy oglądać od strony grzbietowej i od przodu (głową w kierunku oglądającego).

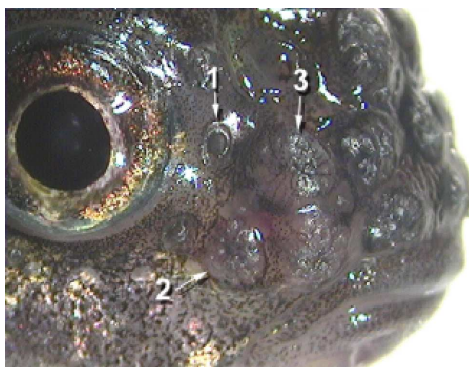
- Umieścić rybę na małej szalce Petriego (np. o średnicy 100 mm), głową do przodu i brzuchem do dołu. Ustawić wizjer tak, aby umożliwić identyfikację guzków. Delikatnie i powoli przekreślać rybę z jednej strony na drugą, aby zidentyfikować obszary z guzkami. Policzyć i ocenić guzki.
- Powtórzyć obserwację na powierzchni głowy po stronie brzusznej, umieszczając rybę na szalce Petriego na grzbiecie, głową do przodu.
- Obserwacje każdej ryby powinny trwać do 2 minut.

Liczenie i ocena guzków

Zidentyfikowano sześć konkretnych obszarów do oceny występowania i rozwoju guzków u osobników dorosłych strzebli wielkogłowej. Opracowano szablon na potrzeby określenia miejsca i liczby występujących guzków (zob. część końcowa niniejszego dodatku). Liczbę guzków zapisuje się, a ich wielkość można ocenić ilościowo dla każdego organizmu w następujący sposób: 0 – brak, 1 – występują, 2 – powiększone i 3 – wyraźne (rys. 1).

Ocena 0 – brak jakichkolwiek guzków. Ocena 1 – występują; identyfikuje się jako dowolne guzki z pojedynczym punktem, którego wysokość jest niemal równa promieniowi. Ocena 2 – powiększone; identyfikuje się za pomocą tkanki przypominającej wyglądem gwiazdkę, zwykle mające duży promień podstawy oraz wyżłobienia lub bruzdy wychodzące ze środka. Wysokość guzka jest zwykle bardziej nieregularna, czasami może on być lekko zaokrąglony. Ocena 3 – wyraźne; guzki są zwykle dość duże i zaokrąglone, o mniej określonej strukturze. Niekiedy guzki będą występowały razem, tworząc jednolitą masę wzdłuż jednego obszaru lub kilku obszarów (B, C i D, opisane poniżej). Zabarwienie i wzór są podobne jak w ocenie 2, czasami jednak trudno je rozróżnić. Zastosowanie tego systemu oceny zwykle prowadzi do otrzymania łącznej oceny guzków wynoszącej <50 u normalnych samców z próby kontrolnej posiadających 18–20 guzków (Jensen *et al.* 2001).

Rysunek 1



Faktyczna liczba guzków u niektórych ryb może być większa niż liczba rubryk w szablonie dla danego obszaru oceny. Jeżeli tak się stanie, dodatkowe punkty oceny można zaznaczyć w rubryce bądź na prawo lub na lewo od niej. Szablon nie musi być zatem symetryczny. Dodatkową techniką mapowania guzków, które są połączone w pary lub połączone pionowo wzdłuż poziomej płaszczyzny otworu gębowego, może być podwójne zaznaczanie dwóch punktów oceny guzków w jednej rubryce.

Obszary mapowania:

A – Guzki zlokalizowane wokół oka. Mapowane od strony grzbietowej do strony brzusznej wokół przedniej krawędzi oka. Licznie i powszechnie występują u dorosłych samców z próby kontrolnej, nie występują u samic z próby kontrolnej, a u samic narażonych na działanie androgenów zwykle występują w parach (po jednej w pobliżu każdego oka) lub pojedynczo.

B-Guzki zlokalizowane między nozdrzami (porami kanałów sensorycznych). Zwykle występują w parach u samców z próby kontrolnej na wyższych poziomach rozwoju (2 – powiększone lub 3 – wyraźne). Nie występują u samic z próby kontrolnej, u samic narażonych na działanie androgenów występują i rozwijają się w pewnym stopniu.

C – Guzki zlokalizowane bezpośrednio z przodu nozdrzy, równoległe do otworu gębowego. Zwykle są powiększone lub wyraźne u dojrzałych samców z próby kontrolnej. Występują lub powiększone u mniej rozwiniętych samców lub samic poddanych działaniu androgenów.

D – Guzki zlokalizowane równoległe wzdłuż linii otworu gębowego. Zwykle oceniane jako rozwinięte u samców z próby kontrolnej. Brak u samic z próby kontrolnej, ale występują u samic narażonych na działanie androgenów.

E – Guzki zlokalizowane na dolnej szczęce, w pobliżu otworu gębowego, zwykle niewielkie i często występujące w parach. Różne u samców z próby kontrolnej lub badanej i samic z próby badanej.

F – Guzki zlokalizowane po stronie brzusznej w kierunku E. Zwykle małe i występujące w parach. Występują u samców z próby kontrolnej i samic poddanych działaniu androgenów.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 20:1276–1290.
- (2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17- β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22, s. 1350–1360.
- (3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol* 34, s. 3003–3011.

- (4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp Biochem Physiol C* 128, s. 127–141.
- (5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol* 59, s. 515–523.
- (6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol* 47, s. 129–145.
- (7) Smith RJF. 1974. Effects of 17 α -methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Can J Zool* 52, s. 1031–1038.

Szablon dot. guzków:

NR _____

Data _____

Wynik ogółem _____

Skala numeryczna

1-występują

2-powiększone

3-wyraźne

	A	X1	X1	X1	X1
--	---	----	----	----	----

	B	X1	X1	X1	X1
--	---	----	----	----	----

	C	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
	D	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1

		E	X1	X1
	F	X1	X1	X1

Dodatek 5B

OCENA DRUGORZĘDOWYCH CECH PŁCIOWYCH U RYŻANKI W CELU WYKRYCIA OKREŚLONYCH SUBSTANCJI CHEMICZNYCH ZABURZAJĄCYCH FUNKCJONOWANIE UKŁADU HORMONALNEGO

Poniżej opisano procedurę pomiaru procesów tworzenia się brodawek (*), które stanowią drugorzędowe cechy płciowe u ryżanki (*Oryzias latipes*).

- 1) Po wycięciu wątroby (dodatek 6) zwłoki umieszcza się w probówce stożkowej zawierającej około 10 ml 10-procentowej obojętnej formaliny buforowanej (głową do góry i ogonem do dołu). Jeżeli gonada jest utrwalona w roztworze innym niż 10-procentowa obojętne formalina buforowana, wykonać poprzeczne nacięcie zwłok między przednim obszarem płetwy odbytowej a odbytem za pomocą ostrza, uważając, aby nie uszkodzić gonopora i samej gonady (rys. 3). Umieścić ciało ryby od strony czaszki w roztworze utrwalającym w celu utrwalenia gonady, zaś stronę ogonową – w 10-procentowej obojętnej formalinie buforowanej, jak opisano powyżej.
- 2) Po umieszczeniu ciała ryby w 10-procentowej obojętnej formalinie buforowanej chwycić przedni obszar płetwy odbytowej pincetą i złożyć ją na około 30 sekund, tak aby płetwa odbytowa pozostała otwarta. Chwytnąc płetwę odbytową pincetą, ostrożnie złapać kilka promieni płetwy w przednim obszarze, uważając, aby nie zeskrobać procesów tworzenia się brodawek.
- 3) Po utrzymywaniu otwartej płetwy odbytowej przez około 30 sekund ciało ryby należy umieścić w 10-procentowej obojętnej formalinie buforowanej w temperaturze pokojowej do czasu dokonania pomiaru procesów tworzenia się brodawek (pomiar należy przeprowadzić po utrwalaniu przez co najmniej 24 godziny).

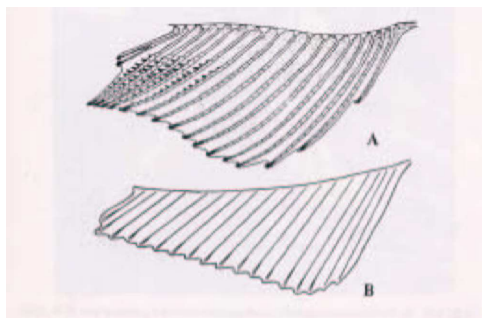
Pomiar

- 1) Po utrwaleniu ciała ryby w 10-procentowej obojętnej formalinie buforowanej przez co najmniej 24 godziny wyjąć zwłoki ryby z probówki stożkowej i wytrzeć formalinę bibułą filtracyjną (lub ręcznikiem papierowym).
- 2) Położyć rybę stroną brzuszną do góry. Następnie ostrożnie odciąć płetwę odbytową za pomocą małych nożyczek chirurgicznych (zaleca się odcięcie płetwy odbytowej wraz z niewielką ilością pterygioforu).
- 3) Chwycić przedni obszar odciętej płetwy odbytowej pincetą i umieścić na szkiełku z kilkoma kroplami wody. Następnie przykryć płetwę odbytową szkiełkiem nakrywkowym. Należy zachować ostrożność, aby nie zeskrobać procesów tworzenia się brodawek podczas chwytania płetwy odbytowej pincetą.
- 4) Policzyc płytki łączące, na których zachodzą procesy tworzenia się brodawek, za pomocą licznika pod mikroskopem biologicznym (mikroskopem dolnostolikowym lub odwróconym). Uznaje się, że zachodzą procesy tworzenia się brodawek, jeśli ich niewielkie skupisko jest widoczne na tylnym obrzeżu płytki łączącej. Zapisać liczbę płytek łączących, na których zachodzą procesy tworzenia się brodawek dla każdego promienia płetwy w karcie badania (np. pierwszy promień płetwy: 0, drugi promień płetwy: 10, trzeci promień płetwy: 12 itd.) i wpisać sumę tych liczb dla poszczególnych ryb do arkusza kalkulacyjnego Excel. W razie potrzeby zrobić zdjęcie płetwy odbytowej i policzyć liczbę płytek łączących, na których zachodzą procesy tworzenia się brodawek na zdjęciu.
- 5) Po dokonaniu pomiaru umieścić płetwę odbytową w probówce stożkowej opisanej w (1) i zachować.

(*) Procesy tworzenia się brodawek zwykle zachodzą wyłącznie u dorosłych samców na promieniach płetw od drugiego do siódmego lub ósmego, licząc od tylnego końca płetwy odbytowej (rys. 1 i 2). Procesy te rzadko zachodzą jednak na pierwszym promieniu płetwy od tylnego końca płetwy odbytowej. Niniejsza standardowa procedura operacyjna obejmuje pomiar procesów na pierwszym promieniu płetwy (numer promienia płetwy w niniejszej procedurze odpowiada ich kolejności, począwszy od tylnego końca płetwy odbytowej).

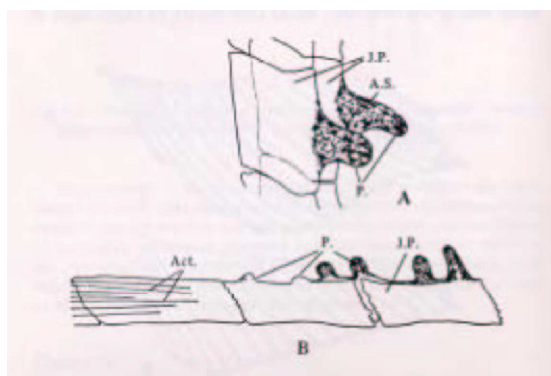
Rys. 1.

Schemat przedstawiający różnice w kształcie i wielkości płetwy odbytowej pomiędzy płciami. A – samiec; B – samica. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Uniwersytet w Tokio, IV, 2: s. 209–218.



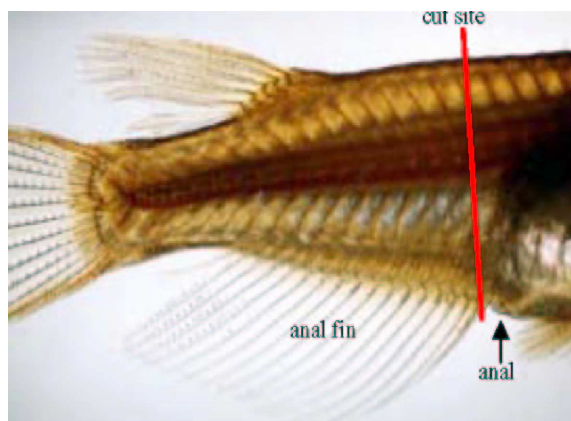
Rys. 2.

A – procesy zachodzące na płytkach łączących promienia płetwy odbytowej. J.P. – płytka łącząca (ang. joint plate); A.S. – przestrzeń między osiami (ang. axial space); P. – proces; B – tylny koniec promienia płetwy. Actinotrichia (Act.) znajdują się na zakończeniu. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Uniwersytet w Tokio, IV, 2: s. 209–218.



Rys. 3.

Zdjęcie ciała ryby przedstawiające miejsce odcięcia, w przypadku gdy gonada jest utrwalona w roztworze utrwalającym innym niż 10-procentowa obojętna formalina buforowana. W takim przypadku pozostała część ciała zostanie odcięta pomiędzy przednim obszarem płetwy odbytowej a odbytem za pomocą ostrza (czerwony pasek); część ciała ryby z głową zostanie umieszczona w roztworze utrwalającym dla gonad, natomiast część ciała ryby z ogonem zostanie umieszczona w 10-procentowej obojętnej formalinie buforowanej.



Dodatek 6

ZALECANE PROCEDURY POBIERANIA PRÓBEK DO CELÓW ANALIZY WITELLOGENINY

Należy dołożyć starań, aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu między próbkami VTG pobranymi od samców i samic.

Procedura 1A: Strzebla wielkogłowa, pobieranie krwi z żyły/tętnicy ogonowej

Po znieczuleniu trzon ogona nacina się częściowo ostrzem skalpela i pobiera się krew z żyły/tętnicy ogonowej za pomocą kapilary mikrohematokrytowej powlekaną heparyną. Po pobraniu krwi szybko izoluje się osocze przez odwirowanie przy 15 000 g przez 3 minuty (lub ewentualnie przy 15 000 g przez 10 minut w temperaturze 4 °C). W razie potrzeby po odwirowaniu można oznaczyć hematokryt wyrażony w procentach. Następnie usuwa się osocze z kapilary mikrohematokrytowej i przechowuje w probówce do wirówki z 0,13 jednostki aprotyny (inhibitor proteaz) w temperaturze – 80 °C, do czasu aż będzie można oznaczyć poziom VTG. W zależności od wielkości strzebli wielkogłowej (która jest zależna od płci) objętość osocza, jaką można pobrać, wynosi zwykle 5–60 mikrolitrów na rybę (Jensen *et al.* 2001).

Procedura 1B: Strzebla wielkogłowa, pobieranie krwi z serca

Krew można również ewentualnie pobrać przez nakłucie serca za pomocą heparynizowanej strzykawki (1 000 jednostek heparyny na ml). Krew przenosi się następnie do probówek Eppendorfa (trzymanych na lodzie) a następnie odwirowuje (5 min, 7 000 g, temperatura pokojowa). Osocze należy przenieść do czystych probówek Eppendorfa (w podwielokrotnościach, jeżeli pozwala na to objętość osocza) i niezwłocznie zamrozić w temperaturze – 80 °C do czasu przeprowadzenia analizy (Panter *et al.*, 1998).

Procedura 2A: Ryżanka japońska, wycięcie wątroby u ryżanki

Wyjęcie ryb doświadczalnych z komory badawczej

- 1) Ryby doświadczalne należy wyjąć z komory badawczej za pomocą małego podbieraka. Należy uważać, aby nie wrzucić ryb doświadczalnych do innych komór badawczych.
- 2) Zasadniczo ryby doświadczalne należy wyjmować w następującej kolejności: próba kontrolna, próba kontrolna z rozpuszczalnikiem (w stosownych przypadkach), próba z najniższym stężeniem, próba ze średnim stężeniem, próba z najwyższym stężeniem, próba z kontrolą dodatnią. Ponadto z jednej komory badawczej należy najpierw wyjąć wszystkie samce, a dopiero potem samice.
- 3) Płeć każdej z ryb doświadczalnych identyfikuje się na podstawie zewnętrznych drugorzędowych cech płciowych (np. kształtu płetwy odbytowej).
- 4) Rybę doświadczalną umieścić w pojemniku transportowym i przenieść do stanowiska badawczego w celu wycięcia wątroby. Sprawdzić poprawność etykiet komory badawczej i pojemnika transportowego oraz potwierdzić, że liczba ryb wyjętych z komory badawczej i liczba ryb pozostających w komorze jest zgodna z oczekiwaniami.
- 5) Jeżeli nie można zidentyfikować płci na podstawie wyglądu zewnętrznego ryby, wyjąć wszystkie ryby z komory badawczej. W takim przypadku płeć należy określić przez obserwację gonad lub drugorzędowych cech płciowych pod mikroskopem stereoskopowym.

Wycięcie wątroby

- 1) Przenieść ryby doświadczalne z pojemnika transportowego do roztworu środka znieczulającego za pomocą małego podbieraka.
- 2) Po znieczuleniu przenieść ryby doświadczalne na bibułę filtracyjną (lub ręcznik papierowy) za pomocą pincety (typu ogólnodostępnego). Chwytając ryby doświadczalne, przyłożyć pincetę do boków głowy, aby zapobiec złamaniu ogona.
- 3) Wyrzucić wodę na powierzchni ryb doświadczalnych bibułą filtracyjną (lub ręcznikiem papierowym).

- 4) Położyć rybę stroną brzuszną do góry. Następnie wykonać małe poprzeczne nacięcie w połowie odległości między brzuszным obszarem szyjnym a środkowym obszarem brzuszным za pomocą nożyczek chirurgicznych.
- 5) Włożyć nożyczki chirurgiczne do niewielkiego nacięcia i rozciąć jamę brzuszną od punktu ogonowego w kierunku pokrywy skrzelowej do odbytu od strony czaszki wzdłuż środkowej linii jamy brzusznej. Należy uważać, aby nie włożyć nożyczek chirurgicznych zbyt głęboko i nie uszkodzić wątroby i gonady.
- 6) Przeprowadzić następujące działania pod mikroskopem stereoskopowym.
- 7) Położyć rybę doświadczalną stroną brzuszną do góry na ręczniku papierowym (można również wykorzystać szklaną szalkę Petriego lub szkiełko mikroskopowe).
- 8) Rozszerzyć ściany jamy brzusznej pincetą precyzyjną i wyciągnąć organy wewnętrzne na zewnątrz. W razie potrzeby dopuszcza się również wyjęcie organów wewnętrznych przez usunięcie ściany jamy brzusznej z jednej strony.
- 9) Odsłonić połączoną część wątroby i pęcherzyka żółciowego za pomocą drugiej pincety precyzyjnej. Następnie chwycić przewód żółciowy i odciąć pęcherzyk żółciowy. Należy uważać, aby nie przerwać ściany pęcherzyka żółciowego.
- 10) Chwycić przełyk i odciąć przewód pokarmowy od wątroby w ten sam sposób. Należy uważać, aby zawartość przewodu pokarmowego nie rozlała się. Odciąć ogonową część przewodu pokarmowego od odbytu i usunąć przewód z jamy brzusznej.
- 11) Odciąć pas tłuszczu i innych tkanek od brzegów wątroby. Należy uważać, aby nie zadrapać wątroby.
- 12) Chwycić za przestrzeń wrotną wątroby za pomocą pincety precyzyjnej i wyjąć wątrobę z jamy brzusznej.
- 13) Położyć wątrobę na szkiełku. W razie potrzeby należy usunąć z powierzchni wątroby dodatkowy tłuszcz i tkankę obcą (np. powłoki jamy brzusznej) za pomocą pincety precyzyjnej.
- 14) Zmierzyć masę wątroby wraz z mikroprobówką o pojemności 1,5 ml jako tarą za pomocą elektronicznej wagi analitycznej. Odnotować wartość w karcie badania (odczyt: 0,1 mg). Potwierdzić informacje dotyczące identyfikacji na etykiecie umieszczonej na mikroprobówce.
- 15) Zamknąć mikroprobówkę z wątrobą. Przechowywać ją na statywie chłodzącym (lub w pudełku z lodem).
- 16) Po wycięciu jednej wątroby wyczyścić narzędzia chirurgiczne albo wymienić je na czyste.
- 17) Wyciąć wątroby wszystkich ryb znajdujących się w pojemniku transportowym zgodnie z powyższym opisem.
- 18) Po wycięciu wątrób ze wszystkich ryb znajdujących się w pojemniku transportowym (tj. wszystkich samców lub samic w komorze badawczej) umieścić wszystkie próbki wątroby na statywie z probówkami opatrzonymi etykietą do celów identyfikacji i przechowywać w zamrażarce. W przypadku gdy wątroby przekazuje się do obróbki wstępnej niedługo po wycięciu, przenosi się je do kolejnego stanowiska badawczego na statywie chłodzącym (lub w pudełku z lodem).

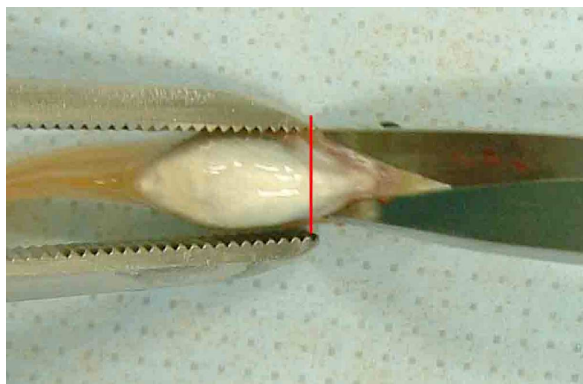
Po wycięciu wątroby zwłoki ryby można wykorzystać na potrzeby badania histologicznego gonad oraz w celu dokonania pomiaru drugorzędowych cech płciowych.

Próbka

Przechowywać próbki wątroby pobrane z ryb doświadczalnych w temperaturze ≤ -70 °C, jeżeli nie wykorzystuje się ich do obróbki wstępnej niedługo po wycięciu.

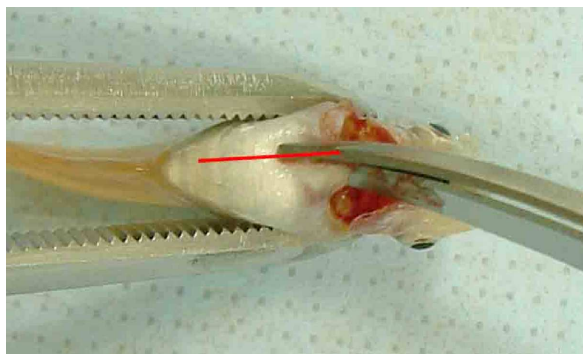
Rys. 1

Nacięcie nożyczkami wykonuje się tuż przed płetwami piersiowymi.



Rys. 2

Środkową linię brzucha nacina się nożyczkami do punktu znajdującego się około 2 mm od odbytu w kierunku czaszki.

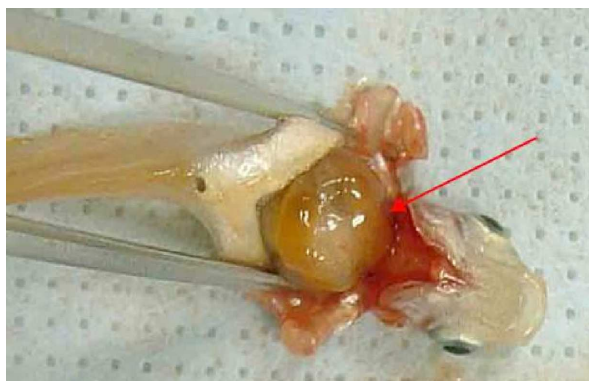


Rys. 3

Ściany jamy brzusznej rozszerza się szczypcami w celu odsłonięcia wątroby i innych organów wewnętrznych.

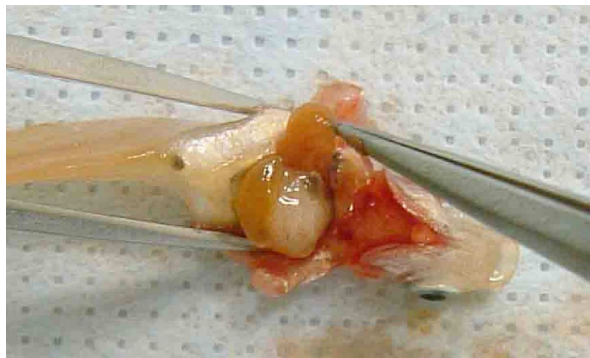
(Ewentualnie można przytrzymać ściany jamy brzusznej po bokach).

Strzałka wskazuje wątrobę.



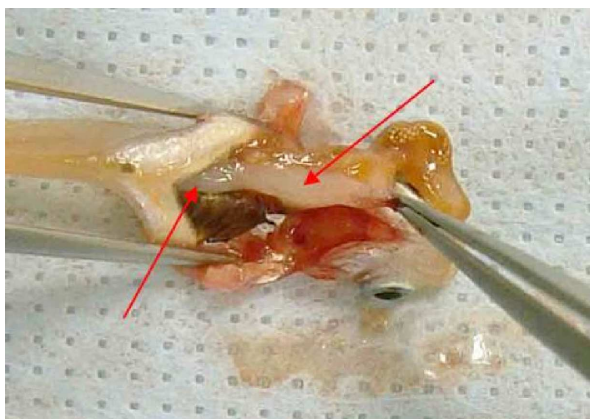
Rys. 4

Wątrobę wyraźnie się izoluje i wycina za pomocą szczypczyków.



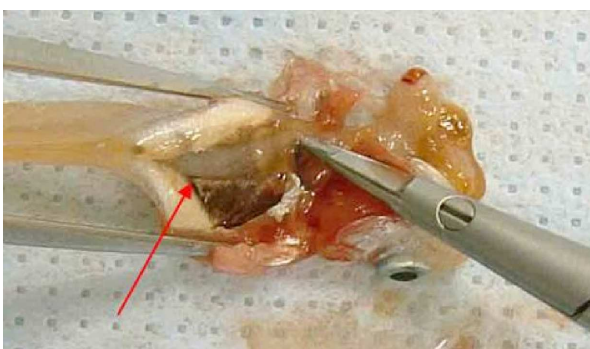
Rys. 5

Jelita delikatnie wyciąga się za pomocą szczypczyków.



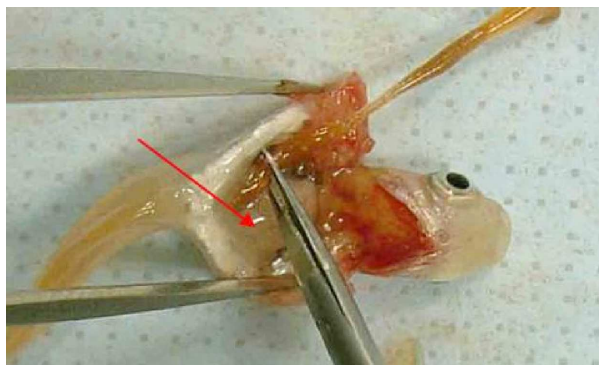
Rys. 6

Oba końce jelit i wszelkie przyczepy krezki odcina się za pomocą nożyczek.



Rys. 7 (*samica*)

W przypadku samicy stosuje się identyczną procedurę.



Rys. 8

Procedura zakończona.



Procedura 2B: Ryżanka japońska (*Oryzias latipes*), obróbka wstępna wątroby przed analizą poziomu witellogeniny.

Wziąć butelkę z roztworem buforowym do homogenizacji z zestawu ELISA i schłodzić ją kruszonym lodem (temperatura roztworu: ≤ 4 °C). W przypadku zastosowania roztworu buforowego do homogenizacji z układu EnBio ELISA rozmrozić roztwór w temperaturze pokojowej, a następnie schłodzić butelkę kruszonym lodem.

Obliczyć objętość roztworu buforowego do homogenizacji wątroby na podstawie jej masy (dodając 50 μ l roztworu buforowego do homogenizacji na 1 mg masy wątroby). Na przykład jeżeli masa wątroby wynosi 4,5 mg, objętość roztworu buforowego do homogenizacji wątroby wynosi 225 μ l. Przygotować listę objętości roztworu buforowego do homogenizacji dla wszystkich wątrób.

Przygotowanie wątroby do obróbki wstępnej

- 1) Bezpośrednio przed rozpoczęciem obróbki wstępnej wyjąć z zamrażarki mikroprobówkę o pojemności 1,5 ml zawierającą wątrobę.
- 2) Obróbkę wstępną wątroby pobranej od samców należy przeprowadzać przed obróbką wstępną wątroby pobranej od samic, aby zapobiec zanieczyszczeniu witellogeniną. Ponadto obróbkę wstępną badanych grup należy przeprowadzać w następującej kolejności: próba kontrolna, próba kontrolna z rozpuszczalnikiem (w stosownych przypadkach), próba z najniższym stężeniem, próba ze średnim stężeniem, próba z najwyższym stężeniem, próba z kontrolą dodatnią.

- 3) Liczba mikropróbówek o pojemności 1,5 ml z próbkami wątroby wyjętych jednorazowo z zamrażarki nie powinna przekraczać liczby, którą można odwirować w tym samym czasie.
- 4) Ułożyć mikropróbówki o pojemności 1,5 ml z próbkami wątroby na statywie chłodzącym w kolejności według numeru próbki (nie ma potrzeby rozmrażania wątroby).

Obróbka wstępna

1) Dodanie roztworu buforowego do homogenizacji

Sprawdzić na liście, jaką objętość roztworu buforowego do homogenizacji należy zastosować w przypadku danej próbki wątroby, i wyregulować mikropipetę (zakres objętości: 100–1000 μ l) do odpowiedniej objętości. Przymocować czystą końcówkę do mikropipety.

Pobrać roztwór buforowy do homogenizacji z butelki z odczynnikiem i dodać bufor do mikropróbówki o pojemności 1,5 ml zawierającej wątrobę.

Dodać roztwór buforowy do homogenizacji do wszystkich mikropróbówek o pojemności 1,5 ml zawierających wątrobę zgodnie z procedurą opisaną powyżej. Nie ma potrzeby zmieniać końcówki mikropipety na nową. Jeżeli jednak końcówka jest zanieczyszczona lub podejrzewa się, że jest zanieczyszczona, należy ją wymienić.

2) Homogenizacja wątroby

- Przymocować nowy tłuczek do homogenizacji do homogenizatora do mikropróbówek.
- Włożyć tłuczek do mikropróbówki o pojemności 1,5 ml. Przytrzymać homogenizator do mikropróbówek w taki sposób, aby zgnieść wątrobę między powierzchnią tłuczka a wewnętrzną ścianą mikropróbówki o pojemności 1,5 ml.
- Uruchomić homogenizator do mikropróbówek na 10–20 sekund. W tym czasie chłodzić mikropróbówkę o pojemności 1,5 ml kruszonym lodem.
- Wyjąć tłuczek z mikropróbówki o pojemności 1,5 ml i odstawić ją na około 10 sekund. Następnie przeprowadzić kontrolę wzrokową stanu zawiesiny.
- Jeżeli w zawieszynie widoczne są kawałki wątroby, powtórzyć działania (3) i (4), aby otrzymać zadowalający homogenat wątroby.
- Zawieszinę homogenatu wątroby chłodzić na statywie z lodem do czasu odwirowania.
- Do sporządzenia każdego homogenatu użyć nowego tłuczka.
- Przeprowadzić homogenizację wszystkich wątroób z roztworem buforowym do homogenizacji zgodnie z opisaną wyżej procedurą.

3) Odwirowanie zawiesiny homogenatu wątroby

- Upewnić się, że temperatura schłodzonej komory wirówki wynosi ≤ 5 °C.
- Włożyć mikropróbówki o pojemności 1,5 ml zawierające zawieszinę homogenatu wątroby do schłodzonej wirówki (w razie potrzeby wyważając).
- Odwirować zawieszinę homogenatu wątroby przy 13 000 g przez 10 min w temperaturze ≤ 5 °C. Jeżeli jednak supernatanty są właściwie oddzielone, moc i czas odwirowania można dostosować według potrzeb.
- Po odwirowaniu sprawdzić, czy supernatanty są odpowiednio oddzielone (powierzchnia: lipid, warstwa pośrednia: supernatant, warstwa dolna: tkanka wątroby). Jeżeli oddzielenie nie jest odpowiednie, ponownie odwirować zawieszinę w tych samych warunkach.
- Wyjąć wszystkie próbki ze schładzanej wirówki i ułożyć je na statywie z lodem w kolejności według numeru próbki. Należy uważać, aby po odwirowaniu żadna z oddzielonych warstw nie zawiesiła się ponownie.

4) Zbieranie supernatantu

- Umieścić cztery mikroprobówki do przechowywania supernatantu o pojemności 0,5 ml na statywie na probówce.
- Zebrać 30 μ l każdego supernatantu (oddzielonego jako warstwa pośrednia) za pomocą mikropipety i wprowadzić do jednej mikroprobówki o pojemności 0,5 ml. Należy uważać, aby nie zebrać lipidu z powierzchni ani tkanki wątroby z warstwy dolnej.
- Zebrać supernatant i wprowadzić do pozostałych dwóch mikroprobówek o pojemności 0,5 ml w sposób opisany powyżej.
- Zebrać pozostałą część supernatantu za pomocą mikropipety (jeżeli jest to możliwe: ≥ 100 μ l). Następnie wprowadzić supernatant do ostatniej mikroprobówki o pojemności 0,5 ml. Należy uważać, aby nie zebrać lipidu z powierzchni ani tkanki wątroby z warstwy dolnej.
- Zamknąć mikroprobówkę o pojemności 0,5 ml i zapisać na etykiecie objętość supernatantu. Następnie natychmiast schłodzić mikroprobówki na statywie z lodem.
- W przypadku każdego supernatantu wymienić końcówkę mikropipety na nową. Jeżeli do końcówki przyczepi się duża ilość lipidu, należy natychmiast wymienić ją na nową, aby zapobiec zanieczyszczeniu wyciągu z wątroby tłuszczem.
- Cały odwirowany supernatant wprowadzić do czterech mikroprobówek o pojemności 0,5 ml zgodnie z wyżej opisaną procedurą.
- Po wprowadzeniu supernatantu do mikroprobówek o pojemności 0,5 ml umieścić je wszystkie na statywie na probówce z etykietą identyfikacyjną, a następnie natychmiast zamrozić w zamrażarce. Jeżeli stężenia VTG mierzy się natychmiast po obróbce wstępnej, należy schłodzić jedną mikroprobówkę o pojemności 0,5 ml (zawierającą 30 μ l supernatantu) na statywie na probówce i przenieść do stanowiska badawczego, gdzie przeprowadza się test ELISA. W takim przypadku umieścić pozostałe mikroprobówki na statywach na probówce i zamrozić w zamrażarce.
- Po zebraniu supernatantu odrzucić pozostałości.

Przechowywanie próbek

Przechowywać mikroprobówki o pojemności 0,5 ml zawierające supernatant z homogenatu wątroby w temperaturze ≤ -70 °C do czasu wykorzystania ich w teście ELISA.

Procedura 3A: Danio pręgowany, pobieranie krwi z żyły/tętnicy ogonowej

Natychmiast po znieczuleniu trzon ogona nacina się poprzecznie i pobiera się krew z żyły/tętnicy ogonowej za pomocą kapilary mikrohematokrytowej powlekaną heparyną. Objętość krwi wynosi 5–15 mikrolitrów, w zależności od wielkości ryby. Do mikrokapilary dodaje się taką samą objętość roztworu buforowego aprotyniny (6 mikrogramów/ml w PBS), a osocze oddziela się od krwi przez odwirowanie (5 minut przy 600 g). Osocze zbiera się w probówkach badawczych i przechowuje w temperaturze -20 °C do czasu przeprowadzenia analizy pod kątem zawartości VTG lub innych białek, które są przedmiotem zainteresowania.

Procedura 3B: Danio pręgowany; pobranie krwi przez nakłucie serca

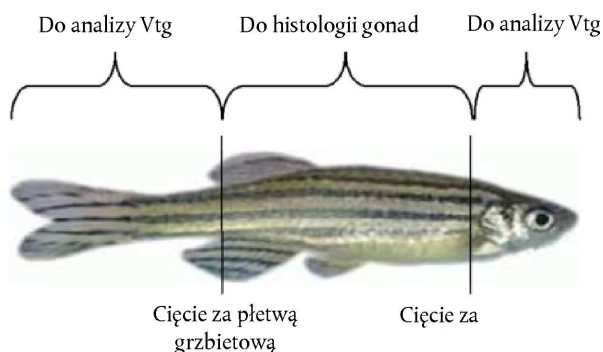
Aby zapobiec krzepnięciu krwi i degradacji białek, próbki pobiera się w roztworze chlorku sodu buforowanym fosforanami (PBS) zawierającym heparynę (1 000 jednostek/ml) i inhibitor proteazy aprotyninę (2 TIU/ml). Zaleca się, aby roztwór buforowy składał się z heparyny, soli amonowej i liofilizowanej aprotyniny. Do pobierania próbek krwi zaleca się używanie strzykawki (1 ml) z cienką igłą (np. Braun Omnikan-F). Strzykawkę należy wstępnie napęczyć roztworem buforowym (w przybliżeniu 100 mikrolitrów), aby w pełni eluować niewielkie objętości krwi z każdej ryby. Próbkę krwi pobiera się przez punkcję serca. Na początku rybę należy znieczulić za pomocą MS-222 (100 mg/l). Dzięki podaniu znieczulenia w odpowiedni sposób można rozpoznać bicie serca danio pręgowanego. Podczas nakłuwania serca delikatnie naciskać tłok strzykawki. Zakres objętości krwi do pobrania wynosi 20–40 mikrolitrów. Po nakłuciu serca wypełnić probówkę mieszaniną krwi i roztworu buforowego. Osocze oddziela się od krwi przez odwirowanie (20 min; 5 000 g) i należy je przechowywać w temperaturze -80 °C do czasu, aż będzie potrzebne do analizy.

Procedura 3C: Standardowa procedura operacyjna: Danio pręgowany, homogenizacja głowy i ogona

1. Ryby znieczuliła się i usypia zgodnie z opisem badania.
2. Głowę i ogon odcina się od ryby zgodnie z rys. 1.

Uwaga: Przyrządy do przeprowadzania sekcji i deskę do krojenia należy wypłukać i odpowiednio wyczyścić (np. za pomocą 96 % etanolu) przed obróbką każdej pojedynczej ryby w celu uniknięcia przeniesienia „zanieczyszczenia witellogeniny” z samic lub samców, u których VTG występuje, na samce, u których ona nie występuje.

Rysunek 1



3. Łączną masę głowy i ogona każdej z ryb mierzy się z dokładnością do pełnego miligrama.
4. Po zważeniu tych części umieszcza się je w odpowiednich probówkach (np. probówkach Eppendorfa o pojemności 1,5 ml) i zamraża w temperaturze $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do czasu homogenizacji albo bezpośrednio poddaje homogenizacji z lodem za pomocą dwóch tłuczków z tworzywa sztucznego. (Zastosować można również inne metody, pod warunkiem że stosując je, używa się lodu, i można uzyskać jednorodną masę). Uwaga: Probówki należy odpowiednio ponumerować, aby głowa i ogon danej ryby mogły zostać przypisane do odpowiadających im części ciała wykorzystywanych do histologii gonad.
5. Po uzyskaniu jednorodnej masy dodaje się 4-krotność wagi tkanki lodowatego **roztworu buforowego do homogenizacji** (*). Mieszaninę należy dalej rozdrabniać za pomocą tłuczków, dopóki nie stanie się jednorodna. Ważna uwaga: W przypadku każdej ryby wykorzystuje się nowe tłuczki.
6. Próbkę umieszcza się z lodem aż do odwirowania w temp. $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ przy 50 000 g przez 30 min.
7. Użyć pipety do wprowadzenia porcji supernatantu o objętości 20 μl do **co najmniej dwóch** probówek przez zanurzenie końcówki pipety pod znajdującą się na wierzchu warstwę tłuszczu i ostrożne zassanie supernatantu bez fragmentów tłuszczu lub grudek.
8. Do momentu wykorzystania próbki przechowuje się w temperaturze $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

(*) Roztwór buforowy do homogenizacji:

- (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1-proc. koktajl inhibitorów proteaz (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 μl koktajlu inhibitorów proteazy.
- TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), np. firmy Bie & Berntsen, Dania.
- Koktajl inhibitorów proteaz: firmy Sigma (w przypadku tkanek ssaków), numer produktu P 8340.

UWAGA: Roztwór buforowy do homogenizacji należy wykorzystać w tym samym dniu, w którym został wyprodukowany. Podczas stosowania należy umieścić go w lodzie.

Dodatek 7

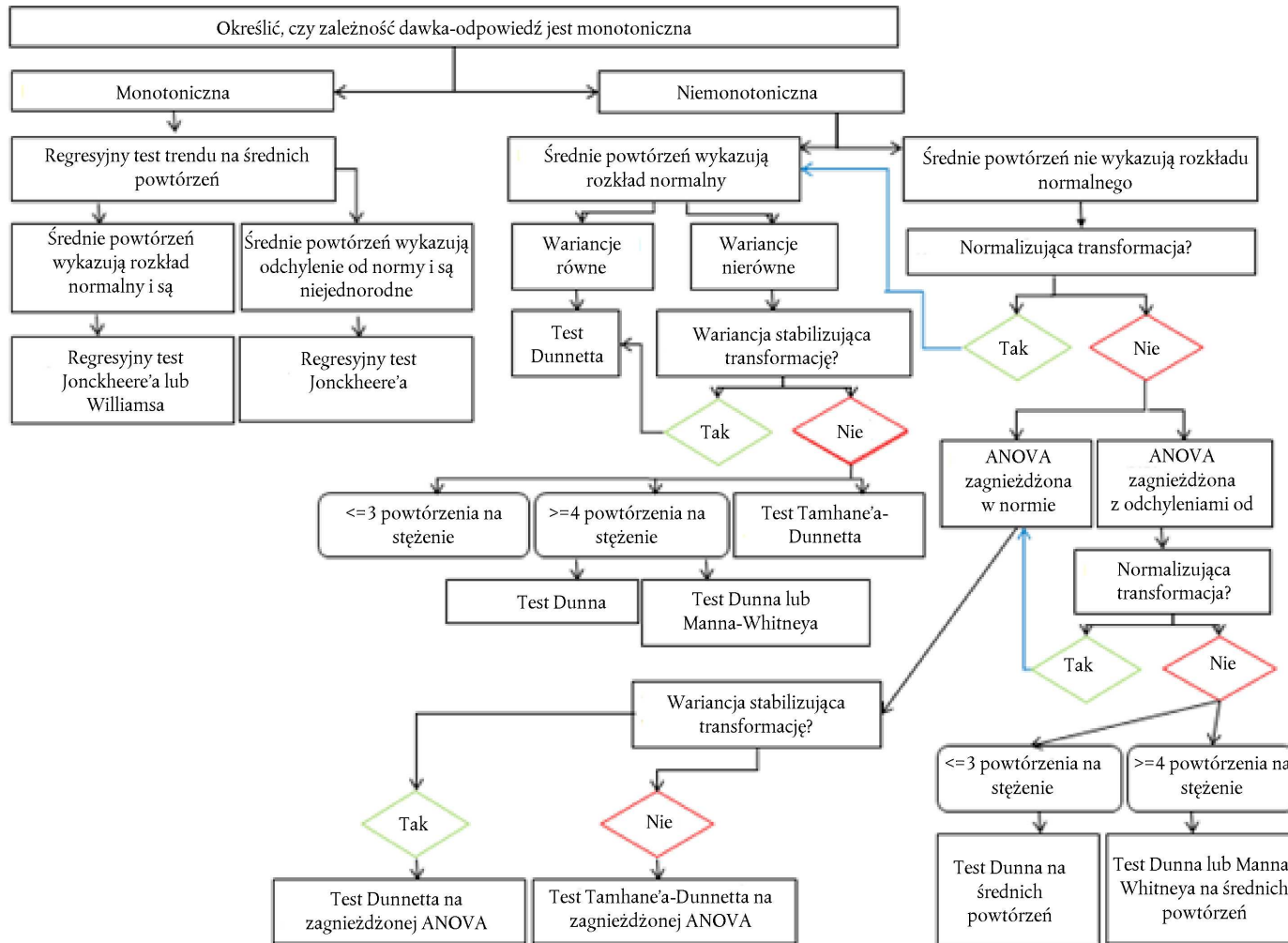
PRÓBKI WZMOCNIONE WITELLOGENINY I MIĘDZYLABORATORYJNY WZORZEC REFERENCYJNY

Każdego dnia, w którym przeprowadza się badania VTG, zostanie przeanalizowana próbka wzmocniona przygotowana z zastosowaniem międzylaboratoryjnego wzorca referencyjnego. VTG wykorzystana do przygotowania międzylaboratoryjnego wzorca referencyjnego będzie pochodzić z innej partii niż partia wykorzystana do przygotowania wzorców kalibracyjnych w odniesieniu do przeprowadzanego badania.

Próbka wzmocniona zostanie przygotowana przez dodanie znanej ilości międzylaboratoryjnego wzorca do próbki osocza pobranego od samca z próby kontrolnej. Próbka zostanie wzmocniona w celu otrzymania stężenia VTG będącego 10–100-krotnością oczekiwanego stężenia witellogeniny u samców ryb z próby kontrolnej. Próbka osocza pobranego od samca z próby kontrolnej, która zostanie wzmocniona, może pochodzić od pojedynczej ryby albo może składać się z próbek pobranych od kilku ryb.

Podpróbka niewzmocnionego osocza samców z próby kontrolnej zostanie poddana analizie w co najmniej dwóch zduplikowanych dołkach. Próbka wzmocniona również zostanie poddana analizie w co najmniej dwóch zduplikowanych dołkach. Średnia ilość witellogeniny w obu niewzmocnionych próbkach osocza pobranych od samców z próby kontrolnej zostanie dodana do obliczonej ilości VTG dodanej do próbek w celu ich wzmocnienia, aby oznaczyć przewidywane stężenie. Stosunek oczekiwanego stężenia do zmierzonego stężenia zostanie odnotowany wraz z wynikami każdego zbioru badań przeprowadzonych w danym dniu.

SCHEMAT DECYZYJNY DO CELÓW ANALIZY STATYSTYCZNEJ



C.49 Badanie toksyczności ostrej na rybach embrionach (FET)

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD (TG) nr 236 (2013). Opisuje badanie toksyczności ostrej na rybach embrionach (FET) przeprowadzane na danio przegowanym (*Danio rerio*). Celem tego badania jest określenie ostrego wpływu toksycznego substancji chemicznych na stadia embrionalne ryby. Badanie toksyczności ostrej na rybach embrionach opiera się na badaniach i czynnościach walidacyjnych prowadzonych na danio przegowanym (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14). Przedmiotowe badanie z powodzeniem stosowano w odniesieniu do szeregu substancji chemicznych, które wykazują różne tryby działania, rozpuszczalności, lotności i hydrofobowości (przeanalizowano w pozycjach 15 i 16).
2. Definicje stosowane w niniejszej metodzie badawczej przedstawiono w dodatku 1.

ZASADA BADANIA

3. Nowo zapłodnione komórki jajowe danio przegowanego poddaje się narażeniu na działanie badanej substancji chemicznej przez 96 godzin. Co 24 godziny rejestruje się do czterech obserwacji szczytowych jako wskaźniki śmiertelności (6): (i) koagulację zapłodnionych jaj, (ii) niewytworzenie się somitów, (iii) nieodrywanie się pączka ogonowego od woreczka żółtkowego oraz (iv) brak bicia serca. Pod koniec okresu narażenia określa się ostrą toksyczność na podstawie wyniku dodatniego w którejkolwiek z czterech zarejestrowanych obserwacji szczytowych oraz oblicza się LC_{50} .

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

4. Użyteczne informacje na temat właściwości specyficznych dla substancji obejmują wzór strukturalny, masę cząsteczkową, czystość substancji, stabilność w wodzie i przy narażeniu na działanie światła, pK_a i K_{ow} , rozpuszczalność w wodzie i prężność par, a także wyniki badania szybkiej biodegradowalności (np. metoda badawcza C.4 (17) lub metoda badawcza C.29 (18)). Rozpuszczalność w wodzie i prężność par mogą posłużyć do obliczenia stałej Henry'ego, która wskaże, czy istnieje prawdopodobieństwo wystąpienia strat wskutek parowania badanej substancji chemicznej. Powinna być dostępna wiarygodna metoda analityczna do oznaczania ilościowego substancji w roztworach do badań o znanej i udokumentowanej dokładności i granicy wykrywalności.
5. Jeżeli daną metodą badawczą stosuje się do badania mieszaniny, należy w miarę możliwości jak najdokładniej scharakteryzować skład tej mieszaniny, np. podając nazwę chemiczną jej składników, ich ilości oraz właściwości specyficzne dla poszczególnych substancji (zob. pkt 4). Przed zastosowaniem metody badawczej w badaniu regulacyjnym mieszaniny należy zastanowić się nad tym, czy wyniki uzyskane w wyniku jej stosowania będą możliwe do zaakceptowania w odniesieniu do założonego celu regulacyjnego.
6. Jeżeli chodzi o substancje, które mogą być aktywowane przez metabolizm, istnieją dowody, że embriony danio przegowanego posiadają zdolności metaboliczne (19)(20)(21)(22). Zdolność metaboliczna rybnich embrionów nie zawsze jest jednak podobna do zdolności młodych lub dorosłych osobników. Na przykład w badaniu toksyczności ostrej na rybach embrionach pominięto alkohol allilowy będący protoksykaniem (9). Dlatego też, jeżeli istnieją jakiegokolwiek przesłanki, że metabolity lub inne mające znaczenie produkty przemiany mogą być bardziej toksyczne niż związek macierzysty, zaleca się także przeprowadzenie badania z wykorzystaniem tych metabolitów/produktów przemiany oraz wykorzystanie uzyskanych wyników przy określaniu toksyczności badanej substancji chemicznej lub alternatywnie przeprowadzenie innego badania, w którym uwzględnia się metabolizm.
7. W przypadku substancji o masie cząsteczkowej $\geq 3kDa$ i strukturze cząsteczkowej o dużej objętości oraz substancji powodujących opóźnione wylęganie, które mogą uniemożliwić lub zmniejszyć narażenie po wylęgu, oczekuje się, że embriony nie będą wrażliwe ze względu na ograniczoną biodostępność substancji i odpowiednie mogą być inne badania toksyczności.

WAŻNOŚĆ BADANIA

8. Aby wyniki badań były ważne, muszą zostać spełnione następujące kryteria:
 - a) ogólny wskaźnik zapłodnienia wszystkich zebranych jaj powinien wynosić $\geq 70\%$ w badanej partii;

- b) przez cały czas trwania badania należy utrzymać temperaturę wody na poziomie 26 ± 1 °C w komorach badawczych;
- c) ogólna liczba embrionów, które przeżyły, w kontroli ujemnej (woda rozcieńczająca) i, w uzasadnionych przypadkach, w kontroli z rozpuszczalnikiem, powinna wynosić ≥ 90 % aż do zakończenia 96-godzinnego okresu narażenia;
- d) narażenie na substancję służącą do kontroli dodatniej (np. 4,0 mg/l 3,4-dichloroaniliny w przypadku danio przegowanego) powinno doprowadzić do minimalnej upadkowości na poziomie 30 % pod koniec 96-godzinnego okresu narażenia;
- e) wskaźnik wylęgu w kontroli ujemnej (oraz kontroli z rozpuszczalnikiem w stosownych przypadkach) powinien wynosić ≥ 80 % pod koniec 96-godzinnego okresu narażenia;
- f) pod koniec 96-godzinnego okresu narażenia stężenie rozpuszczonego tlenu w kontroli ujemnej i najwyższe badane stężenie powinny być na poziomie ≥ 80 % nasycenia.

OPIS METODY

9. Przegląd zalecanych warunków utrzymywania i badania przedstawiono w dodatku 2.

Aparatura

10. Niezbędny jest następujący sprzęt:

- a) akwaria wykonane z chemicznie obojętnego materiału (np. szkła) o odpowiedniej objętości w zależności od zalecanego obciążenia (zob. pkt 14 „Utrzymywanie tarlaków”);
- b) mikroskop odwrócony lub dwuokularowy o co najmniej 80-krotnym powiększeniu. Jeżeli powietrza w pomieszczeniu wykorzystywanym do rejestrowania obserwacji nie można doprowadzić do temperatury 26 ± 1 °C, konieczne jest zastosowanie etapu z przemieszczaniem poprzecznym z kontrolowaną temperaturą lub innych metod w celu utrzymania temperatury;
- c) komory badawcze; np. standardowe płytki z 24 dołkami o głębokości około 20 mm (zob. pkt 11 „Komory badawcze”);
- d) np. folia samoprzylepna do zakrycia płytek 24-dołkowych;
- e) inkubator lub klimatyzowane pomieszczenie z kontrolowaną temperaturą, pozwalające utrzymać temperaturę 26 ± 1 °C w dołkach (lub komorach badawczych);
- f) pehametr;
- g) miernik tlenu;
- h) sprzęt do oznaczania twardości wody i przewodności;
- i) podkładka na ikrę; tacki na narzędzia wykonane ze szkła, stali nierdzewnej lub innych obojętnych materiałów; siatka druciana (rozmiar oczek $2 \pm 0,5$ mm) wykonana ze stali nierdzewnej lub innego obojętnego materiału w celu ochrony złożonych jaj; podłoże tarłowe (np. sztuczne rośliny z obojętnego materiału) (metoda badawcza C.48 dodatek 4a (23));
- j) pipety z rozszerzonymi otworami do zbierania jaj;
- k) naczynia szklane do przygotowywania różnych badanych stężeń i wody rozcieńczającej (zlewki, kolby miarowe, cylindry miarowe i pipety miarowe) lub zbierania jaj danio przegowanego (np. zlewki, krystalizatory);
- l) jeżeli do przeprowadzenia badania wykorzystuje się alternatywne systemy narażenia, takie jak system przepływowy (24) lub pasywne dawkowanie (25), niezbędne są właściwe urządzenia i sprzęt.

Komory badawcze

11. Należy stosować komory badawcze wykonane ze szkła lub polistyrenu (np. płytki 24-dołkowe o pojemności 2,5–5 ml na każdy dołek). W przypadku gdy podejrzewa się adsorpcję polistyrenu (np. w przypadku niepolarnych, planarnych substancji o wysokim K_{ow}), należy stosować obojętne materiały (szkło) w celu zmniejszenia strat spowodowanych adsorpcją (26). Zaleca się losowe rozmieszczenie komór badawczych w inkubatorze.

Warunki dotyczące wody i badania

12. Zaleca się rozcieńczenie wody służącej do utrzymywania ryb w celu osiągnięcia poziomów twardości typowych dla różnych wód powierzchniowych. Wodę rozcieńczającą należy przygotować z wody regenerowanej (27). Uzyskany stopień twardości powinien być równy 100–300 mg/l $CaCO_3$, aby uniknąć nadmiernego strącania węglanu wapnia. Można wykorzystać inne dobrze opisane rodzaje wód powierzchniowych lub ze studni. Wodę regenerowaną można dostosować, aby uzyskać wodę do utrzymywania ryb o niskim poziomie twardości, przez rozcieńczenie wodą dejonizowaną w stosunku 1:5 do minimalnej twardości wynoszącej 30–35 mg/l $CaCO_3$. Przed dodaniem badanej substancji chemicznej wodę napowietrza się w celu nasycenia jej tlenem. Temperaturę w dołkach należy utrzymywać na poziomie 26 ± 1 °C przez cały okres badania. Współczynnik pH powinien mieścić się w przedziale 6,5–8,5 pH i nie powinien odbiegać od tego zakresu o więcej niż 1,5 jednostki w trakcie badania. Jeżeli nie oczekuje się, że pH utrzyma się w tym przedziale, wówczas przed rozpoczęciem badania należy dokonać regulacji pH. Regulację pH należy przeprowadzić w taki sposób, aby stężenie roztworu podstawowego nie zostało istotnie zmienione i aby nie doszło do żadnej reakcji chemicznej lub strącenia badanej substancji chemicznej. Zaleca się stosowanie chlorowodoru (HCl) i wodorotlenku sodu (NaOH) do regulowania pH w roztworach zawierających badaną substancję chemiczną.

Roztwory do badań

13. Roztwory do badań o wybranych stężeniach można przygotować np. przez rozcieńczenie roztworu podstawowego. Roztwory podstawowe najlepiej jest przygotowywać przez mechaniczne mieszanie lub wstrząsanie badanej substancji chemicznej z wodą rozcieńczającą (np. poprzez mieszanie lub sonikację). Jeżeli badana substancja chemiczna jest trudno rozpuszczalna w wodzie, należy zastosować procedury postępowania z trudnymi substancjami i mieszaninami opisane w wytycznej OECD nr 23 (28). Należy unikać stosowania rozpuszczalników, choć w niektórych przypadkach może okazać się to konieczne, aby przygotować roztwór podstawowy o odpowiednim stężeniu. Jeżeli używa się rozpuszczalnika w celu ułatwienia przygotowania roztworu podstawowego, jego stężenie końcowe nie powinno przekraczać 100 ml/l i powinno być takie samo we wszystkich naczyniach badawczych. W przypadku stosowania rozpuszczalnika wymagana jest dodatkowa kontrola z rozpuszczalnikiem.

Utrzymywanie tarlaków

14. Do wytwarzania jaj wykorzystuje się stado hodowlane nienarażonych osobników danio przegowanego ze szczepu typu dzikiego, w przypadku których wskaźnik zapłodnienia jaj jest dobrze udokumentowany. Ryby powinny być wolne od makroskopowo dostrzegalnych objawów zakażenia i choroby oraz nie powinny przechodzić leczenia farmaceutycznego (objawowego lub profilaktycznego) przez dwa miesiące przed tarłem. Ryby hodowlane utrzymuje się w akwariach o zalecanej pojemności obciążeniowej wynoszącej 1 l wody na jedną rybę i o stałym fotoperiodzie trwającym 12–16 godzin (29)(30)(31)(32)(33). Należy dostosować optymalne wskaźniki filtracji; należy unikać wysokich wskaźników filtracji powodujących znaczne zakłócenie wody. Warunki karmienia można znaleźć w dodatku 2. Należy unikać nadmiernego karmienia i regularnie monitorować jakość i czystość wody w akwariach oraz, w razie potrzeby, przywracać stan wyjściowy.

Badanie biegłości

15. Substancję chemiczną odniesienia, 3,4-dichloroanilinę (wykorzystywaną w badaniach walidacyjnych (1)(2)), należy zbadać w pełnym zakresie zależności stężenie-odpowiedź w celu sprawdzenia wrażliwości użytego szczepu ryb, najlepiej dwa razy w roku. W każdym laboratorium zaczynającym przeprowadzanie tego badania należy zastosować substancję chemiczną odniesienia. Laboratorium może stosować tę substancję chemiczną w celu wykazania swojej biegłości technicznej w zakresie przeprowadzania badania przed przedstawieniem danych do celów regulacyjnych.

Wytwarzanie jaj

16. Jaja danio pręgowanego mogą być wytwarzane przez grupy tarłowe (w pojedynczych zbiornikach tarłowych) lub przez masowe tarło (w zbiornikach do utrzymywania tarlaków). W przypadku grup tarłowych samce i samice (np. w stosunku 2:1) w grupie hodowlanej umieszcza się w zbiornikach tarłowych na kilka godzin przed wyłączeniem światła w dniu poprzedzającym badanie. Z uwagi na fakt, że okazjonalnie nie dochodzi do tarła w grupach tarłowych danio pręgowanego, zaleca się równoczesne korzystanie z co najmniej trzech zbiorników tarłowych. Aby uniknąć błędów genetycznych, jaja pobiera się od co najmniej trzech grup hodowlanych, zmieszanych i losowo wybranych.
17. W celu zebrania ikry podkładki na ikrę umieszcza się w zbiornikach tarłowych lub zbiornikach do utrzymywania tarlaków przed zapadnięciem zmroku w dniu poprzedzającym badanie lub przed nadejściem świtu w dniu badania. Aby uniknąć drapieżnych ataków dorosłych osobników danio pręgowanego na jaja, podkładki na ikrę przykrywa się obojętną siatką drucianą o odpowiednim rozmiarze oczek (około $2 \pm 0,5$ mm). W razie konieczności do siatki można przymocować sztuczne rośliny wykonane z obojętnego materiału (np. tworzywa sztucznego lub szkła) jako bodziec zachęcający do tarła (3)(4)(5)(23)(35). Należy stosować zwietrzałe materiały z tworzywa sztucznego, które się nie wypłukują (np. ftalany). Krycie, tarło i zapładnianie odbywa się w ciągu 30 min po włączeniu światła i następnie ostrożnie wyjmuje się podkładki z zebraną ikrą. Zaleca się opłukanie jaj wodą regenerowaną po zebraniu ich z podkładek na ikrę.

Zróżnicowanie jaj

18. Przy temperaturze 26 °C w zapłodnionych jajach po około 15 minutach zachodzi pierwsze bruzdkowanie, a w wyniku kolejnych synchronicznych bruzdkowań powstają blastomery 4-, 8-, 16- i 32-komórkowe (zob. dodatek 3) (35). Na tych etapach można wyraźnie zidentyfikować zapłodnione jaja, w których wytworzyła się blastula.

PROCEDURA

Warunki narażenia na działanie substancji

19. Dwadzieścia embrionów na stężenie (jeden embrion na dołek) podaje się działaniu badanej substancji chemicznej. Narażenie powinno być takie, aby przez cały czas trwania badania utrzymywane było nominalne stężenie substancji chemicznej ± 20 %. Jeżeli nie jest to możliwe w układzie statycznym, należy zastosować łatwiejszy w obsłudze układ półstatyczny z przerwą na wymianę (np. wymiana co 24 godziny). W takich przypadkach należy skontrolować stężenia ekspozycyjne przynajmniej przy najwyższym i najniższym badanym stężeniu na początku i na koniec każdego okresu narażenia (zob. pkt 36). Jeżeli nie można utrzymać stężenia ekspozycyjnego na poziomie ± 20 % stężenia nominalnego, wszystkie stężenia należy zmierzyć na początku i na koniec każdego okresu narażenia (zob. pkt 36). Przy wymianie należy zadbać o to, aby embriony pozostały pokryte niewielką ilością starych roztworów do badań w celu uniknięcia wysuszenia. Plan badania można dostosować w celu spełnienia wymogów badania dotyczących określonych substancji (np. system przepływowy (24) lub system pasywnego dawkowania (25) w przypadku substancji łatwo ulegających rozkładowi lub wysoce adsorpcyjnym (29) lub inne w przypadku substancji lotnych (36)(37)). W każdym razie należy dołożyć starań, aby zminimalizować ewentualny stres dla embrionów. Komory badawcze należy kondycjonować z roztworami do badań przez co najmniej 24 godziny przed rozpoczęciem badania. Podsumowanie warunków badania można znaleźć w dodatku 2.

Badane stężenia

20. Zwykle w celu spełnienia wymogów statystycznych wymaganych jest pięć stężeń badanej substancji chemicznej, które różnią się o taką samą wielokrotność nieprzekraczającą 2,2. Jeżeli użyto mniej niż pięć stężeń, należy podać uzasadnienie. Najwyższe badane stężenie powinno w miarę możliwości skutkować śmiertelnością na poziomie 100 %, a najniższe badane stężenie nie powinno w miarę możliwości powodować żadnych szkodliwych zmian, jak określono w pkt 28. Badanie ustalające zakres przeprowadzone przed ostatecznym badaniem pozwala na wybór odpowiedniego zakresu stężenia. Zakres ustala się zazwyczaj przy pomocy dziesięciu embrionów na stężenie. Poniższe instrukcje odnoszą się do badania wykonywanego na płytkach 24-dółkowych. Jeżeli stosuje się inne komory badawcze (np. małe szalki Petriego) lub bada się większą liczbę stężeń, należy odpowiednio dostosować instrukcje.

21. Dane szczegółowe oraz instrukcje wizualne dotyczące przydzielania stężeń do płytek 24-dołkowych są dostępne w pkt 27 i dodatku 4 rys. 1.

Kontrole

22. Próby kontrolne z wodą rozcieńczającą są wymagane zarówno jako kontrola ujemna, jak i jako wewnętrzna kontrola płytek. Jeżeli w ramach wewnętrznej kontroli płytek zaobserwuje się więcej niż jeden martwy embrion, odrzuca się daną płytkę, zmniejszając tym samym liczbę stężeń wykorzystanych do wyprowadzenia LC_{50} . Jeżeli cała płytka zostanie odrzucona, ocena i rozróżnienie obserwowanych zmian mogą stać się trudniejsze, zwłaszcza gdy odrzucona płytka jest płytką służącą do kontroli z rozpuszczalnikiem lub płytką, na której wpływ był również wywierany na embriony poddane działaniu badanej substancji. W pierwszym przypadku konieczne jest powtórzenie badania. W drugim przypadku utrata całej grupy badanej wskutek śmiertelności badanej w ramach kontroli wewnętrznej może ograniczyć zdolność do oceny zmian i określenia wartości LC_{50} .
23. Kontrolę dodatnią przy stałym stężeniu wynoszącym 4 mg/l 3,4 dichloroaniliny przeprowadza się na każdej partii jaj wykorzystywanej do badania.
24. W przypadku stosowania rozpuszczalnika dodatkowa grupa 20 embrionów jest narażona na działanie rozpuszczalnika umieszczonego na oddzielnej płytce 24-dołkowej, dlatego takie działanie określane jest mianem kontroli z rozpuszczalnikiem. Aby badanie można było uznać za możliwe do zaakceptowania, należy wykazać, że rozpuszczalnik nie ma istotnego wpływu na czas potrzebny do wylęgu, przeżywalność, ani nie powoduje wystąpienia żadnych innych niekorzystnych skutków dla embrionów (por. pkt 8c).

Rozpoczęcie narażenia na działanie substancji i czas trwania badania

25. Badanie rozpoczyna się jak najszybciej po zapłodnieniu komórek jajowych i kończy się po upływie 96 godzin narażenia na działanie substancji. Embriony należy zanurzyć w roztworze do badań przed rozpoczęciem bruzdkowania tarczy zarodkowej lub najpóźniej przed osiągnięciem stadium 16-komórkowego. Aby narażenie na działanie substancji rozpoczęło się z minimalnym opóźnieniem, dokonuje się losowego wyboru co najmniej dwukrotności liczby jaj potrzebnych w każdej grupie badanej i przenosi się je do próbek zawierających odpowiednie stężenia i do prób kontrolnych (np. do krystalizatorów o pojemności 100 ml; jaja powinny być w pełni zanurzone) nie później niż 90 minut po zapłodnieniu.
26. Zdolne do przeżycia zapłodnione jaja należy oddzielić od niezapłodnionych jaj i w ciągu 180 minut od zapłodnienia przenieść do płytek 24-dołkowych, preakondycjonowanych przez 24 godziny i ponownie napełnionych świeżo przygotowanymi roztworami do badań w ilości 2 ml na dołek. Korzystając z mikroskopu stereoskopowego (najlepiej w powiększeniu ≥ 30 -krotnym), wybiera się zapłodnione jaja, w których zachodzi bruzdkowanie i które nie wykazują żadnych oczywistych nieprawidłowości podczas bruzdkowania (np. asymetrii, tworzenia się pęcherzyków) ani uszkodzeń kosmówki. Więcej informacji na temat wyboru i oddzielania jaj można znaleźć w dodatku 3 rys. 1 i 3 i w dodatku 4 rys. 2.

Rozmieszczanie jaj w płytkach 24-dołkowych

27. Liczba jaj rozmieszczonych w płytkach dołkowych (zob. również dodatek 4 rys. 1) jest następująca:
- 20 jaj na jednej płytce dla każdego badanego stężenia;
 - 20 jaj jako kontrola z rozpuszczalnikiem na jednej płytce (w razie potrzeby);
 - 20 jaj jako kontrola dodatnia na jednej płytce;
 - 4 jaja w wodzie rozcieńczającej jako wewnętrzna kontrola płytek na każdej z powyższych płytek;
 - 24 jaja w wodzie rozcieńczającej jako kontrola ujemna na jednej płytce.

Obserwacje

28. Na każdym embrionie poddanym badaniu przeprowadza się obserwacje szczytowe pod kątem występowania: koagulacji embrionów, niewytworzenia się somitów, nieodłączenia się ogona i braku bicia serca (tabela 1). Obserwacje te wykorzystuje się do określenia śmiertelności: uzyskanie jakiegokolwiek wyniku dodatniego w jednej ze wspomnianych obserwacji oznacza, że embrion danio pręgowanego jest martwy. Ponadto codziennie, począwszy od 48. godziny, odnotowuje się przypadki wylęgania w grupach badanych i grupach kontrolnych. Obserwacje odnotowuje się co 24 godziny, aż do zakończenia badania.

Tabela 1

Obserwacje szczytowe występowania ostrej toksyczności u embrionów danio pręgowanego w ciągu 24–96 godzin od zapłodnienia

	Czas narażenia na działanie substancji			
	24 godziny	48 godzin	72 godziny	96 godzin
Embriony skoagulowane	+	+	+	+
Niewytworzenie się somitów	+	+	+	+
Nieodłączanie się ogona	+	+	+	+
Brak bicia serca		+	+	+

29. *Koagulacja embrionu*: skoagulowane embriony są koloru mlecznobiałego i wydają się być ciemne podczas badania pod mikroskopem (zob. dodatek 5 rys. 1). Liczbę skoagulowanych embrionów określa się po upływie 24, 48, 72 i 96 godzin.
30. *Niewytworzenie się somitów*: w temperaturze 26 ± 1 °C po upływie 24 godzin u prawidłowo rozwijających się embrionów danio pręgowanego wytworzyło się około 20 somitów (zob. dodatek 5 rys. 2). Prawidłowo rozwijający się embrion wykazuje spontaniczne ruchy (skurcze z boku na bok). Pojawienie się spontanicznych ruchów wskazuje na tworzenie się somitów. Brak somitów odnotowuje się po upływie 24, 48, 72 i 96 godzin. Niewytworzenie się somitów po upływie 24 godzin może być spowodowane ogólnym opóźnieniem rozwoju. Najpóźniej po upływie 48 godzin powinny się wytworzyć somity. Jeżeli tak nie jest, embriony uznaje się za martwe.
31. *Nieodłączenie się ogona*: u prawidłowo rozwijających się embrionów danio pręgowanego odłączenie się ogona (zob. załącznik 5 rys. 3) od woreczka żółtkowego obserwuje się po wydłużeniu tylnej części ciała embrionu. Nieodłączenie się ogona odnotowuje się po upływie 24, 48, 72 i 96 godzin.
32. *Brak bicia serca*: u prawidłowo rozwijających się embrionów danio pręgowanego przebywających w temperaturze 26 ± 1 °C bicia serca można zaobserwować po upływie 48 godzin (zob. dodatek 5 rys. 4). Należy zachować szczególną ostrożność podczas odnotowywania tego punktu końcowego, ponieważ nieregularnego (zmiennego rytmu) bicia serca *nie* należy odnotowywać jako śmierci embrionu. Ponadto za śmierć embrionu nie uznaje się widocznego bicia serca bez przepływu krwi w tętnicy brzusznej. Aby odnotować przedmiotowy punkt końcowy, embriony niewykazujące bicia serca należy obserwować przez co najmniej minutę przy minimalnym, 80-krotnym powiększeniu. Brak bicia serca odnotowuje się po upływie 48, 72 i 96 godzin.
33. Wskaźniki wylęgu we wszystkich grupach badanych i grupach kontrolnych należy odnotowywać i zgłaszać począwszy od upływu 48 godzin. Chociaż wylęganie nie stanowi punktu końcowego wykorzystywanego do obliczenia LC_{50} , wylęganie zapewnia narażenie embrionu na działanie substancji bez potencjalnej bariery ochronnej zapewnianej przez kosmówkę, i jako takie może pomóc w interpretacji danych.
34. Szczegółowe opisy prawidłowego rozwoju embrionów danio pręgowanego (35) i przykłady nieprawidłowego rozwoju embrionów danio pręgowanego przedstawiono w dodatkach 3 i 5.

Pomiary analityczne

35. Na początku i pod koniec badania dokonuje się pomiaru pH, całkowitej twardości i przewodności w próbie kontrolnej lub próbach kontrolnych oraz w próbie zawierającej najwyższe stężenie badanej substancji chemicznej. W układach półstatycznych z wymianą pomiary pH należy przeprowadzać przed wymianą i po wymianie wody. Jeżeli jest to zgodne z kryteriami ważności badania (zob. pkt 8f), pod koniec badania dokonuje się pomiaru stężenia rozpuszczonego tlenu w próbach kontrolnych ujemnych oraz w próbie zawierającej najwyższe badane stężenie, w których znajdują się embriony zdolne do przeżycia. Jeżeli występują obawy dotyczące tego, że temperatury w płytkach 24-dołkowych mogą być różne, dokonuje się pomiaru temperatury w trzech losowo wybranych naczyniach. Zaleca się ciągle, lub co najmniej codzienne, odnotowywanie temperatury w trakcie trwania badania.
36. W układzie statycznym na początku i pod koniec badania należy dokonać pomiaru stężenia badanej substancji chemicznej przynajmniej w próbkach zawierających najwyższe i najniższe badane stężenia, lecz zaleca się dokonywanie pomiarów we wszystkich próbkach poddanych działaniu substancji chemicznej. W badaniach półstatycznych (z wymianą), w których oczekuje się, że stężenie badanej substancji chemicznej pozostanie w zakresie $\pm 20\%$ wartości nominalnych, zaleca się co najmniej przeprowadzenie analizy próbek zawierających najwyższe i najniższe badane stężenia w roztworach świeżo przygotowanych i przed samą wymianą. W przypadku badań, w których nie oczekuje się, że stężenie badanej substancji chemicznej pozostanie w zakresie $\pm 20\%$ stężenia nominalnego, konieczne jest analizowanie wszystkich badanych stężeń – roztworów świeżo przygotowanych i bezpośrednio przed wymianą. Jeżeli objętość próbki jest zbyt mała, by poddać ją analizie, użyteczne może być połączenie roztworów do badań lub wykorzystanie komór zastępczych wykonanych z tego samego materiału i o takim samym stosunku objętości do powierzchni jak płytki 24-dołkowe. Zaleca się, aby wyniki były oparte na mierzonych stężeniach. Jeżeli zmierzone stężenia nie utrzymują się w granicach 80–120 % stężenia nominalnego, stężenia efektywne należy wyrazić względem średniej geometrycznej zmierzonych stężeń; zob. rozdział 5 wytycznej OECD „Guidance Document No. 23 on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures” (28).

BADANIE GRANICZNE

37. Stosując procedury opisane w niniejszej metodzie badawczej, badanie graniczne można przeprowadzić przy 100 ml/l badanej substancji chemicznej lub przy jej granicznej rozpuszczalności w badanej pożywce użytej do badań (którakolwiek z tych wartości jest niższa) w celu wykazania, że LC_{50} jest większe od tego stężenia. Badanie graniczne należy przeprowadzić na 20 embrionach w próbie poddanej działaniu substancji chemicznej, w próbie kontrolnej dodatniej oraz – w razie potrzeby – w kontroli z rozpuszczalnikiem oraz na 24 embrionach w próbie kontrolnej ujemnej. Jeżeli odsetek organizmów, które nie przeżyły, w badanym stężeniu przekracza upadkowość w próbie kontrolnej ujemnej (lub w kontroli z rozpuszczalnikiem) o 10 %, należy przeprowadzić pełne badanie. Należy odnotować wszelkie zaobserwowane skutki. Jeżeli upadkowość w próbie kontrolnej ujemnej (lub w kontroli z rozpuszczalnikiem) przekracza 10 %, badanie staje się nieważne i należy je powtórzyć.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

38. W niniejszym badaniu poszczególne dołki uznaje się za niezależne kontrpróby na potrzeby analizy statystycznej. Wartości procentowe oznaczające embriony, u których w ciągu 48 lub 96 godzin zaobserwowano co najmniej jeden dodatni wynik obserwacji szczytowej, należy wykreślić na wykresie względem badanych stężeń. W celu obliczenia nachylenia krzywej, wartości LC_{50} i granic ufności (95 %), należy zastosować odpowiednie metody statystyczne (38) i należy zapoznać się z wytycznymi OECD „Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data” (39).

Sprawozdanie z badania

39. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna:

Substancja jednoskładnikowa:

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;

- dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub nazwa CAS, numer CAS, identyfikator SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne, itp. (w tym w stosownych przypadkach zawartość węgla organicznego);

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:

- opisane w miarę możliwości poprzez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

Organizmy doświadczalne:

- nazwa systematyczna, szczep, źródło i metoda pobierania zapłodnionych jaj i dalsza obróbka.

Warunki badania:

- zastosowana procedura badawcza (np. układ półstatyczny z wymianą);
- fotoperiod;
- plan badania (np. liczba komór badawczych, rodzaje prób kontrolnych);
- charakterystyczne cechy jakości wody wykorzystywanej do utrzymywania ryb (np. pH, twardość, temperatura, przewodność, stężenie rozpuszczonego tlenu);
- stężenie rozpuszczonego tlenu, pH, całkowita twardość, temperatura i przewodność roztworów do badań na początku badania i po upływie 96 godzin;
- metoda przygotowania roztworów podstawowych i roztworów do badań oraz częstotliwość wymiany;
- uzasadnienie stosowania rozpuszczalnika i uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika, jeżeli jest inny niż woda;
- nominalne badane stężenia i wyniki wszystkich analiz ustalających stężenie badanej substancji chemicznej w naczyniach badawczych; należy również podać sprawność odzyskową metody i granicę oznaczalności;
- dowody, że próby kontrolne odpowiadają ogólnym kryteriom ważności w odniesieniu do przeżycia;
- wskaźnik zapłodnienia komórek jajowych;
- wskaźnik wylęgu w grupach badanych i w grupach kontrolnych.

Wyniki:

- maksymalne stężenie niepowodujące upadkowości w trakcie trwania badania;
- minimalne stężenie powodujące 100 % upadkowość w trakcie trwania badania;
- skumulowana upadkowość dla każdego stężenia przy zalecanych okresach obserwacji;
- wartości LC_{50} po 96 godzinach (i opcjonalnie po 48 godzinach) przy upadkowości wynoszącej 95 % granicy ufności, jeżeli jest to możliwe;
- wykres krzywej stężenie-upadkowość pod koniec badania;
- upadkowość w próbach kontrolnych (kontrola ujemna, wewnętrzna kontrola płytek, jak również kontrola dodatnia i ewentualna kontrola z rozpuszczalnikiem);
- dane dotyczące wyniku każdej z czterech obserwacji szczytowych;
- częstość występowania i opis anomalii morfologicznych i fizjologicznych, jeżeli jakiegokolwiek występują (zob. przykłady przedstawione w dodatku 5 rys. 2);
- zdarzenia, które wystąpiły w trakcie prowadzenia badań, mogące mieć wpływ na wyniki;

- analiza statystyczna i przetwarzanie danych (analiza probitowa, model regresji logistycznej i średnia geometryczna dla LC_{50});
- nachylenie i granice ufności regresji (przekształconej) krzywej stężenie-odpowiedź.

Wszelkie odstępstwa od metody badawczej i odpowiednie wyjaśnienia.

Omówienie i interpretacja wyników.

BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: część I i część II. Seria dotycząca badań i oceny, nr 157, OECD, Paryż.
- (2) OECD (2012) Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: część I i część II (załączniki). Seria dotycząca badań i oceny nr 179, OECD, Paryż.
- (3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. i Seitz, N. (2005) Towards an alternative for the acute fish LC_{50} test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. ALTEX 22: s. 87–102.
- (4) ISO (2007) Norma międzynarodowa Jakość wody – Oznaczanie ostrej toksyczności ścieków w odniesieniu do jaja dania przegowanego (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E) Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna.
- (5) Nagel, R. (2002) DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) – a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX 19: s. 38–48.
- (6) Schulte, C. i Nagel, R. (1994) Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test – preliminary results. ATLA 22, s. 12–19.
- (7) Bachmann, J. (2002) Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). Doktorat na Uniwersytecie Technicznym w Dreźnie, Niemcy.
- (8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. i Nagel, R. (1995) Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. Chemosphere 30/11: s. 2087–2102.
- (9) Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, A., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. Environ. Sci. Technol. 46, s. 9690–9700.
- (10) Kammann, U., Vobach, M. i Wosniok, W. (2006) Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 51: s. 97–102.
- (11) Groth, G., Kronauer, K. i Freundt, K.J. (1994) Effects of N,N-dimethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. Toxicol. In Vitro 8: s. 401–406.
- (12) Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. i Freundt, K.J. (1993) Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with N-methylamine, N,N-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, N-methylaniline, N,N-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50: s. 878–882.
- (13) Nguyen, L.T. i Janssen, C.R. (2001) Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. 16: s. 566–571.
- (14) Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H. i Wu, R.S.S. (2000) Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. Environ. Toxicol. Chem. 19: s. 3024–3031.
- (15) Belanger, S. E., Rawlings J. M. i Carr G. J. (2013) Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry 32: 1768-1783.

- (16) Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 149 (2), s. 196–209
- (17) Rozdział C.4 niniejszego załącznika: „Szybka biodegradowalność”
- (18) Rozdział C.29 niniejszego załącznika: „Szybka biodegradowalność CO₂ w szczelnie zamkniętych naczyniach”.
- (19) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicology* 281: s. 25–36.
- (20) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Reprod. Toxicol.* 33: s. 133–141.
- (21) Incardona, J.P., Linbo, T.L., Scholz, N.L. (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 257: 242–249.
- (22) Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011) Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 253: 244–252.
- (23) Rozdział C.48 niniejszego załącznika: Krótkoterminowe badanie rozrodczości ryb. Zob. dodatek 4a.
- (24) Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendlar, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009) Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. in vitro* 23: 1436–1442.
- (25) Brown, R.S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I.S., Villerius, L.A., Klamer, H.J.C., (2001) Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. *Environ. Sci. Technol.* 35, s. 4097–4102.
- (26) Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Küster, E. (2008) How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, s. 1676–1682.
- (27) ISO (1996) Normy międzynarodowe. Jakość wody – Oznaczenie ostrej, letalnej toksyczności substancji w odniesieniu do ryby słodkowodnej [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3: Metoda przepływowa. Dostępne na stronie internetowej: [<http://www.iso.org>].
- (28) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Seria dotycząca badań i oceny, nr 23, OECD, Paryż.
- (29) Laale, H.W. (1977) The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review. *J. Fish Biol.* 10: 121–173.
- (30) Westerfield, M. (2007) The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). Wydanie piąte. Eugene, University of Oregon Press, Instytut Neuronauki, Stany Zjednoczone.
- (31) Canadian Council on Animal Care (2005) Guidelines on: the Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing, ISBN: 0-919087-43-4 <http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf>
- (32) Komisja Europejska (2007) Zalecenie Komisji 2007/526/WE z dnia 18 czerwca 2007 r. w sprawie wytycznych dotyczących trzymania zwierząt wykorzystywanych do celów doświadczalnych i innych celów naukowych i opieki nad tymi zwierzętami (notyfikowane jako dokument nr C(2007) 2525) [<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:PL:PDF>]
- (33) Unia Europejska (2010) Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych. Dz.U. L 276 z 20.10.2010, s. 33

- (34) Nagel, R. (1986) Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). J. Appl. Ichthyol. 2: 173–181.
- (35) Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203: 253–310.
- (36) Rozdział C.2 niniejszego załącznika: Badanie nagłego unieruchomienia *Daphnia* sp.
- (37) Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K. (2009) Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect concentrations in the fish early life stage test. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1970–1978
- (38) ISO (2006) Norma międzynarodowa. Water quality – Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data, ISO/TS 20281. Dostępne na stronie internetowej: [<http://www.iso.org>].
- (39) OECD (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Seria dotycząca badań i oceny, nr 54. OECD, Paryż.
- (40) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detailed review paper „Fish embryo toxicity assays”. Sprawozdanie UBA na mocy umowy nr 20385422, Niemiecka Federalna Agencja Ochrony Środowiska, Berlin. 298 s.
-

Dodatek 1

DEFINICJE

Szczytowy punkt końcowy: mający wpływ na poziomie populacji.

Blastula: formacja komórkowa wokół bieguna animalnego, która obejmuje pewną część żółtka.

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

Epibolia: rozległe rozrastanie się komórek, głównie nabłonkowych, w fazie gastrulacji embrionu i ich przemieszczanie się ze strony grzbietowej na brzuszną, wskutek którego warstwy komórek entodermalnych ulegają internalizacji w procesie podobnym do inwaginacji i żółtko zostaje włączone w embrion.

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

Wewnętrzna kontrola płytek: kontrola wewnętrzna składająca się z 4 dołków na płytce 24-dołkowej wypełnionych wodą rozcieńczającą, służąca do identyfikowania potencjalnego skażenia płytek przez producenta lub przez badacza podczas procedury oraz identyfikowania jakiegokolwiek wpływu płytki na wynik badania (np. gradientu temperatury).

IUPAC: Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej

Woda służąca do utrzymywania tarlaków: woda, w której prowadzony jest chów ryb dorosłych.

Średnie stężenie śmiertelne (LC₅₀): stężenie badanej substancji chemicznej szacowane jako stężenie śmiertelne dla 50 % organizmów doświadczalnych w trakcie badania.

Badanie półstatyczne z wymianą: badanie z regularną wymianą roztworów do badań po upływie określonego okresu (np. co 24 godziny).

SMILES: ang. *Simplified Molecular Input Line Entry Specification* – uproszczony zapis struktury cząsteczek w postaci liniowej informacji tekstowej.

Somit: w rozwijającym się embrionie kręgowca somity są masami mezodermy rozmieszczonymi po obu stronach cewy nerwowej, z których ostatecznie wykształci się skóra właściwa (dermatom), mięśnie szkieletowe (miotom) i kręgi (sklerotom).

Badanie statyczne: badanie, w którym roztwory do badań pozostają bez zmian w trakcie całego badania.

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

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

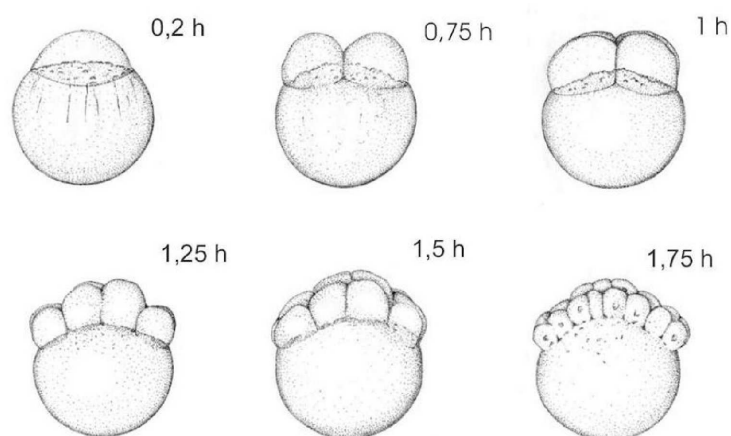
Dodatek 2

UTRZYMYWANIE I HODOWLA DANIO PRĘGOWANEGO ORAZ TYPOWE WARUNKI BADAŃ OSTREJ TOKSYCZNOŚCI NA EMBRIONACH DANIO PRĘGOWANEGO

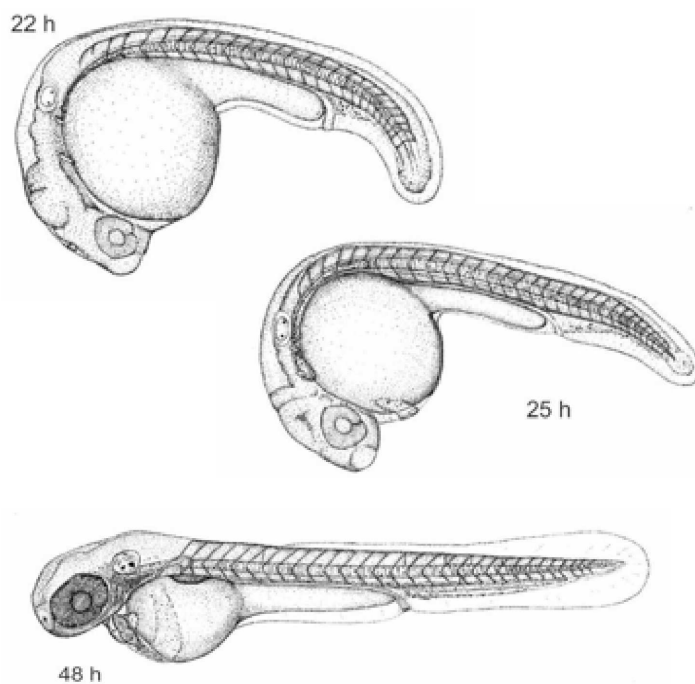
Danio pręgowany (<i>Danio rerio</i>)		
Pochodzenie gatunku	Indie, Birma, Malakka, Sumatra	
Dymorfizm płciowy	Samice: wystający brzuch, kiedy noszą jaja Samce: smuklejsza budowa ciała, pomarańczowy odcień pól pomiędzy niebieskimi wzdłużnymi pręgami (szczególnie widoczny przy płetwie odbytowej)	
Schemat żywienia	sucha pasza w postaci płatków (maksymalnie 3 % masy ryby dziennie), podawana 3–5 razy dziennie; dodatkowo pływki artemii (gatunków z rodzaju <i>Artemia</i>) lub małe dafnie odpowiedniej wielkości uzyskane z nieskażonego źródła. Podawanie żywego pokarmu stanowi urozmaicenie warunków bytowania, a zatem należy podawać żywy pokarm, kiedy tylko jest to możliwe. Aby zapewnić optymalną jakość wody, należy usuwać nadmiar paszy i odchodzić po około godzinie od karmienia.	
Przybliżona masa dorosłych ryb	Samice: 0,65 ±0,13 g Samce: 0,5 ±0,1 g	
Utrzymywanie ryb rodzicielskich	Oświetlenie	Fluorescencyjne żarówki (szerokie spektrum); 10–20 µE/m ² /s, 540–1080 luksov lub 50–100 ft-c (poziomy w laboratoryjnych warunkach otoczenia); Fotoperiod trwający 12–16 godzin
	Temperatura wody	26 ±1 °C
	Jakość wody	Nasylenie O ₂ ≥80 %, twardość: np. ~30–300 mg/l CaCO ₃ , NO ₃ ⁻ : ≤48 mg/l, NH ₄ ⁺ i NO ₂ ⁻ : <0,001 mg/l, chlor resztkowy <10 µg/l, całkowity chlor organiczny <25 ng/l, pH =6,5–8,5
	Dalsze kryteria jakości wody	Cząstki stałe <20 mg/l, całkowity węgiel organiczny <2 mg/l, całkowita zawartość pestycydów fosforoorganicznych <50 ng/l, całkowita zawartość pestycydów chloroorganicznych oraz polichlorowanych bifenyli <50 ng/l
	Rozmiar zbiornika do utrzymywania ryb	Np. 180 l, 1 ryba/l
	Oczyszczanie wody	Ciągłe (filtr węglowy); inne możliwości obejmują układy półstatyczne z wymianą wody lub system przepływowy z ciągłą wymianą wody
	Zalecany stosunek samców do samic na potrzeby hodowli	2:1 (lub masowe tarło)
Zbiorniki tarłowe	Np. 4-litrowe zbiorniki ze stalową siatką na dnie i sztuczną rośliną w charakterze bodźca do tarła; zewnętrzne maty grzewcze lub masowe tarło w zbiornikach do utrzymywania ryb	
Struktura i wygląd jaj	Stabilna kosmówka (tj. jaja wysoce przezroczyste, niekleiste, o średnicy ~0,8–1,5 mm)	
Liczba jaj składanych podczas tarła	Pojedyncza dojrzała samica składa co najmniej 50–80 jaj dziennie. W zależności od szczepu liczba jaj może być znacznie wyższa. Wskaźnik zapłodnienia jaj powinien wynosić ≥70 %. W przypadku ryb odbywających tarło po raz pierwszy wskaźnik zapłodnienia jaj może być niższy przez pierwszych kilka tarła.	
Rodzaj badania	Statyczne, półstatyczne z wymianą, przepływowe, 26 ±1 °C, komory badawcze kondycjonowane przez 24 godziny (np. płytki 24-dółkowe o pojemności dołka równej 2,5–5 ml)	

Dodatek 3

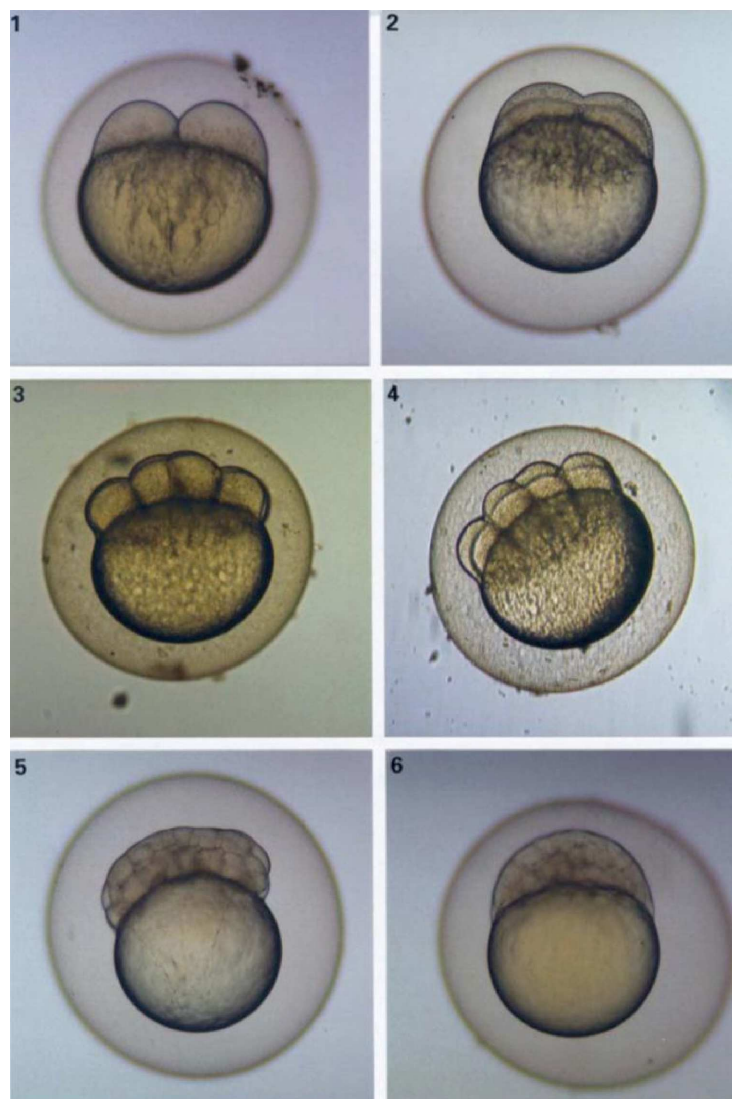
NORMALNY ROZWÓJ DANIO PRĘGOWANEGO W TEMPERATURZE 26 °C



Rys. 1: Wybrane stadia wczesnego rozwoju danio pręgowanego (*Danio rerio*): 0,2–1,75 godzin od zapłodnienia (z: Kimmel *et al.*, 1995 (35)). Przebieg normalnego rozwoju w czasie można wykorzystać w diagnostyce zarówno zapłodnienia, jak i żywotności jaj (zob. pkt 26: Wybór zapłodnionych jaj).



Rys. 2: Wybrane stadia późnego rozwoju danio pręgowanego (*Danio rerio*) (embrion pozbawiony kosmówki w celu zoptymalizowania widoczności): 22–48 godzin po zapłodnieniu (z: Kimmel *et al.*, 1995 (35)).

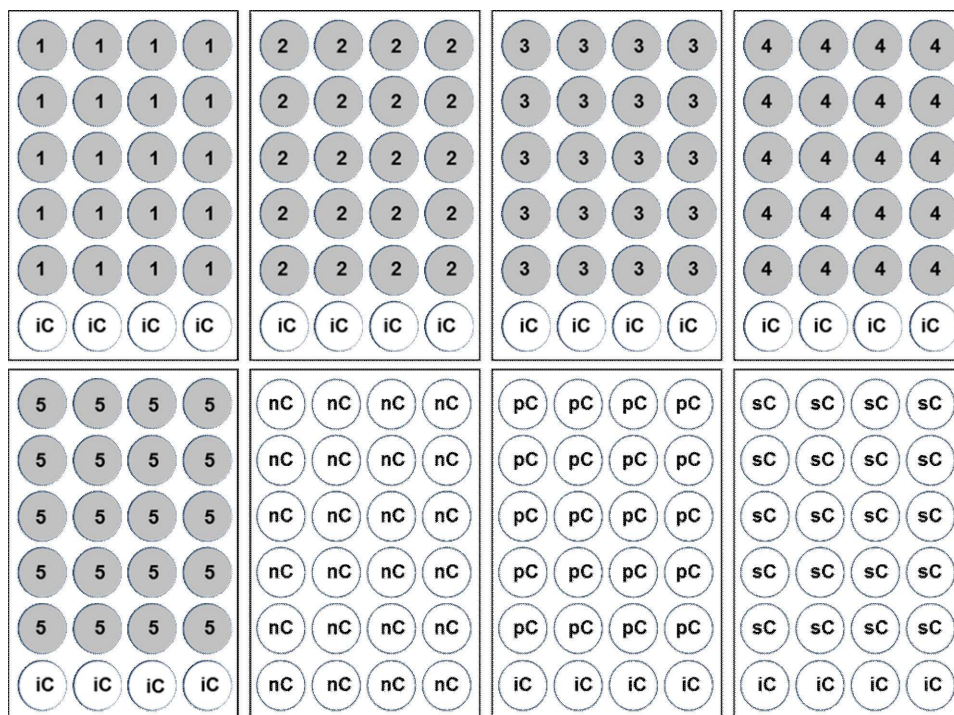


Rys. 3: Normalny rozwój embrionów danio przegowanego (*Danio rerio*): 1) 0,75 godziny, etap 2-komórkowy; 2) 1 godzina, etap 4-komórkowy; 3) 1,2 godziny, etap 8-komórkowy; 4) 1,5 godziny, etap 16-komórkowy; 5) 4,7 godziny, początek epibolii; 6) 5,3 godziny, około 50 % epibolii (z: Braunbeck i Lammer 2006 (40)).

Dodatek 4

Rys. 1

Rozkład płytek 24-dołkowych



1–5 = pięć badanych stężeń/substancja chemiczna;

nC = kontrola ujemna (woda rozcieńczająca);

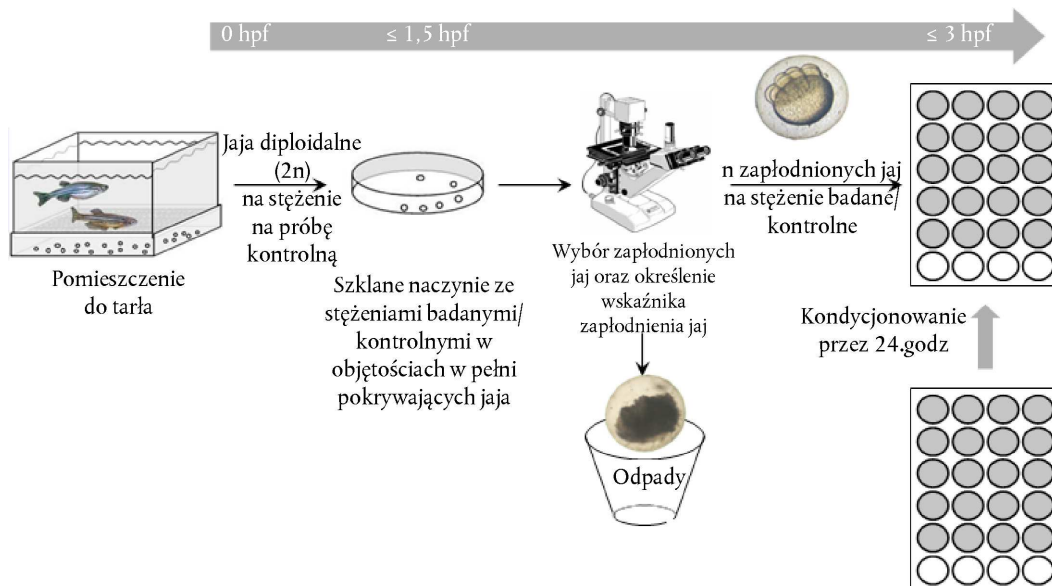
iC = wewnętrzna kontrola płytek (z wodą rozcieńczającą);

pC = kontrola dodatnia (4 mg 3,4-dichloroaniliny/l);

sC = kontrola z rozpuszczalnikiem

Rys. 2

Schemat procedury badania ostrej toksyczności na embrionach danio przegowanego (od lewej do prawej): złożenie jaj, zebranie jaj, wstępne narażenie niezwłocznie po zapłodnieniu w szklanych zbiornikach, selekcja zapłodnionych jaj za pomocą mikroskopu odwróconego lub dwuokularowego oraz rozmieszczenie zapłodnionych jaj na płytkach 24-dółkowych przygotowanych przy użyciu odpowiednich badanych stężeń / substancji kontrolnych, n = liczba jaj wymagana na jedno badane stężenie/kontrolę (w tym przypadku 20), hpf = liczba godzin od zapłodnienia.



Dodatek 5

**ATLAS LETALNYCH PUNKTÓW KOŃCOWYCH NA POTRZEBY BADANIA OSTREJ TOKSYCZNOŚCI
NA EMBRIONACH DANIO PRĘGOWANEGO**

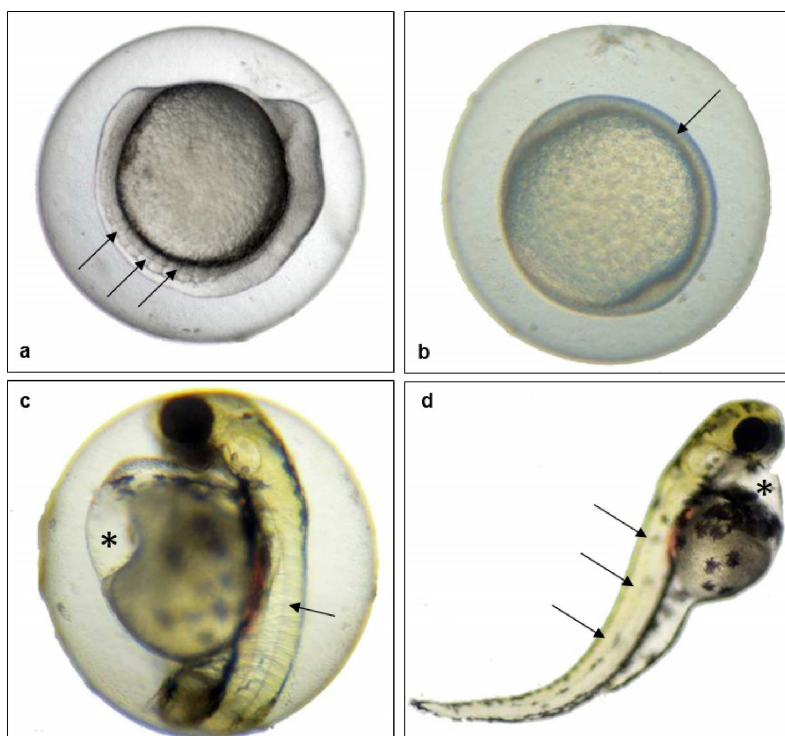
Następujące szczytowe punkty końcowe wskazują na ostrą toksyczność i w konsekwencji śmierć embrionów: *koagulacja embrionu, nieodłączenie się ogona, niewytworzenie się somitów i brak bicia serca*. Do zilustrowania tych punktów końcowych wybrano poniższe obrazy mikrograficzne.

Rys. 1

Koagulacja embrionu:

w jasnym oświetleniu pola w skoagulowanych embrionach danio pręgwanego widoczne są różne nieprzeziarne wtrącenia.

Rys. 2:

Niewytworzenie się somitów:

na rys. a) u 24-godzinnego embrionu danio pręgowanego, mimo że jest opóźniony w rozwoju o ok. 10 godzin, widoczne są dobrze rozwinięte somity (→), natomiast embrion na rys. b) nie wykazuje żadnych oznak tworzenia się somitów (→). Na rys. c) u 48-godzinnego embrionu danio pręgowanego, mimo widocznego obrzęku woreczka żółtkowego, wyraźnie widać tworzenie się somitów (→), natomiast 96-godzinny embrion na rys. d) nie wykazuje żadnych oznak tworzenia się somitów (→). Należy również zwrócić uwagę na krzywiznę kręgosłupa (skoliozę) i obrzęk osierdzia (*) u embrionu na rys. d).

Rys. 3:

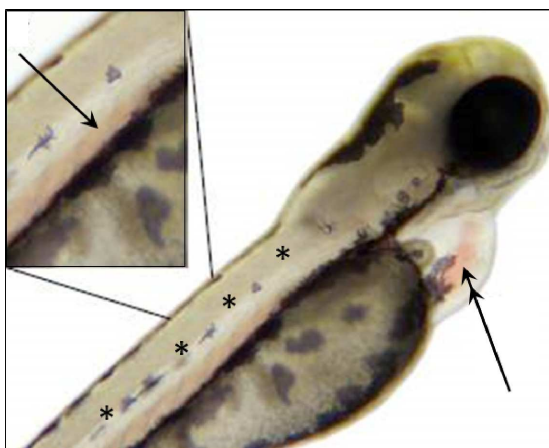
Nieodłączenie się pączka ogonowego



Widok boczny (a: →; 96-godzinny embrion danio pręgowanego). Należy również zwrócić uwagę na brak zawiązka oka (*).

Rys. 4:

Brak bicia serca



Brak bicia serca z oczywistych względów trudno jest przedstawić na obrazie mikrograficznym. Na brak bicia serca wskazuje brak skurczów serca (podwójna strzałka). Bezruch krwinek, np. w części brzusznej aorty (→ na wstawce), nie jest oznaką braku bicia serca. Należy również zwrócić uwagę na niewytworzenie się somitów w tym embrionie (*, raczej jednorodny niż segmentowy wygląd tkanek mięśniowych). Czas obserwacji w celu odnotowania braku bicia serca powinien wynosić co najmniej jedną minutę, przy czym należy zastosować powiększenie co najmniej 80-krotne.

C.50 Badanie toksyczności na *Myriophyllum spicatum* w układzie pozbawionym osadu

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 238 (2014). Służy ona do oceny toksyczności substancji chemicznych w stosunku do *Myriophyllum spicatum*, zanurzonej w wodzie rośliny dwuliściennej, gatunku z rodziny wodnikowatych. Metoda ta jest oparta na istniejącej metodzie badawczej ASTM (1) zmodyfikowanej do postaci układu badawczego pozbawionego osadu (2) na potrzeby szacowania wewnętrznej ekotoksyczności substancji chemicznych badanych (niezależnie od zachowania się badanej substancji chemicznej pod względem rozmieszczenia w wodzie i osadzie). Układ badawczy pozbawiony osadu charakteryzuje się niskim stopniem złożoności analitycznej (tylko w fazie wodnej), a uzyskane przy jego użyciu wyniki można analizować równoległe lub w porównaniu z wynikami uzyskanymi w ramach badania na gatunku *Lemna* (3); ponadto wymagane sterylne warunki pozwalają ograniczyć wpływ mikroorganizmów i glonów (wchłanianie/rozkład substancji chemicznej) do jak najniższego poziomu. Niniejsze badanie nie ma zastąpić innych badań toksyczności dla organizmów wodnych; powinno je raczej uzupełniać, tak aby możliwa była bardziej kompletna ocena zagrożeń i ryzyka, na jakie narażone są rośliny wodne. Niniejsza metoda badawcza została zweryfikowana w badaniu międzylaboratoryjnym (4).
2. Opisano szczegóły badania z wymianą (badanie półstatyczne) i bez wymiany (badanie statyczne) roztworu do badań. W zależności od celów badania oraz od wymogów regulacyjnych zaleca się zastosowanie metody półstatycznej, np. w przypadku substancji, które są szybko tracone z roztworu na skutek ulatniania się, adsorpcji, fotodegradacji, hydrolizy, strącania lub biodegradacji. Dalsze wskazówki przedstawiono w pozycji (5). Niniejsza metoda badawcza ma zastosowanie do substancji, w przypadku których zweryfikowano metodę badawczą (zob. szczegółowe informacje na temat sprawozdania z badania międzylaboratoryjnego (4)), lub do postaci użytkowych lub znanych mieszanin; jeżeli badana jest mieszanina, jej składniki powinny być w miarę możliwości zidentyfikowane i oznaczone ilościowo. Metoda badania na *Myriophyllum spicatum* w układzie pozbawionym osadu uzupełnia badanie toksyczności na *Myriophyllum spicatum* w układzie woda-osad (6). Przed zastosowaniem niniejszej metody badawczej do badania mieszaniny na potrzeby celu regulacyjnego należy zastanowić się nad tym, czy zastosowanie niniejszej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak – dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny.

ZASADA BADANIA

3. Stale rosnącym kulturom roślinnym *Myriophyllum spicatum* (tylko w zmodyfikowanej pożywce Andrewsa, zob. dodatek 2) pozwala się rosnać w postaci monokultur przy różnych stężeniach badanej substancji chemicznej przez 14 dni w układzie badawczym pozbawionym osadu. Celem badania jest ilościowe określenie oddziaływań substancji chemicznej na wegetatywny wzrost w tym okresie na podstawie ocen wybranych zmiennych pomiarowych. Zmierzonymi pomiarowymi są wzrost długości pędu, gałązek bocznych i korzeni, jak również zmiany mokrej masy i suchej masy oraz wzrost liczby okółków. Ponadto uwzględnia się charakterystyczne zmiany jakościowe w organizmach doświadczalnych, takie jak: zniekształcenie lub chloroza i nekroza, na które wskazuje żółknięcie lub białe i brązowe zabarwienie. Aby określić ilościowo skutki związane z substancją chemiczną, wzrost w roztworach do badań porównuje się ze wzrostem w grupach kontrolnych i wyznacza się stężenie powodujące zahamowanie wzrostu o określone $x\%$ i wyraża się je jako EC_x ; „ x ” może mieć dowolną wartość w zależności od wymogów regulacyjnych, np. EC_{10} , EC_{20} , EC_{50} . Należy zauważyć, że szacunkowe wartości EC_{10} i EC_{20} są wiarygodne i odpowiednie jedynie w badaniach, w których współczynniki zmienności w roślinach z grupy kontrolnej są niższe od szacowanego poziomu wpływu, tj. w przypadku dokładnie oszacowanej wartości EC_{20} współczynniki zmienności powinny wynosić $< 20\%$.
4. Należy określić zarówno średnią właściwą szybkość wzrostu (oszacowaną na podstawie ocen długości pędu głównego i trzech dodatkowych zmiennych pomiarowych), jak i przyrost (oszacowany na podstawie zwiększenia długości pędu głównego i trzech dodatkowych zmiennych pomiarowych) roślin poddawanych i niepoddawanych działaniu substancji chemicznej. Właściwą szybkość wzrostu (r) i przyrost (y) wykorzystuje się następnie do określenia odpowiednio $E_r C_x$ (np. $E_r C_{10}$, $E_r C_{20}$, $E_r C_{50}$) i $E_y C_x$ (np. $E_y C_{10}$, $E_y C_{20}$, $E_y C_{50}$).
5. Ponadto można statystycznie określić najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany, (LOEC) oraz najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian, (NOEC).

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

6. Należy dysponować metodą analityczną zapewniającą należytą czułość pozwalającą na oznaczenie ilościowe badanej substancji chemicznej w pożywce użytej do badania. Informacje o badanej substancji chemicznej, które mogą być przydatne w ustaleniu warunków badania obejmują wzór strukturalny, czystość, zanieczyszczenia, rozpuszczalność w wodzie, stabilność w wodzie i świetle, stała dysocjacji w środowisku kwaśnym (pK_a), współczynnik podziału oktanol/woda (K_{ow}), prężność par oraz biodegradowalność. Rozpuszczalność w wodzie i prężność par mogą posłużyć do obliczenia stałej Henry'ego, która wskaże, czy istnieje prawdopodobieństwo znaczących strat badanej substancji chemicznej w okresie badania. Pomoże to stwierdzić, czy należy podjąć szczególne kroki w celu ograniczenia takich strat. W przypadku gdy informacje na temat rozpuszczalności i stabilności badanej substancji chemicznej są niepewne, zaleca się oceniać je w warunkach badania, tj. uwzględniając pożywkę, temperaturę i warunki oświetlenia, które mają być zastosowane w badaniu.
7. Kontrola pH pożywki użytej do badania jest szczególnie ważna np. gdy bada się metale lub substancje, które są hydrolytycznie nietrwałe. Dalsze wskazówki dotyczące badania substancji chemicznych o właściwościach fizykochemicznych utrudniających ich badanie podano w wytycznych OECD (5).

WAŻNOŚĆ BADANIA

8. Aby badanie było ważne, czas podwojenia długości pędu głównego w próbie kontrolnej musi być mniejszy niż 14 dni. W przypadku zastosowania pożywki i warunków badania opisanych w niniejszej metodzie badawczej, kryterium to można spełnić stosując warunki badania statycznego lub półstatycznego.
9. Średni współczynnik zmienności w odniesieniu do przyrostu opartego na pomiarach mokrej masy pędów (tj. od rozpoczęcia do zakończenia badania) oraz dodatkowe zmienne pomiarowe (zob. pkt 37) w kulturach kontrolnych nie przekraczają 35 % między kontrpróbami.
10. Ponad 50 % kontrprób grupy kontrolnej przechowuje się środowisku sterylnym przez cały okres narażenia wynoszący 14 dni, co oznacza, że są wyraźnie pozbawione zanieczyszczeń roznoszonych przez inne organizmy, takie jak glony, grzyby i bakterie (przejrzysty roztwór). Uwaga: Wytyczne dotyczące sposobu oceny sterylności przedstawiono w sprawozdaniu z badania międzylaboratoryjnego (4).

SUBSTANCJA CHEMICZNA ODNIESIENIA

11. Sposobem sprawdzenia procedury badawczej może być zbadanie substancji chemicznych odniesienia, takich jak 3,5-dichlorofenol stosowany w badaniu międzylaboratoryjnym (4). z danych dotyczących badania międzylaboratoryjnego wynika, że średnie wartości EC_{50} 3,5-dichlorofenolu dla różnych zmiennych zależnych (zob. pkt 37–41 niniejszej metody badawczej) wynoszą od 3,2 mg/l do 6,9 mg/l (zob. sprawozdanie z badania międzylaboratoryjnego zawierające szczegółowe informacje na temat przedziałów ufności w odniesieniu do tych wartości). Wskazane jest badanie substancji chemicznej odniesienia co najmniej dwa razy do roku lub równoległe z określaniem toksyczności badanej substancji chemicznej, gdy badanie jest wykonywane z mniejszą częstotliwością.

OPIS METODY

Aparatura

12. Cały sprzęt mający kontakt z pożywkami użytymi do badania powinien być wykonany ze szkła lub innego chemicznie obojętnego materiału. Szklane naczynia używane do celów hodowli kultur i badania powinny być pozbawione zanieczyszczeń chemicznych, które mogłyby zostać wypłukane do pożywki użytej do badania, oraz powinny być sterylne. Naczynia badawcze powinny mieć dostateczną długość, tak aby pędy w naczyniach kontrolnych urosły w fazie wodnej, nieprzekraczając poziomu powierzchni pożywki użytej do badania na koniec badania. Zaleca się stosowanie próbek badawczych o grubych ściankach ze szkła borokrzemianowego bez wywinięcia, o średnicy wewnętrznej wynoszącej około 20 mm i długości około 250 mm, z nakładkami aluminiowymi.
13. Ze względu na fakt, że zmodyfikowana pożywka Andrewsa zawiera sacharozę (która stymuluje wzrost grzybów i bakterii), roztwory do badań należy przygotowywać w sterylnych warunkach. Przed użyciem sterylizuje się wszystkie ciecze i sprzęt. Sterylizację przeprowadza się poprzez obróbkę ogrzaniem powietrzem (210 °C) trwającą cztery godziny lub obróbkę w autoklawie trwającą 20 minut w temperaturze 121 °C. Ponadto wszystkie kolby, naczynia, miski itd. oraz inny sprzęt poddaje się opalaniu na sterylnym stole roboczym tuż przed użyciem.

14. Kultury i naczynia badawcze nie powinny być trzymane razem. Najłatwiej to osiągnąć, używając oddzielnych klimatycznych komór wzrostowych, inkubatorów lub pomieszczeń. Oświetlenie i temperatura powinny być regulowane i utrzymywane na stałym poziomie.

Organizm doświadczalny

15. *Myriophyllum spicatum* – zanurzona w wodzie roślina dwuliścienna – gatunek z rodziny wodnikowatych. W okresie od czerwca do sierpnia niepozorne różowobiałe kwiaty wystają ponad powierzchnię wody. Rośliny są zakorzenione w gruncie przez system solidnych kłączy i można je znaleźć na całej półkuli północnej w eutroficznych, jednak niezanieczyszczonych i zawierających większe ilości wapnia wodach stojących na podłożu mulistym. *Myriophyllum spicatum* preferuje wodę słodką, ale występuje również w wodach słonych.
16. Do przeprowadzenia badania toksyczności w układzie pozbawionym osadu konieczne są sterylne rośliny. Jeżeli laboratorium badawcze nie posiada regularnych kultur *Myriophyllum spicatum* sterylne materiał roślinny można otrzymać z innego laboratorium, a (niesterylne) materiał roślinny można zebrać na określonym terenie lub może on zostać dostarczony przez dostawcę handlowego; jeżeli rośliny pochodzą z terenu należy zaplanować weryfikację taksonomiczną gatunków. Jeżeli rośliny zostały zebrane na określonym terenie lub zostały dostarczone przez dostawcę handlowego, przed użyciem należy je wysterylizować (1) i trzymać przez co najmniej osiem tygodni w kulturze w tej samej pożywce, co użyta do badania. Miejsca w terenie wykorzystane do zebrania kultur wyjściowych muszą być wolne od ewidentnych źródeł zanieczyszczenia. Należy zwrócić szczególną uwagę na zapewnienie, aby podczas zbierania *Myriophyllum spicatum* na określonym terenie, zwłaszcza w regionach, na których może krzyżować się z innymi gatunkami *Myriophyllum*, zebrano odpowiednie gatunki roślin. Jeżeli uzyskuje się je z innego laboratorium, należy przechowywać je w podobny sposób przez co najmniej trzy tygodnie. W sprawozdaniu należy zawsze podać źródło materiału roślinnego oraz gatunek wykorzystany do badania.
17. Jakość i jednorodność roślin wykorzystanych do badania będzie mieć znaczący wpływ na jego wynik i dlatego należy je starannie wybierać. Należy stosować młode, szybko rosnące rośliny bez widocznych uszkodzeń lub odbarwień (chlorozy). Szczegółowe informacje na temat przygotowywania organizmów doświadczalnych znajdują się w dodatku 4.

Hodowla

18. Aby zmniejszyć częstotliwość prac w zakresie utrzymania kultur (np. gdy przez pewien okres nie planuje się badań nad *Myriophyllum*), kultury można utrzymywać w warunkach słabszego oświetlenia i obniżonej temperatury ($50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$). Szczegóły dotyczące hodowli kultur podano w dodatku 3.
19. Co najmniej 14–21 dni przed badaniem dostateczną liczbę organizmów doświadczalnych przenosi się aseptycznie do świeżej sterylnej pożywki i przez 14–21 dni hoduje się kulturę w warunkach badania. Szczegółowe informacje na temat przygotowywania prekultury znajdują się w dodatku 4.

Pożywka użyta do badania

20. Zaleca się stosowanie pożywki składającej się tylko z jednego składnika odżywczego w odniesieniu do *Myriophyllum spicatum* w układzie badawczym pozbawionym osadu, jak opisano w dodatku 2. Do hodowli kultur i badania *Myriophyllum spicatum*, jak opisano w pkt (1), zalecana jest modyfikacja pożywki Andrews. Pięć oddzielnie przygotowanych roztworów podstawowych składników odżywczych z dodatkiem 3-procentowego roztworu sacharozy posłuży do utworzenia zmodyfikowanej pożywki Andrews. Szczegółowe informacje na temat przygotowywania pożywki znajdują się w dodatku 2.
21. Aby uzyskać roztwory do badań (w stosownych przypadkach poprzez rozcieńczenie), potrzebna jest zmodyfikowana pożywka Andrews o dziesięciokrotnie większym stężeniu. Skład tej pożywki podano w dodatku 2.

Roztwory do badań

22. Roztwory do badań przygotowuje się zazwyczaj przez rozcieńczenie roztworu podstawowego. Roztwory podstawowe badanej substancji chemicznej sporządza się zwykle przez rozpuszczenie substancji chemicznej w wodzie demineralizowanej (tj. destylowanej lub dejonizowanej). Dodawanie składników odżywczych będzie możliwe dzięki wykorzystaniu zmodyfikowanej pożywki Andrews o dziesięciokrotnie większym stężeniu.

23. Roztwory podstawowe badanej substancji chemicznej można poddać sterylizacji poprzez obróbkę w autoklawie trwającą 20 minut w temperaturze 121 °C lub poddać sterylizacji przez filtrowanie, pod warunkiem że stosowana technika sterylizacji nie denaturuje badanej substancji chemicznej. Roztwory do badań można również przygotować w sterylnej wodzie demineralizowanej lub pożywce w sterylnych warunkach. Podczas wybierania procedury sterylizacji roztworów podstawowych badanej substancji chemicznej należy uwzględnić stabilność termiczną i adsorpcję na różnych powierzchniach. W związku z tym zaleca się przygotowywanie roztworów podstawowych w warunkach sterylnych tj. stosując sterylny materiał do rozpuszczania badanej substancji chemicznej w warunkach sterylnych (np. sterylizacja w płomieniach, kaptury przepływowe itd.) i w wodzie sterylnej. Taka technika przygotowywania sterylnych roztworów podstawowych ma zastosowanie zarówno do substancji, jak i mieszanin.
24. Najwyższe badane stężenie badanej substancji chemicznej zwykle nie powinno przekraczać rozpuszczalności tej substancji w wodzie w warunkach badania. W przypadku badanych substancji chemicznych o słabej rozpuszczalności w wodzie może być konieczne przygotowanie stężonego roztworu podstawowego lub rozproszenie substancji chemicznej przy użyciu rozpuszczalnika organicznego lub środka dyspergującego, aby ułatwić dodanie precyzyjnych ilości badanej substancji chemicznej do pożywki użytej do badania oraz jej rozproszenie i rozpuszczenie. Należy dołożyć wszelkich starań, aby uniknąć wykorzystania takich materiałów. Użycie pomocniczych rozpuszczalników lub środków dyspergujących nie powinno powodować fitotoksyczności. Na przykład do powszechnie używanych rozpuszczalników, które nie powodują fitotoksyczności w stężeniach do 100 µl/l, należą aceton i dimetyloformamid. W przypadku użycia rozpuszczalnika lub środka dyspergującego w sprawozdaniu należy podać jego stężenie końcowe, które powinno być utrzymane na minimalnym poziomie ($\leq 100 \mu\text{l/l}$), i we wszystkich grupach badanych i grupach kontrolnych należy zachować takie samo stężenie rozpuszczalnika lub środka dyspergującego. Dalsze wskazówki na temat wykorzystania środków dyspergujących podano w pkt (5).

Grupy badane i kontrolne

25. W doborze odpowiednich badanych stężeń pomocna będzie uprzednia znajomość toksyczności badanej substancji chemicznej w stosunku do *Myriophyllum spicatum* z badania ustalającego zakres. Ostateczne badanie toksyczności powinno zwykle obejmować od pięciu (podobnie jak w przypadku badania zahamowania wzrostu *Lemna*, rozdział C.26 niniejszego załącznika) do siedmiu badanych stężeń uporządkowanych w postaci szeregu geometrycznego; należy je wybrać w celu ujęcia wartości NOEC i EC_{50} w zakresie stężeń (zob. poniżej). W miarę możliwości badane stężenia nie powinny się różnić o wielokrotność większą niż 3,2; można jednak zastosować większą wartość, gdy krzywa stężenie-odpowiedź jest płaska. Jeżeli użyto mniej niż pięć stężeń, należy podać uzasadnienie. Przy każdym badanym stężeniu należy zastosować co najmniej pięć kontrprób.
26. Przy ustalaniu zakresu badanych stężeń (w przypadku badania ustalającego zakres lub ostatecznego badania toksyczności) należy wziąć pod uwagę, co następuje:

aby określić EC_x , badane stężenia powinny obejmować swoim zakresem wartość EC_x w celu zapewnienia odpowiedniego poziomu ufności. Na przykład jeżeli oszacowuje się EC_{50} , to najwyższe badane stężenie powinno być większe od wartości EC_{50} . Jeżeli wartość EC_{50} leży poza zakresem badanych stężeń, to związane z tym przedziały ufności będą większe, a odpowiednia ocena statystycznego dopasowania modelu może nie być możliwa;

jeżeli celem jest oszacowanie LOEC/NOEC, to najniższe badane stężenie powinno być dostatecznie niskie, aby wzrost nie był znacząco mniejszy niż wzrost w grupie kontrolnej. Ponadto najwyższe badane stężenie powinno być dostatecznie wysokie, aby wzrost był znacząco mniejszy niż w grupie kontrolnej. Jeśli jest inaczej, badanie musi zostać powtórzone przy zastosowaniu innego zakresu stężeń (chyba że najwyższe stężenie równe jest granicznej rozpuszczalności lub maksymalnemu wymaganemu stężeniu granicznemu np. 100 mg/l).

27. Każde badanie powinno obejmować grupy kontrolne zawierające taką samą pożywkę, taki sam organizm doświadczalny (wybranie materiału roślinnego jak najbardziej jednorodnego, świeżych gałązek bocznych z prekultur, skróconych do długości 2,5 cm od podstawy) oraz takie same warunki otoczenia i procedury jak naczynia badawcze, lecz bez badanej substancji chemicznej. Jeżeli korzysta się z pomocniczego rozpuszczalnika lub środka dyspergującego, należy włączyć dodatkową grupę kontrolną z obecnością rozpuszczalnika/środka dyspergującego o tym samym stężeniu co w naczyniach z badaną substancją chemiczną. Liczba naczyń kontrolnych z kontrpróbą (oraz, w stosownym przypadku, naczyń z rozpuszczalnikiem) powinna wynosić co najmniej dziesięć.

28. Jeżeli wyznaczenie NOEC nie jest wymagane, plan badania można zmienić, zwiększając liczbę stężeń i zmniejszając liczbę kontrprób przypadających na stężenie. W każdym przypadku liczba kontrolnych kontrprób powinna wynosić jednak co najmniej dziesięć.

Narażenie

29. Świeże gałązki boczne z prekultury, skrócone do długości 2,5 cm od podstawy są losowo umieszczane w naczyniach badawczych w warunkach aseptycznych; każde naczynie badawcze powinno zawierać jedną gałąź boczną o długości 2,5 cm, która powinna mieć merystem wierzchołkowy na jednym końcu. Wybrany materiał roślinny powinien być tej samej jakości w każdym naczyniu badawczym.
30. Wymagany jest losowy plan umieszczania naczyń badawczych w inkubatorze, aby ograniczyć do minimum wpływ przestrzennych różnic światłości lub temperatury. Wymagany jest również zblokowany plan lub losowe przestawianie (lub częstsze przestawianie) naczyń podczas prowadzenia obserwacji.
31. Jeżeli ze wstępnego badania stabilności wynika, że nie można utrzymać stężenia badanej substancji chemicznej (tj. zmierzone stężenie spada poniżej 80 % zmierzonego stężenia początkowego) w czasie trwania badania (14 dni), zaleca się stosowanie badania półstatycznego. W takim przypadku rośliny należy wystawić na działanie świeżo przygotowanych roztworów do badań i roztworów kontrolnych co najmniej raz w trakcie badania (np. w 7. dniu). Częstotliwość narażenia na świeżą pożywkę będzie zależeć od stabilności badanej substancji chemicznej; do utrzymania prawie stałych stężeń wysoce niestabilnych lub lotnych substancji chemicznych może być wymagana większa częstotliwość.
32. Scenariusz narażenia poprzez nałożenie na liście (natrysk) nie jest objęty niniejszą metodą badawczą.

Warunki badania

33. Należy zastosować oświetlenie w postaci ciepłego lub chłodnego białego światła fluorescencyjnego w celu zapewnienia natężenia promieniowania z zakresu $100\text{--}150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mierzonego jako promieniowanie fotosyntetycznie czynne (400–700 nm) w punktach o takiej samej odległości od źródła światła na dnie naczyń badawczych (równoważnym około 6 000–9 000 luksów) i przy użyciu cyklu dzień/noc odpowiadającego 16:8 godzinom. Na wartość pomiarową będzie mieć wpływ metoda detekcji i pomiaru światła, w szczególności typ czujnika. Nad czujniki jednokierunkowe przedkładane są czujniki sferyczne (które reagują na światło padające pod wszystkimi kątami powyżej i poniżej płaszczyzny pomiaru) oraz czujniki „kosinusowe” (które reagują na światło padające pod wszystkimi kątami powyżej płaszczyzny pomiaru) i dają wyższe odczyty w przypadku opisywanego tu typu wielopunktowego źródła światła.
34. Temperatura w naczyniach badawczych powinna wynosić $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Dodatkowej uwagi wymaga dryft pH w szczególnych przypadkach, takich jak podczas badania nietrwałych substancji chemicznych lub metali; wartość pH powinna pozostawać w zakresie 6–9. Dalsze wskazówki przedstawiono w pozycji (5).

Czas trwania

35. Badanie zostaje zakończone po 14 dniach od przeniesienia roślin do naczyń badawczych.

Pomiary i oznaczenia analityczne

36. Na początku badania długość pędu głównego organizmu doświadczalnego wynosi 2,5 cm (zob. pkt 29); jest mierzona za pomocą linijki (zob. dodatek 4) lub fotografii i analizy obrazu. Długość pędu głównego organizmu doświadczalnego wydającego się wyglądać normalne lub nienormalne należy określić na początku badania, co najmniej raz w ciągu 14-dniowego okresu narażenia oraz na zakończenie badania. Uwaga: Osoby, które nie mają analizy obrazu, mogą zastosować rozwiązanie alternatywne – jeżeli stół roboczy jest sterylizowany przed umieszczeniem roślin w naczyniach badawczych, można również użyć jałowej linijki w celu zmierzenia długości pędu głównego na początku i w trakcie badania. Należy odnotować zmiany w rozwoju roślin, np. pod względem deformacji pędów, wyglądu, oznak martwicy, chlorozy, rozbicia lub utraty zdolności utrzymywania się na powierzchni wody oraz długości i wyglądu korzeni. Należy również odnotować istotne cechy pożywki użytej do badania (np. obecność nierozpuszczonego materiału, wzrost glonów, grzybów i bakterii w naczyniu badawczym).

37. Oprócz określenia długości pędu głównego w trakcie badania należy ocenić również wpływ badanej substancji chemicznej na trzy (lub więcej) z następujących zmiennych pomiarowych:
- całkowita długość gałązek bocznych
 - całkowita długość pędów
 - całkowita długość korzenia
 - mokra masa
 - sucha masa
 - liczba okółków
- Uwaga 1:* Obserwacje poczynione podczas badania ustalającego zakres mogą być pomocne w wyborze odpowiednich dodatkowych zmiennych pomiarowych spośród sześciu wymienionych powyżej.
- Uwaga 2:* Ustalenie mokrej i suchej masy (parametrów iv i v) jest wysoce pożądane.
- Uwaga 3:* Ze względu na fakt, że sacharoza i światło (narażenie korzeni na światło w trakcie badania) mogą mieć wpływ na nośniki transportu auksyny (roślinnego hormonu wzrostu) oraz że niektóre substancje chemiczne mogą działać podobnie do auksyny, uwzględnienie punktów końcowych dotyczących korzeni (parametr iii) budzi wątpliwości.
- Uwaga 4:* Wyniki badania międzylaboratoryjnego wskazują wysokie współczynniki zmienności (> 60 %) w odniesieniu do całkowitej długości gałązek bocznych (parametr i). Całkowita długość gałązek bocznych jest w każdym przypadku jest zresztą uwzględniona w pomiarze całkowitej długości pędów (parametr ii), który wykazuje bardziej akceptowalne współczynniki zmienności, wynoszące < 30 %.
- Uwaga 5:* Ze względu na powyższe rozważania zalecane główne punkty końcowe pomiarowe są następujące: całkowita długość pędów, mokra masa i sucha masa (parametry ii, iv i v); decyzję o użyciu parametru vi – liczby okółków – pozostawia się badaczowi.
38. Długość pędu głównego i liczba okółków mają tę zaletę, że mogą być określone dla każdego naczynia badawczego i kontrolnego na początku, podczas i na koniec badania na podstawie fotografii i analizy obrazu, chociaż można również posłużyć się w tym celu (jałową) linijką.
39. Całkowitą długość gałązek bocznych, całkowitą długość korzenia (jako sumę wszystkich gałązek bocznych lub korzeni) oraz całkowitą długość pędów (jako sumę długości pędu głównego i całkowitej długości gałązek bocznych) można zmierzyć za pomocą linijki na koniec okresu narażenia.
40. Suchą lub mokrą masę należy określić na początku badania na podstawie próbki prekultury reprezentatywnej dla tego, co jest użyte do rozpoczęcia badania, oraz na końcu badania przy użyciu materiału roślinnego z każdego naczynia badawczego i kontrolnego.
41. Całkowitą długość gałązek bocznych, całkowitą długość pędów, całkowitą długość korzenia, mokrą masę, suchą masę oraz liczbę okółków można ustalić w następujący sposób:
- całkowita długość gałązek bocznych: długość gałązek bocznych można ustalić poprzez pomiar wszystkich gałązek bocznych za pomocą linijki na koniec okresu narażenia. Całkowita długość gałązek bocznych jest sumą długości wszystkich gałązek bocznych w każdym naczyniu badawczym i kontrolnym;
 - całkowita długość pędów: długość pędu głównego może ustalić przy użyciu analizy obrazu lub za pomocą linijki. Całkowita długość pędów jest sumą całkowitej długości gałązek bocznych i długości pędu głównego w każdym naczyniu badawczym i kontrolnym na koniec okresu narażenia;

- iii. całkowita długość korzenia: długość korzenia można ustalić poprzez pomiar wszystkich korzeni za pomocą linijki na koniec okresu narażenia. Całkowita długość korzenia jest sumą długości wszystkich korzeni w każdym naczyniu badawczym i kontrolnym;
- iv. mokra masa: mokrą masę można ustalić poprzez zważenie organizmów doświadczalnych na koniec okresu narażenia. Cały materiał roślinny z każdego naczynia badawczego i kontrolnego płucze się wodą destylowaną i osusza papierem celulozowym. Po tym przygotowaniu mokrą masę ustala się poprzez ważenie. Początkową biomasę (mokrą masę) określa się na podstawie próbki organizmów doświadczalnych pobranej z tej samej partii użytej do zaszczepienia naczyń badawczych;
- v. sucha masa: po zakończeniu przygotowań na potrzeby ustalenia mokrej masy organizmy doświadczalne suszy się w temperaturze 60 °C do uzyskania stałej masy. Masa ta jest suchą masą. Początkową biomasę (suchą masę) określa się na podstawie próbki organizmów doświadczalnych pobranej z tej samej partii użytej do zaszczepienia naczyń badawczych;
- vi. liczba okółków: liczone są wszystkie okółki wzdłuż pędu głównego.

Częstotliwość dokonywania pomiarów i oznaczeń analitycznych

42. Jeżeli zastosowany jest plan badania statycznego, należy zmierzyć pH każdej grupy badanej na początku i na końcu badania. Jeżeli zastosowany jest plan badania półstatycznego, należy zmierzyć pH w każdej partii „świeżego” roztworu do badań przed każdą wymianą oraz w odpowiednich „zużytych” roztworach.
43. Światłość należy zmierzyć w komorze wzrostowej, inkubatorze lub pomieszczeniu w różnych punktach o takiej samej odległości od źródła światła co organizmy doświadczalne. Pomiaru należy dokonać co najmniej raz w ciągu badania. Temperaturę pożywki w naczyniu zastępczym utrzymywanym w takich samych warunkach w komorze wzrostowej, inkubatorze lub pomieszczeniu należy rejestrować co najmniej codziennie (lub stale – przy użyciu rejestratora).
44. W trakcie badania stężenia badanej substancji chemicznej oznacza się w odpowiednich odstępach czasu. W badaniach statycznych minimalnym wymogiem jest oznaczenie stężeń na początku i na końcu badania.
45. W badaniach półstatycznych, w przypadku których nie oczekuje się, że stężenia badanych substancji chemicznych utrzymają się w granicach $\pm 20\%$ stężenia nominalnego, niezbędne jest przeprowadzenie analizy wszystkich świeżo przygotowanych roztworów do badań oraz tych samych roztworów przy każdej wymianie. W odniesieniu do tych badań, w których zmierzone stężenia początkowe badanych substancji chemicznych nie mieszczą się w granicach $\pm 20\%$ stężenia nominalnego, lecz można przedstawić wystarczające dowody wykazujące, że stężenia początkowe są powtarzalne i stabilne (tj. zawierają się w granicach 80–120 % stężenia początkowego), oznaczenia chemiczne można jednak przeprowadzać tylko przy najwyższych i najniższych badanych stężeniach. We wszystkich przypadkach oznaczenie badanych stężeń przed wymianą należy przeprowadzić tylko na jednym naczyniu z kontrpróbą dla każdego badanego stężenia (lub na połączonych zawartościach naczyń z kontrpróbą).
46. Jeżeli istnieją dowody, że badane stężenie zostało zadowalająco utrzymane w granicach $\pm 20\%$ nominalnego lub zmierzonego stężenia początkowego przez cały czas trwania badania, to analizę wyników można oprzeć na nominalnych lub zmierzonych wartościach początkowych. Jeżeli odchylenie od nominalnego lub zmierzonego stężenia początkowego nie mieści się w zakresie $\pm 20\%$, to analizę wyników należy oprzeć na średniej geometrycznej stężenia podczas narażenia lub na modelach opisujących spadek stężenia badanej substancji chemicznej (5).

Badanie graniczne

47. W niektórych okolicznościach, na przykład gdy badanie wstępne wskazuje, że badana substancja chemiczna nie ma efektów toksycznych w stężeniach do 100 mg/l lub do jej rozpuszczalności granicznej w pożywce użytej do badania, lub – w przypadku postaci użytkowej – do jej dyspergowalności granicznej, można przeprowadzić badanie graniczne polegające na porównaniu reakcji w grupie kontrolnej i jednej grupie badanej (przy stężeniu 100 mg/l lub równym granicznej rozpuszczalności). Zdecydowanie zaleca się, aby takie badanie było poparte analizą stężenia ekspozycyjnego. Do badania granicznego stosują się wszystkie wcześniej opisane warunki badania i kryteria ważności, z tym że liczba badanych kontrprób powinna zostać podwojona. Wzrost w grupie kontrolnej i grupie badanej można poddać analizie przy użyciu testu statystycznego do porównywania średnich, np. testu t-Studenta.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Zmienne zależne

48. Celem badania jest określenie wpływu badanej substancji chemicznej na wzrost vegetatywny *Myriophyllum spicatum*. Niniejsza metoda badawcza służy opisaniu dwóch zmiennych zależnych.
- a) Średnia właściwa szybkość wzrostu: tę zmienną zależną oblicza się na podstawie zmian logarytmów długości pędu głównego, a ponadto na podstawie zmian logarytmów innych parametrów pomiarowych, tj. całkowitej długości pędów, mokrej masy, suchej masy lub liczby okółków, w czasie (wyrażonych na dzień) w grupach kontrolnych i w każdej grupie badanej. Uwaga: W odniesieniu do parametrów pomiarowych dotyczących całkowitej długości gałązek bocznych i całkowitej długości korzenia obliczenie średniej właściwej szybkości wzrostu nie jest możliwe. Na początku badania organizm doświadczalny nie ma żadnych gałązek bocznych ani korzeni (jak wynika z przygotowania prekultury); gdy wartość początkowa wynosi zero, obliczenie średniej właściwej szybkości wzrostu nie jest określone.
- b) Przyrost: tę zmienną zależną oblicza się na podstawie zmian długości pędu głównego, a ponadto na podstawie zmian innych parametrów pomiarowych, tj. najlepiej całkowitej długości pędów, mokrej masy, suchej masy lub liczby okółków, oraz innych parametrów, jeżeli zostaną uznane za przydatne, w grupach kontrolnych i w każdej grupie badanej aż do końca badania.
49. Oszacowania toksyczności powinny być oparte na długości pędu głównego oraz na trzech dodatkowych zmiennych pomiarowych (tj. najlepiej całkowitej długości pędów, mokrej masie, suchej masie lub liczbie okółków, zob. pkt 37 oraz uwagi 2, 4 i 5 do tego punktu), ponieważ niektóre substancje chemiczne mogą mieć znacznie większy wpływ na inne zmienne pomiarowe niż na długość pędu głównego. Skutek ten nie zostałby wykryty przy obliczeniu jedynie długości pędu głównego.

Średnia właściwa szybkość wzrostu

50. Średnią właściwą szybkość wzrostu dla konkretnego okresu oblicza się jako logarytmiczny przyrost zmiennych wzrostu – długości pędu głównego oraz trzech dodatkowych zmiennych pomiarowych (tj. całkowitej długości pędów, mokrej masy, suchej masy lub liczby okółków) – dla każdej próby kontrolnej i dla każdej grupy badanej, stosując w tym celu poniższy wzór:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

gdzie:

μ_{i-j} : średnia właściwa szybkość wzrostu od czasu i do czasu j,

N_i : zmienna pomiarowa w naczyniu badawczym lub kontrolnym o czasie i,

N_j : zmienna pomiarowa w naczyniu badawczym lub kontrolnym o czasie j,

t: czas mierzony od i do j.

Dla każdej grupy badanej i kontrolnej należy wyliczyć średnią wartość szybkości wzrostu wraz z oszacowaniami wariancji.

51. Średnią właściwą szybkość wzrostu należy obliczyć dla całego okresu badania (czas „i” w powyższym równaniu jest początkiem badania, a czas „j” jest końcem badania). Dla każdego badanego stężenia i dla każdej grupy kontrolnej należy obliczyć średnią wartość średniej właściwej szybkości wzrostu wraz z oszacowaniami wariancji. Ponadto należy ocenić szybkość wzrostu dla poszczególnych odcinków, aby określić wpływ badanej substancji chemicznej występującej w okresie narażenia (np. przez badanie krzywych wzrostu przekształconych na postać logarytmiczną).

52. Następnie można obliczyć procentowe zahamowanie szybkości wzrostu (I_r) dla każdego badanego stężenia (grupy badanej) zgodnie z poniższym wzorem:

$$\%I_r = \frac{(\mu_c - \mu_T)}{\mu_c} \times 100$$

gdzie:

% I_r : procentowe zahamowanie średniej właściwej szybkości wzrostu

μ_c : średnia wartość μ w grupie kontrolnej

μ_T : średnia wartość μ w grupie badanej

Przyrost

53. Wpływ na przyrost określa się na podstawie zmiennej pomiarowej, którą jest długość pędu głównego, oraz trzech dodatkowych zmiennych pomiarowych (tj. najlepiej całkowitej długości pędów, mokrej masy, suchej masy lub liczby okółków) obecnych w każdym naczyniu badawczym na początku i na końcu badania. Dla suchej masy lub mokrej masy początkową biomasę określa się na podstawie próbki organizmów doświadczalnych pobranej z tej samej partii użytej do zaszczepienia naczyń badawczych. Dla każdego badanego stężenia i próby kontrolnej należy obliczyć średnią wartość przyrostu wraz z oszacowaniami wariancji. Średnie procentowe zahamowanie przyrostu (% I_y) można obliczyć dla każdej grupy badanej w następujący sposób:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

gdzie:

% I_y : procentowe zmniejszenie przyrostu

b_c : biomasa końcowa minus biomasa początkowa dla grupy kontrolnej

b_T : biomasa końcowa minus biomasa początkowa dla grupy badanej

Czas podwojenia

54. Aby określić czas podwojenia (T_d) długości pędu głównego oraz spełnienie przez badanie tego kryterium ważności (zob. pkt 8), używa się poniższego wzoru z danymi uzyskanymi z naczyń kontrolnych:

$$T_d = \ln 2 / \mu$$

gdzie μ to średnia właściwa szybkość wzrostu wyznaczona w sposób opisany w pkt 50–52.

Wykreślanie krzywych stężenie-odpowiedź

55. Należy wykreślić krzywe stężenie-odpowiedź wiążące średnie procentowe zahamowanie zmiennej zależnej (I_r lub I_y obliczone w sposób wskazany w pkt 53) i logarytm stężenia badanej substancji chemicznej.

Oszacowanie EC_x

56. Oszacowania EC_x powinny być oparte zarówno na średniej właściwej szybkości wzrostu (E_rC_x), jak i na przyroście (E_yC_x), przy czym każdy z tych parametrów powinien być z kolei oparty na długości pędu głównego oraz ewentualnie na dodatkowych zmiennych pomiarowych (tj. najlepiej na całkowitej długości pędów, mokrej masie, suchej masie lub liczbie okółków). Wynika to stąd, że istnieją takie substancje chemiczne, które wywierają różny wpływ na długość pędu głównego i inne zmienne pomiarowe. Pożądanymi parametrami toksyczności są więc cztery wartości EC_x dla każdego obliczonego poziomu zahamowania x : E_rC_x (długość pędu głównego); E_rC_x (tj. najlepiej całkowita długość pędów, mokra masa, sucha masa lub liczba okółków); E_yC_x (długość pędu głównego); oraz E_yC_x (tj. najlepiej całkowita długość pędów, mokra masa, sucha masa lub liczba okółków).

57. Należy zauważyć, że wartości EC_x obliczone przy użyciu tych dwóch zmiennych zależnych nie są porównywalne i różnicę tę należy uwzględnić przy wykorzystywaniu wyników badania. Jeżeli spełnione są warunki badania określone w niniejszej metodzie badawczej, wartości EC_x oparte na średniej właściwej szybkości wzrostu ($E_r C_x$) będą w większości przypadków wyższe od wyników opartych na przyroście ($E_p C_x$) ze względu na podstawę matematyczną tych podejść. Nie należy interpretować tego jako różnicy we wrażliwości pomiędzy tymi dwiema zmiennymi zależnymi, lecz jedynie jako stwierdzenie, że wartości te są różne pod względem matematycznym.

Procedury statystyczne

58. Celem jest uzyskanie ilościowej zależności stężenie-odpowiedź za pomocą analizy regresji. Możliwe jest zastosowanie ważonej regresji liniowej po przeprowadzeniu transformacji linearyzującej danych dotyczących reakcji – na przykład do modeli probit, logit albo Weibulla (7), lecz preferowane są procedury regresji nieliniowej, które lepiej sprawdzają się w przypadku nieuniknionych nieregularności danych i odchyłeń od wyrównanych rozkładów. Przy zbliżaniu się do zerowego albo całkowitego zahamowania nieregularności takie mogą zostać powiększone przez transformację, zakłócając analizę (7). Należy zwrócić uwagę, że standardowe metody analizy przy użyciu transformat probit, logit albo Weibulla są przeznaczone do stosowania do danych binarnych (np. dotyczących upadkowości lub przeżywalności) i powinny zostać zmodyfikowane, aby uwzględnić dane dotyczące szybkości wzrostu lub przyrostu. Szczegółowe procedury wyznaczania wartości EC_x na podstawie ciągłych danych można znaleźć w (8) (9) (10).
59. Dla każdej zmiennej zależnej, która ma być analizowana, należy zastosować zależność stężenie-odpowiedź do obliczenia oszacowań punktowych wartości EC_x . W miarę możliwości dla każdego oszacowania należy określić granice ufności na poziomie 95 %. Zgodność danych reakcji z modelem regresji należy ocenić graficznie lub statystycznie. Analizę regresji należy przeprowadzić z zastosowaniem reakcji z poszczególnych kontrprób, a nie średnich z grup badanych.
60. Oszacowania wartości EC_{50} i granice ufności można również otrzymać przy użyciu interpolacji liniowej z zastosowaniem metody bootstrap (10), jeżeli dostępne modele/metody regresji są nieodpowiednie dla danych.
61. W celu oszacowania LOEC, a następnie NOEC konieczne jest porównanie średnich z grup badanych przy użyciu technik analizy wariancji (ANOVA). Średnią dla każdego stężenia następnie porównuje się ze średnią kontrolną przy użyciu odpowiedniej metody wielokrotnego porównania lub testu trendu. Przydatny może być test Dunnetta lub Williama (12) (13) (14) (15) (16). Należy ocenić, czy przyjęte w ANOVA założenie jednorodności wariancji pozostaje ważne. Ocenę tę można przeprowadzić graficznie albo za pomocą formalnego testu (15). Odpowiednimi do tego celu testami są testy Levene'a lub Bartletta. Niespełnienie założenia o jednorodności wariancji można niekiedy skorygować za pomocą transformacji logarytmicznej danych. Jeżeli heterogeniczność wariancji jest ekstremalna i nie można jej skorygować przez transformację, należy rozważyć analizę za pomocą takich metod jak regresyjne testy Jonckheere'a. Dodatkowe wskazówki dotyczące wyznaczania NOEC można znaleźć w (10).
62. Najnowsze osiągnięcia naukowe doprowadziły do tego, że zaleca się odstąpienie od stosowania pojęcia NOEC i zastąpienie go opartymi o regresję oszacowaniami punktowymi wartości EC_x . Dla niniejszego badania nad wywłócznikiem nie ustalono odpowiedniej wartości x . Wydaje się jednak, że odpowiedni jest przedział 10–20 % (w zależności od wybranej zmiennej zależnej), a najlepiej należy podać zarówno EC_{10} , jak i EC_{20} oraz ich granice ufności.

Sprawozdawczość

63. Sprawozdanie z badania zawiera następujące informacje.

Badana substancja chemiczna

Substancja jednoskładnikowa:

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

Substancja wieloskładnikowa, UVCB lub mieszanina:

- opisane w miarę możliwości poprzez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

Gatunek doświadczalny

- nazwa systematyczna i źródło.

Warunki badania

- stosowana procedura badawcza (statyczna lub półstatyczna);
- data rozpoczęcia badania i czas jego trwania;
- pożywka użyta do badań;
- opis układu doświadczalnego: naczynia badawcze i przykrywki, objętości roztworów, długość pędu głównego w naczyniu badawczym na początku badania;
- badane stężenia (nominalne i zmierzone, w stosownych przypadkach) oraz liczba kontrprób na stężenie;
- metody przygotowywania roztworów podstawowych i roztworów do badań, w tym zastosowanie jakichkolwiek rozpuszczalników lub środków dyspergujących;
- temperatura podczas badania;
- źródło światła, światłość i jednorodność światła;
- wartości pH pożywki użytej do badań i pożywki kontrolnej;
- metoda analizy badanej substancji chemicznej wraz z odpowiednimi danymi oceny jakości (badania walidacyjne, odchylenia standardowe lub granice ufności analiz);
- metody określania długości pędu głównego i innych zmiennych pomiarowych, np. całkowitej długości gałązek bocznych, całkowitej długości pędów, całkowitej długości korzenia, mokrej masy, suchej masy lub liczby okółków;
- stan kultury (sterylny lub niesterylny) w każdym naczyniu badawczym i kontrolnym przy każdej obserwacji;
- wszelkie odstępstwa od niniejszej metody badawczej.

Wyniki

- dane pierwotne: długość pędu głównego oraz inne zmienne pomiarowe w każdym naczyniu badawczym i kontrolnym podczas każdej obserwacji i analizy;
- średnie i odchylenia standardowe dla każdej zmiennej pomiarowej;
- krzywe wzrostu dla każdej zmiennej pomiarowej;
- obliczone zmienne zależne dla każdej kontrpróby poddanej działaniu substancji chemicznej wraz z wartościami średnimi i współczynnikiem zmienności dla kontrprób;
- graficzne przedstawienie zależności stężenie/skutek;
- oszacowania toksycznych punktów końcowych dla zmiennych zależnych, np. EC_{50} , EC_{10} , EC_{20} , oraz związane z nimi przedziały ufności. LOEC i NOEC, jeżeli zostały obliczone, oraz metody statystyczne użyte do ich wyznaczenia;
- jeżeli zastosowano ANOVA – wielkość wpływu, który można wykryć (np. najmniejsza znacząca różnica);
- wszelka stymulacja wzrostu stwierdzona w którejkolwiek próbie poddanej działaniu substancji chemicznej;
- wszelkie wizualne oznaki fitotoksyczności, jak również obserwacje roztworów do badań;
- omówienie wyników, w tym ewentualny wpływ na wynik badania będący skutkiem odstępstw od niniejszej metody badawczej.

BIBLIOGRAFIA

- (1) ASTM Designation E 1913-04, Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.
 - (2) Maletzki, D. *et al.* (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch*, nr 22, s. 702–710.
 - (3) Rozdział C.26 niniejszego załącznika: *Badanie inhibicji wzrostu u Lemna sp.*
 - (4) OECD (2014), „*Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system”, Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria dotycząca badań i oceny, nr 205, OECD Publishing, Paryż.
 - (5) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria dotycząca badań i oceny, nr 23, OECD Publishing, Paryż.
 - (6) Rozdział C.51 niniejszego załącznika: *Badanie toksyczności na Myriophyllum spicatum w układzie woda-osad*
 - (7) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, t. 18/9, s. 713–718.
 - (8) Nyholm, N. *et al.* (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chemistry*, t. 11/2, s. 157–167.
 - (9) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, t. 11/10, s. 1485–1494.
 - (10) OECD (2006), „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application”, Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria dotycząca badań i oceny, nr 54, OECD Publishing, Paryż.
 - (11) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.
 - (12) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, t. 50/272, s. 1096–1121.
 - (13) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, t. 20/3, s. 482–491.
 - (14) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, t. 27/1, s. 103–117.
 - (15) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, t. 28/2, s. 519–531.
 - (16) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, t. 29/2, s. 93–96.
-

Dodatek 1

DEFINICJE

Biomasa oznacza mokrą lub suchą masę materii żywej obecnej w populacji. W niniejszym badaniu biomasa stanowi sumę mas pędu głównego, wszystkich gałązek bocznych i wszystkich korzeni.

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Chloroza oznacza zmianę barwy organizmu doświadczalnego, w szczególności okółków, z zielonej na żółciejącą.

EC_x oznacza stężenie badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w pożywce użytej do badań, powodujące ograniczenie wzrostu *Myriophyllum spicatum* o x % (np. o 50 %) w określonym okresie narażenia (który należy dokładnie określić, jeżeli odbiega od pełnego lub zwykłego czasu trwania badania). Aby jednoznacznie oznaczyć wartość EC wynikającą z szybkości wzrostu albo przyrostu, w odniesieniu do szybkości wzrostu używa się symbolu „E_xC”, a w odniesieniu do przyrostu – symbolu „E_yC”, po którym następuje użyta zmienna pomiarowa, np. E₁C (długość pędu głównego).

Wzrost oznacza wzrost wartości zmiennej pomiarowej, np. długości pędu głównego, całkowitej długości gałązek bocznych, całkowitej długości pędów, całkowitej długości korzenia, mokrej masy, suchej masy lub liczby okółków, w okresie badania.

Szybkość wzrostu (średnia właściwa szybkość wzrostu) oznacza logarytmiczny wzrost wartości zmiennej pomiarowej w okresie narażenia. Uwaga: zmienne zależne związane z szybkością wzrostu są niezależne od czasu trwania badania, o ile przebieg wzrostu organizmów kontrolnych nienarażonych na działanie substancji jest wykładniczy.

Najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany, (LOEC) oznacza najniższe badane stężenie, przy którym obserwuje się, że substancja chemiczna ma statystycznie istotny wpływ na ograniczenie wzrostu (przy p < 0,05) w porównaniu z grupą kontrolną w danym czasie narażenia. Jednakże wszystkie badane stężenia powyżej LOEC powinny wywierać szkodliwy skutek równy skutkom lub większy niż skutki obserwowane przy LOEC. W przypadku gdy oba warunki nie mogą być spełnione, należy szczegółowo wyjaśnić, w jaki sposób wybrano LOEC (a następnie NOEC).

Zmienne pomiarowe oznaczają dowolnego typu zmienne, które mierzy się, aby wyrazić punkt końcowy przy użyciu jednej zmiennej zależnej lub większej ich liczby. W niniejszej metodzie badawczej długość pędu głównego, całkowita długość gałązek bocznych; całkowita długość pędów, całkowita długość korzenia, mokra masa, sucha masa oraz liczba okółków stanowią zmienne pomiarowe.

Monokultura oznacza kulturę z jednym gatunkiem rośliny.

Nekroza oznacza martwą (tj. barwy białej lub ciemnobrązowej) tkankę organizmu doświadczalnego.

Najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian, (NOEC) oznacza badane stężenie bezpośrednio poniżej LOEC.

Zmienna zależna oznacza zmienną służącą do szacowania toksyczności, uzyskaną z dowolnych zmierzonych zmiennych opisujących biomasę za pomocą różnych metod obliczania. W przypadku niniejszej metody badawczej szybkość wzrostu i przyrost są zmiennymi zależnymi wyprowadzonymi ze zmiennych pomiarowych, takich jak: długość pędu głównego, całkowita długość pędów, mokra masa, sucha masa czy liczba okółków.

Badanie półstatyczne (z wymianą) oznacza badanie, w którym roztwór do badań jest okresowo wymieniany w określonych odstępach czasu w trakcie badania.

Badanie statyczne oznacza metodę badawczą bez wymiany roztworu do badań w trakcie badania.

Badana substancja chemiczna oznacza każdą substancję lub mieszaninę badaną za pomocą niniejszej metody badawczej.

Punkt końcowy badania opisuje ogólny czynnik, który będzie ulegał zmianie pod wpływem badanej substancji chemicznej w porównaniu z grupą kontrolną, jako cel badania. W niniejszej metodzie badawczej punktem końcowym badania jest zahamowanie wzrostu, które można wyrazić za pomocą różnych zmiennych zależnych opartych na jednej zmiennej pomiarowej lub większej ich liczbie.

Pożywka użyta do badań oznacza kompletną syntetyczną pożywkę, na której wzrastają rośliny wykorzystywane do badań, gdy są narażone na działanie badanej substancji chemicznej. Badana substancja chemiczna jest zwykle rozpuszczona w pożywce użytej do badania.

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

Przyrost oznacza wartość zmiennej pomiarowej wyrażającą biomasę na końcu okresu narażenia pomniejszoną o wartość zmiennej pomiarowej na początku okresu narażenia. Uwaga: jeżeli przebieg wzrostu organizmów nienarażonych na działanie substancji jest wykładniczy, wartość zmiennych zależnych opartych na przyroście będzie ulegała zmniejszeniu wraz z upływem czasu trwania badania.

Dodatek 2

ZMODYFIKOWANA POŻYWKA ANDREWSA DLA KULTURY WYJŚCIOWEJ I PREKULTURY

Pięć oddzielnie przygotowanych roztworów podstawowych składników odżywczych z dodatkiem 3-procentowego roztworu sacharozy posłuży do przygotowania zmodyfikowanej pożywki Andrews'a wymaganej na potrzeby kultury wyjściowej i prekultury.

Tabela 1

Skład substancji biogennej Andrews'a: (norma ASTM E 1913-04)

Wytwarzanie roztworu podstawowego składników odżywczych			Wytwarzanie substancji biogennej
Roztwór podstawowy	Substancja chemiczna	Masa początkowa na 1 000 ml	ml na 5 l substancji biogennej
1	KCl	74,6 mg	50
	KNO ₃	8,08 g	
	Ca(NO ₃) ₂ × 4 H ₂ O	18,88 g	
2	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	9,86 g	50
3	Zob. roztwór podstawowy 3.1 poniżej		50
4	KH ₂ PO ₄	2,72 g	50
5	FeSO ₄ × 7 H ₂ O	0,278 g	50
	Na ₂ EDTA × 2 H ₂ O	0,372 g	

Roztwory podstawowe można przechowywać w lodówce przed okres 6 miesięcy (w temperaturze 5–10 °C). Wyłącznie roztwór podstawowy nr 5 charakteryzuje się ograniczonym okresem przechowywania (dwa miesiące).

Tabela 2

Wytwarzanie roztworu podstawowego 3.1 na potrzeby przygotowania roztworu podstawowego 3

Substancja chemiczna	Masa początkowa w g/100 ml
MnSO ₄ × 4 H ₂ O	0,223
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0,115
H ₃ BO ₃	0,155
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,0125
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ × 4 H ₂ O	0,0037

Po wytworzeniu roztworu podstawowego 3.1 (tabela 2), roztwór ten należy głęboko zamrozić w podwielokrotnościach wynoszących około 11 ml (co najmniej w temperaturze -18 °C). Okres przechowywania głęboko zamrożonych porcji wynosi pięć lat.

Aby wytworzyć roztwór podstawowy 3, należy rozmrozić roztwór podstawowy 3.1, a następnie przelać 10 ml tego roztworu do kolby miarowej o pojemności 1 l i uzupełnić wodą o bardzo wysokiej czystości aż do uzyskania pojemności oznaczonej na kolbie.

Aby uzyskać zmodyfikowaną pożywkę Andrewsa, należy wlać około 2 500 ml wody o bardzo wysokiej czystości do kolby miarowej o pojemności 5 l. Po dodaniu 50 ml każdego roztworu podstawowego kolbę miarową należy wypełnić do 90 % objętości wodą o bardzo wysokiej czystości i zmienić pH, by jego wartość wynosiła 5,8.

Następnie należy dodać 150 g rozpuszczonej sacharozy (3 % na 5 l), po czym należy wypełnić kolbę miarową wodą o bardzo wysokiej czystości do oznaczonej objętości. Na koniec substancję biogenną wlewa się do kolb Schotta i poddaje działaniu autoklawu w temperaturze 121 °C przez 20 minut.

Uzyskaną w ten sposób substancję biogenną można przechowywać w środowisku sterylnym w lodówce (w temperaturze 5–10 °C) przez trzy miesiące.

Zmodyfikowana pożywka Andrewsa służąca do badania toksyczności w układzie pozbawionym osadu

Pięć roztworów podstawowych składników odżywczych z dodatkiem 30-procentowej sacharozy, o których wspomniano już w tabelach 1 i 2, posłuży do przygotowania dziesięciokrotnie stężonej zmodyfikowanej pożywki Andrewsa niezbędnej do uzyskania roztworów do badań. W tym celu do kolby miarowej o pojemności 1 l należy wlać około 100 ml wody o bardzo dużej czystości. Po dodaniu 100 ml każdego roztworu podstawowego należy zmienić pH, by jego wartość wynosiła 5,8. Następnie należy dodać 30-procentową rozpuszczoną sacharozę (300 g na 1 000 ml); po czym należy wypełnić kolbę miarową wodą o bardzo wysokiej czystości do oznaczonej objętości.

Na koniec substancję biogenną wlewa się do kolb Schotta o pojemności 0,5 l i poddaje działaniu autoklawu w temperaturze 121 °C przez 20 minut.

Uzyskaną w ten sposób dziesięciokrotnie skoncentrowaną zmodyfikowaną substancję biogenną można przechowywać w środowisku sterylnym w lodówce (w temperaturze 5–10 °C) przez trzy miesiące.

Dodatek 3

UTRZYMANIE KULTURY WYJŚCIOWEJ

W niniejszym dodatku 3 opisano kulturę wyjściową *Myriophyllum spicatum* L⁽¹⁾, zanurzonej w wodzie rośliny dwuliściennej, gatunku z rodziny wodnikowatych. W okresie od czerwca do sierpnia niepozorne różowobiałe kwiaty wystają ponad powierzchnię wody. Rośliny są zakorzenione w gruncie przez system solidnych kłączy i można je znaleźć na całej półkuli północnej w eutroficznych, jednak niezanieczyszczonych i zawierających większe ilości wapnia wodach stojących na podłożu mulistym. *Myriophyllum spicatum* preferuje wodę słodką, ale występuje również w wodach słonych.

W przypadku kultury wyjściowej w układzie pozbawionym osadu w warunkach laboratoryjnych wymagane jest stosowanie sterylnych roślin. Sterylne rośliny są udostępniane przez laboratorium ekotoksykologiczne niemieckiego Umweltbundesamt (Niemiecka Federalna Agencja Ochrony Środowiska).

Alternatywnie organizmy doświadczalne można przygotować z niesterylnych roślin zgodnie z normą ASTM E 1913-04. Zob. poniżej – ze standardowego przewodnika ASTM – procedura uprawy *Myriophyllum sibiricum* zebranego z terenu:

„W przypadku zbierania niesterylnych roślin w terenie należy zbierać pąki *M. sibiricum* jesienią. Następnie należy umieścić pąki w 20-litrowym akwarium wypełnionym 5-centymetrową warstwą sterylnego osadu, który pokryty jest piaskiem krzemionkowym lub np. substancją Turface® i 18 l wody odczynnikowej. Należy wietrzyć akwarium i utrzymywać w nim temperaturę 15 °C, zaś gęstość strumienia cząstek powinna wynosić od 200 do 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ przez 16 godzin dziennie. Kultura roślinna w akwarium może być utrzymywana jako zapasowe źródło roślin w przypadku zniszczenia sterylnych kultur roślinnych przez awarię mechaniczną w komorze wzrostu, zanieczyszczenia lub z innych powodów. Rośliny trzymane w akwarium nie są sterylne, a sterylnych kultur nie można utrzymywać w systemie hodowli podzielonym na partie. Aby wysterylizować daną kulturę, rośliny usuwa się z akwarium, a następnie przepłukuje pod bieżącą wodą dejonizowaną przez około pół godziny. W aseptycznych warunkach panujących w komorze z nawiewem laminarnym rośliny dezynfekuje się nie dłużej niż 20 minut (do czasu, aż większa część tkanki rośliny będzie biała, a tylko wierzchołek rośliny pozostanie zielony) w 3-procentowym roztworze podchlorynu sodu (w/v) zawierającego 0,01-procentowym roztwór odpowiedniego środka powierzchniowo czynnego. Następnie należy wymieszać środek dezynfekujący i materiał roślinny. Segmenty z kilkoma węzłami przenosi się do sterylnych próbek hodowlanych zawierających 45 ml sterylnej zmodyfikowanej pożywki Andrewsa i zamyka zwykłym zamknięciem próbówki. W każdej komorze badawczej umieszcza się tylko jeden segment rośliny. Do zabezpieczenia zamknięcia naczynia do hodowli stosuje się laboratoryjną masę uszczelniającą. Po utworzeniu sterylnej uprawy segmenty roślin posiadające kilka węzłów należy co 10–12 dni przenosić do nowych komór badawczych wypełnionych świeżą płynną pożywką zawierającą składniki odżywcze. Jak wykazano podczas uprawy na płytkach agarowych rośliny muszą być sterylne i pozostać takie przez osiem tygodni do czasu rozpoczęcia badania”.

Ze względu na fakt, że zmodyfikowana pożywka Andrewsa zawiera sacharozę (która stymuluje wzrost grzybów i bakterii), wszystkie materiały, roztwory i kultury przygotowuje się w sterylnych warunkach. Przed użyciem sterylizuje się wszystkie ciecze i sprzęt. Sterylizację przeprowadza się poprzez obróbkę ogrzanym powietrzem (210 °C) trwającą cztery godziny lub obróbkę w autoklawie trwającą 20 minut w temperaturze 121 °C. Ponadto wszystkie kolby, naczynia, miski itd. oraz inny sprzęt poddaje się opalaniu na sterylnym stole roboczym tuż przed użyciem.

Kultury wyjściowe można utrzymywać w środowisku o zmniejszonym oświetleniu i temperaturze ($50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) przez dłuższy okres, bez konieczności odtwarzania. Pożywka dla gatunku *Myriophyllum* powinna być taka sama jak używana do badań, lecz do kultur wyjściowych można używać innych pożywek bogatych w składniki odżywcze.

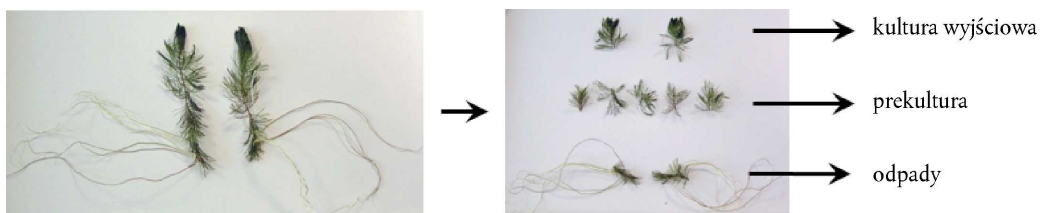
Segmenty roślin rozmieszcza się niezależnie w kilku kolbach typu Erlenmeyer o pojemności 500 ml lub Fernbach o pojemności 2 000 ml, przy czym każda wypełniona jest zmodyfikowaną pożywką Andrewsa w ilości odpowiednio 450 i 1 000 ml. Następnie kolby są niezależnie zamykane zatyczkami z celulozy.

Ponadto absolutnie konieczne jest dokładne opalenie sprzętu na sterylnym stole roboczym tuż przed użyciem. W zależności od liczby i wielkości rośliny przenosi się do świeżej substancji biogennej mniej więcej co trzy tygodnie.

Można wykorzystać wierzchołki oraz segmenty środkowej części łodygi w odniesieniu do tej odnowionej kultury. Liczba i wielkość przenoszonych roślin (lub segmentów roślin) jest uzależniona od liczby potrzebnych roślin. Na przykład można przenieść pięć segmentów pędu do kolby typu Fernbach i trzy do kolby typu Erlenmeyer, każdy o długości 5 cm. należy odrzucić wszelkie ukorzenione, kwitnące, martwe lub w inny sposób widoczne części.

(¹) Carl von Linné (* 23 maja 1707 w Råshult /Älmhult; † 10 stycznia 1778 w Uppsali).

Wykres 1

Przycinanie roślin na potrzeby kultury wyjściowej i prekultury po trzech tygodniach hodowli.

Uprawa roślin odbywa się w kolbach typu Erlenmeyer o pojemności 500 ml i kolbach typu Fernbach o pojemności 2 000 ml trzymany w inkubatorze chłodzącym w temperaturze 20 ± 2 °C z ciągłym oświetleniem o natężeniu około $100\text{--}150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ lub 6 000–9 000 luksów (emitowanym przez komorę oświetleniową z temperaturą barwową „ciepłe białe światło”).

Wykres 2

Uprawa roślin w inkubatorze chłodzącym z komorą oświetleniową.

Należy używać chemicznie czystych (przepłukanych kwasem) i sterylnych naczyń do hodowli komórkowych oraz stosować techniki aseptyczne. W przypadku zanieczyszczenia kultury wyjściowej, np. glonami, grzybami lub bakteriami, należy przygotować nową kulturę lub skorzystać z kultury wyjściowej z innego laboratorium w celu wymiany takiej kultury.

Dodatek 4

UTRZYMANIE PREKULTURY I PRZYGOTOWANIE ORGANIZMU DOŚWIADCZALNEGO DO BADANIA

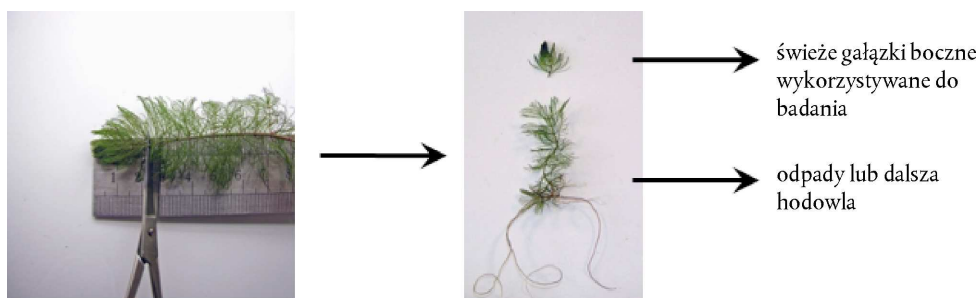
Aby uzyskać prekulturę należy pociąć pędy kultury wyjściowej na segmenty składające się z dwóch okółków każdy; następnie należy je umieścić w kolbach typu Fernbach wypełnionych zmodyfikowaną pożywką Andrewsa (z 3-procentowym roztworem sacharozy). Każda kolba może zawierać maksymalnie 50 segmentów pędów. Należy jednak zwrócić uwagę, że segmenty są żywe i nie posiadają żadnych korzeni ani gałęzi bocznych lub wyrastających z nich pąków (zob. rys. 1 w dodatku 3).

Organizmy prekultury są hodowane przez 14–21 dni w warunkach sterylnych w komorze klimatycznej ze zmieniającymi się fazami dnia/nocy trwającymi 16/8 godzin. Zakres wybranej światłości wynosi od 100–150 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Temperatura w naczyniach badawczych powinna wynosić 23 ± 2 °C.

Ze względu na fakt, że zmodyfikowana pożywka Andrewsa zawiera sacharozę (która stymuluje wzrost glonów, grzybów i bakterii), roztwory badanej substancji chemicznej przygotowuje się w sterylnych warunkach i wykorzystuje do hodowli komórkowych. Przed użyciem sterylizuje się wszystkie ciecze i sprzęt. Sterylizację przeprowadza się poprzez obróbkę ogrzanym powietrzem (210 °C) trwającą cztery godziny lub obróbkę w autoklawie trwającą 20 minut w temperaturze 121 °C. Ponadto wszystkie kolby, naczynia, miski itd. oraz inny sprzęt poddaje się opalaniu na sterylnym stole roboczym tuż przed użyciem.

Pędy usuwa się niezależnie z kolb stosowanych do prekultury, wybierając materiał w jak największym stopniu jednorodny. Każde badanie wymaga co najmniej 60 organizmów doświadczalnych (badanie z wykorzystaniem ośmiu stężeń badanej substancji chemicznej). Do badania należy stosować świeże gałązki boczne z prekultury, skrócić je do długości 2,5 cm od podstawy (mierzone za pomocą linijki) i przenieść do zlewki zawierającej sterylną zmodyfikowaną pożywkę Andrewsa. Te świeże gałązki boczne można wykorzystać do badania toksyczności na *Myriophyllum spicatum* w układzie pozbawionym osadu.

Wykres 2

Przycinanie roślin z prekultury do badania toksyczności na *Myriophyllum spicatum* w układzie pozbawionym osadu

C.51 Badanie toksyczności na *Myriophyllum spicatum* w układzie woda-osad

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 239 (2014). Dostępne są metody badawcze w odniesieniu do pływających jednoliściennych roślin wodnych z gatunku *Lemna* (1) i glonów (2). Metody te rutynowo stosuje się do generowania danych w celu ograniczenia ryzyka związanego z badanymi substancjami chemicznymi, w szczególności substancjami chemicznymi o działaniu chwastobójczym, na jakie narażone są wodne gatunki roślin niebędące przedmiotem badania. W niektórych przypadkach mogą być jednak wymagane dane dotyczące dodatkowych gatunków makrofitów. W najnowszych wytycznych opublikowanych w wyniku warsztatów prowadzonych przez Towarzystwo Toksykologii i Chemii Środowiskowej (SETAC) na temat oceny ryzyka wynikającego ze stosowania pestycydów na morskie makrofity stwierdzono, że dane dotyczące ukorzenionych gatunków makrofitów mogą być wymagane w odniesieniu do badanych substancji chemicznych, w przypadku gdy wiadomo, że gatunki *Lemna* i glonów nie są wrażliwe na tryb działania lub jeżeli oddzielenie od osadu stanowi problem i prowadzi do narażenia w wyniku pobierania przez korzenie (3). W oparciu o obecny stan wiedzy i doświadczenia za preferowane gatunki uznano gatunki *Myriophyllum* w przypadkach, gdy wymagane są dane dotyczące zanurzonych, ukorzenionych gatunków dwuliściennych (4) (5) (6). Niniejsze badanie nie ma zastąpić innych badań toksyczności dla organizmów wodnych; powinno je raczej uzupełniać, tak aby możliwa była bardziej kompletna ocena zagrożeń i ryzyka, na jakie narażone są rośliny wodne. Metoda badania na *Myriophyllum spicatum* w układzie woda-osad uzupełnia badanie toksyczności na *Myriophyllum spicatum* w układzie pozbawionym osadu (7).
2. W niniejszym dokumencie opisano metodę badawczą, która umożliwia ocenę wpływu badanej substancji chemicznej na ukorzenione, gatunki wodne *Myriophyllum spicatum*, rosnącego w układzie woda-osad. Dana metoda badawcza opiera się częściowo na istniejących metodach (1) (2) (8) i uwzględnia najnowsze badania dotyczące oceny ryzyka związanego z roślinami wodnymi (3). Metoda stosowana w układzie woda-osad została zweryfikowana w ramach międzynarodowego badania międzylaboratoryjnego na gatunkach *Myriophyllum* uprawianych w warunkach statycznych, które były narażone na działanie badanej substancji chemicznej w wyniku podawania tej substancji przez kolumnę wodną (9). Układ badawczy można jednak łatwo dostosować, tak aby umożliwić narażenie poprzez wzbogacony osad lub narażenie podczas fazy wodnej w scenariuszu półstatycznym lub scenariuszu impuls-dawka, chociaż scenariusze te nie zostały formalnie poddane badaniu międzylaboratoryjnemu. Ponadto można stosować ogólną metodę w odniesieniu do innych ukorzenionych, zanurzonych i wschodzących gatunków, w tym innych gatunków *Myriophyllum* (np. *Myriophyllum aquaticum*) i *Glyceria maxima* (10). Modyfikacje warunków badania, planu i czasu trwania badania mogą być wymagane w przypadku alternatywnych gatunków. W szczególności potrzebne są dalsze prace, aby określić odpowiednie procedury stosowane wobec gatunku *Myriophyllum aquaticum*. Opcji tych nie przedstawiono szczegółowo w niniejszej metodzie badawczej, która opisuje standardowe podejście do narażenia gatunku *Myriophyllum spicatum* na działanie substancji w układzie statycznym podczas fazy wodnej.
3. Niniejsza metoda badawcza ma zastosowanie do substancji, w odniesieniu do których zweryfikowano niniejszą metodę badawczą (zob. szczegółowe informacje na temat sprawozdania z badania międzylaboratoryjnego (9)), lub do postaci użytkowych lub znanych mieszanin. Można przeprowadzić badanie na gatunku *Myriophyllum* w celu spełnienia wymogu dotyczącego danych Tier 1 wynikającego z potencjalnego oddzielenia badanej substancji chemicznej od osadu lub kwestii związanych z trybem działania/selektywnością. Podobnie wymagane może być przeprowadzenie w laboratorium badania na gatunku *Myriophyllum* w ramach strategii wyższego rzędu w celu rozwiązania problemów związanych z ryzykiem, na jakie narażone są rośliny wodne. Szczególny powód do przeprowadzenia badania posłuży do określenia drogi narażenia (np. przez wodę lub osad). Przed zastosowaniem niniejszej metody badawczej do badania mieszaniny na potrzeby celu regulacyjnego należy zastanowić się nad tym, czy zastosowanie niniejszej metody może doprowadzić do uzyskania wyników odpowiednich z punktu widzenia tego celu, a jeżeli tak – dlaczego. Przeprowadzenie takiej analizy nie jest konieczne, jeżeli ustanowiono wymóg regulacyjny dotyczący badania danej mieszaniny.

ZASADA BADANIA

4. Badanie zaplanowano w celu oceny oddziaływań substancji chemicznej na wzrost wegetatywny roślin z gatunku *Myriophyllum* uprawianych na standardowym podłożu (woda, osad i składniki odżywcze). W tym celu wierzchołki pędów zdrowych niekwitających roślin umieszcza się w doniczce w standardowym, sztucznym osadzie, który wzbogaca się dodatkowymi składnikami odżywczymi w celu zapewnienia odpowiedniego wzrostu rośliny, a następnie przechowuje się w pożywce Smarta i Barko (dodatek 1). Po okresie ukorzeniania, aby umożliwić roślinom tworzenie korzeni, naraża się je na działanie szeregu badanych stężeń dodanych do słupa wody. Alternatywnie, narażenie poprzez osad może być stymulowane przez wzbogacanie sztucznego osadu badaną substancją chemiczną i przenoszenie roślin do tego wzbogaconego osadu. W obu przypadkach rośliny utrzymuje się następnie w kontrolowanych warunkach otoczenia przez okres 14 dni. Wpływ na wzrost określa się na podstawie ilościowych ocen długości pędu, mokrzej i suchej masy oraz ilościowych obserwacji objawów, takich jak chloroza, nekroza lub deformacje wzrostu.

5. Aby określić ilościowo skutki związane z substancją chemiczną, wzrost w roztworach do badań porównuje się ze wzrostem w grupach kontrolnych i wyznacza się stężenie powodujące zahamowanie wzrostu o określone x % i wyraża się je jako EC_x ; „ x ” może mieć dowolną wartość w zależności od wymogów regulacyjnych np. EC_{10} , EC_{20} i EC_{50} . Należy zauważyć, że szacunkowe wartości EC_{10} i EC_{20} są wiarygodne i odpowiednie jedynie w badaniach, w których współczynniki zmienności w kontrolowanych roślinach spadają poniżej szacowanego poziomu tj. współczynniki zmienności powinny wynosić < 20 % od dokładnie oszacowanej wartości EC_{20} .
6. Należy określić zarówno średnią właściwą szybkość wzrostu (oszacowaną na podstawie ocen długości pędu, mokrej masy pędu i suchej masy pędu), jak i przyrost (oszacowany na podstawie zwiększenia długości pędu, mokrej masy pędu i suchej masy pędu) roślin poddawanych i niepoddawanych działaniu substancji chemicznej. Właściwą szybkość wzrostu (r) i przyrost (y) wykorzystuje się następnie do określenia odpowiednio $E_r C_x$ (np. $E_r C_{10}$, $E_r C_{20}$, $E_r C_{50}$) i $E_y C_x$ (np. $E_y C_{10}$, $E_y C_{20}$, $E_y C_{50}$).
7. Jeżeli jest to wymagane, można statystycznie określić najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany, (LOEC) oraz najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian, (NOEC) na podstawie szacunków dotyczących średniej właściwej szybkości wzrostu i przyrostu.

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

8. Należy dysponować metodą analityczną zapewniającą należyłą czułość pozwalającą na oznaczenie ilościowe substancji chemicznych w pożywce użytej do badania.
9. Informacje na temat badanej substancji chemicznej, które mogą być przydatne w ustaleniu warunków badania obejmują wzór strukturalny, skład (w przypadku substancji wieloskładnikowych), UVCB, mieszaniny lub postaci użytkowe, czystość, rozpuszczalność w wodzie, stabilność w wodzie i świetle, stała dysocjacji w środowisku kwaśnym (pK_a), współczynnik podziału oktanol/woda (K_{ow}), o ile dostępna jest wartość K_d dla osadu, prężność par oraz biodegradowalność. Rozpuszczalność w wodzie i prężność par mogą posłużyć do obliczenia stałej Henry'ego, która wskaże, czy istnieje prawdopodobieństwo znaczących strat badanej substancji chemicznej w okresie badania. Jeżeli istnieje prawdopodobieństwo wystąpienia strat, należy je określić ilościowo oraz udokumentować kolejne kroki podejmowane w celu kontroli takich strat. W przypadku gdy dane dotyczące rozpuszczalności i stabilności badanej substancji chemicznej są niepewne, zaleca się oceniać te właściwości w warunkach badania, tj. uwzględniając pożywkę, temperaturę i warunki oświetlenia, które mają być zastosowane w badaniu. Uwaga: w przypadku badania utlenionych herbicydów zależnych od światła wykorzystywane oświetlenie laboratoryjne powinno zawierać równoważną ilość światła ultrafioletowego występującego w naturalnym świetle słonecznym.
10. W stosownych przypadkach należy zmierzyć i dostosować pH pożywki użytej do badań. Kontrola pH pożywki użytej do badań jest szczególnie ważna np. gdy bada się metale lub substancje chemiczne, które są hydrolytycznie nietrwałe. Dalsze wskazówki dotyczące badania substancji chemicznych o właściwościach fizykochemicznych utrudniających ich badanie podano w wytycznych OECD (11).

WAŻNOŚĆ BADANIA

11. Aby wyniki badania były ważne średnia całkowita długość pędów i średnia mokra masa pędów w grupie kontrolnej musi zostać co najmniej podwojona w fazie narażenia badania. Ponadto rośliny z grupy kontrolnej nie mogą wykazywać żadnych wizualnych objawów chlorozy i powinny być wyraźnie pozbawione zanieczyszczeń wywoływanych przez inne organizmy, takie jak glony lub warstwa bakteryjna na roślinach, na powierzchni osadu i w pożywce użytej do badań.
12. Średni współczynnik zmienności w odniesieniu do przyrostu opartego na pomiarach mokrej masy pędów (tj. od rozpoczęcia do zakończenia badania) w kulturach kontrolnych nie przekracza 35 % między kontrpróbami.

SUBSTANCJA CHEMICZNA ODNIESIENIA

13. Należy okresowo poddawać badaniu substancję chemiczną odniesienia, taką jak 3,5-dichlorofenol stosowanych w badaniu międzylaboratoryjnym (9), w celu sprawdzenia działania procedury badawczej wraz z upływem czasu. Z danych dotyczących badania międzylaboratoryjnego wynika, że średnie wartości EC_{50} 3,5-dichlorofenolu dla różnych zmiennych zależnych wynosiły od 4,7 do 6,1 mg/l (zob. sprawozdanie z badania międzylaboratoryjnego zawierające szczegółowe informacje na temat przewidywanych przedziałów ufności w odniesieniu do tych wartości). Wskazane jest badanie substancji chemicznej odniesienia co najmniej dwa razy do roku lub, w przypadku gdy badanie przeprowadza się rzadko, równoległe z ostatecznymi badaniami toksyczności. Wytyczne dotyczące oczekiwanych wartości EC_{50} 3,5-dichlorofenolu przedstawiono w sprawozdaniu statystycznym dotyczącym międzynarodowego badania międzylaboratoryjnego (9).

OPIS METODY

Aparatura badawcza

14. Badanie należy przeprowadzać w kontrolowanych warunkach otoczenia tj. w komorze wzrostowej, pomieszczeniu wzrostowym lub laboratorium z regulowaną długością dnia, temperaturą i regulowanym oświetleniem (zob. sekcja „warunki badania”, pkt 56–58). Kultury wyjściowe należy utrzymywać poza naczyniami badawczymi.
15. Badanie należy prowadzić przy użyciu szklanych naczyń badawczych, takich jak akwaria lub zlewki. Powszechnie wykorzystuje się zlewki szklane o pojemności 2 l (około 24 cm wysokości i 11 cm średnicy). Inne (np. większe) naczynia mogą być jednak odpowiednie, pod warunkiem że woda ma wystarczającą głębokość, co pozwoliłoby na nieograniczony wzrost i utrzymanie roślin zanurzonych przez cały czas trwania badania.
16. Doniczki na rośliny wykonane z tworzywa sztucznego lub szkła (około 9 cm średnicy, 8 cm wysokości i 500 ml objętości) można wykorzystywać jako pojemniki do przesadzania roślin do osadu. Alternatywnie można korzystać ze szklanych zlewek, które są preferowane w niektórych przypadkach (np. badanie hydrofobowych substancji chemicznych lub substancji chemicznych o wysokim K_{ow}).
17. Wybierając wielkość doniczki/zlewki należy uwzględnić również wybór naczynia badawczego i preferowany plan badania (zob. poniżej). W przypadku korzystania z planu badania A (jeden pęd w każdej doniczce i trzy doniczki w każdym naczyniu) konieczne mogą być mniejsze doniczki lub większe naczynia. W przypadku korzystania z planu badania B (trzy pędy w każdej doniczce i jedna doniczka w każdym naczyniu) wyznaczony rozmiar doniczki i naczynia powinien być odpowiedni. We wszystkich przypadkach minimalna głębokość wody powinna wynosić 12 cm powyżej górnej warstwy osadu oraz należy zarejestrować stosunek powierzchni/objętości osadu do powierzchni/objętości wody.

Organizm doświadczalny

18. Ogólne podejścia opisane w niniejszej metodzie badawczej można wykorzystać do zbadania szeregu wodnych gatunków roślin. Warunki przedstawione w niniejszej metodzie badawczej zostały jednak dostosowane do badania gatunku z rodziny wodnikowatych, *Myriophyllum spicatum*. Gatunek ten należy do roślin dwuliściennych z rodziny Haloragaceae.
19. *Myriophyllum spicatum* (wywłócznik kłosowy) to zanurzony w wodzie i ukorzeniony gatunek, który toleruje szeroki zakres warunków i występuje zarówno w wodach stojących, jak i płynących. *M. spicatum* to roślina wieloletnia, która obumiera z powrotem do korzeni na zimę. Rośliny zwykle kwitną i wysiewają nasiona swobodnie, chociaż wegetatywne rozmnażanie z pąków bocznych lub fragmentów łodyg, które odpadają naturalnie lub po naruszeniu, często jest podstawową metodą kolonizacji.

Hodowla organizmów doświadczalnych

20. Rośliny można pozyskać z naturalnych populacji lub od dostawców roślin wodnych. W obu przypadkach należy udokumentować źródło roślin i zweryfikować pochodzenie gatunku. Należy zwrócić szczególną uwagę na zapewnienie, aby podczas zbierania *Myriophyllum spicatum* na określonym terenie, zwłaszcza w regionach, na których może krzyżować się z innymi gatunkami *Myriophyllum*, zebrano odpowiednie gatunki roślin. W razie wątpliwości zaleca się używanie zweryfikowanych kultur laboratoryjnych ze znanych źródeł. Do niniejszego badania nie należy używać roślin, które zostały narażone na działanie jakichkolwiek zanieczyszczeń chemicznych lub zebrane na terenie, o którym wiadomo, że jest zanieczyszczony.
21. W regionach, w których roślina *M. spicatum* nie jest łatwo dostępna w miesiącach zimowych, konieczne może być długotrwałe utrzymywanie kultur wyjściowych w warunkach szklarniowych lub laboratoryjnych. Kultury wyjściowe należy utrzymywać w warunkach podobnych do warunków badania, chociaż natężenie promieniowania i temperaturę można ograniczyć w celu zmniejszenia częstotliwości prac w zakresie utrzymania kultur (np. gdy w danym okresie nie planuje się badania na *Myriophyllum*). Zaleca się korzystanie z większych akwariów i doniczek na rośliny, niż te używane w badaniu, w celu zapewnienia roślinom miejsca do rozmnażania. Skład osadu i podłoża wodnego powinien być taki sam, jak ten użyty do badania, chociaż można przyjąć alternatywne metody nawożenia za pomocą osadu (np. wykorzystanie handlowych środków nawozowych o powolnym uwalnianiu).

22. Rośliny mateczne powinny być wyraźnie pozbawione zanieczyszczeń wszelkimi innymi organizmami, w tym ślimakami, glonami nitkowatymi, grzybami i owadami np. jajami lub larwami ćmy z gatunku *Paraponyx stratiotata* oraz larwami lub dorosłymi osobnikami z gatunku ryjkowcowatych *Eubrychius velutus*. Aby usunąć widoczne zanieczyszczenie konieczne może być opłukanie materiału roślinnego świeżą wodą. Ponadto należy dołożyć starań, aby zminimalizować rozwój glonów jednokomórkowych i skażenia bakteryjnego, chociaż całkowite wysterylizowanie materiału roślinnego nie jest konieczne. Kultury wyjściowe należy monitorować i w razie potrzeby przenieść w celu uniknięcia rozwoju skażenia glonami i bakteriami. Jeżeli skażenie glonami lub bakteriami staje się problematyczne korzystne może być napowietrzanie kultur wyjściowych.
23. We wszystkich przypadkach rośliny są uprawiane/aklimatyzowane w warunkach, które są podobne, ale niekoniecznie identyczne, do tych stosowanych podczas badania przez pewien okres (tj > 2 tygodni) zanim zostaną użyte do badania.
24. Do badania nie należy używać kwitnących kultur wyjściowych, ponieważ szybkość wzrostu wegetatywnego zwykle spada podczas kwitnienia i po kwitnieniu.

Osad

25. Do niniejszego badania zaleca się wykorzystanie następującego osadu preparowanego opartego na sztucznym osadzie stosowanym w rozdziale C.28 niniejszego załącznika (8). Osad przygotowuje się w sposób opisany w metodzie badawczej C.28, z wyjątkiem dodawania składników odżywczych, co opisano poniżej:
 - a) 4–5 % torfu (sucha masa zgodnie z $2 \pm 0,5$ % węgla organicznego) o wartości pH możliwie najbardziej zbliżonej do przedziału 5,5 do 6,0; ważne jest, by stosować torf w postaci sproszkowanej, drobno zmielony (wielkość cząstek < 1 mm) i suszony wyłącznie powietrzem;
 - b) 20 % glinki kaolinowej (w przeliczeniu na suchą masę) (zawartość kaolinitu w miarę możliwości powyżej 30 %);
 - c) 75–76 % piasku kwarcowego (w przeliczeniu na suchą masę) (powinien przeważać drobny piasek, w którym ponad 50 % cząstek mierzy od 50 do 200 μm);
 - d) wodną pożywkę dodaje się w takiej ilości, aby ostateczna partia osadu zawierała 200 mg/Kg suchego osadu zarówno chlorku amonu, jak i fosforanu sodu, a zawartość wilgoci w końcowej mieszaninie wynosiła od 30 do 50 %;
 - e) w celu skorygowania pH końcowej mieszaniny osadu do wartości $7,0 \pm 0,5$ dodaje się do niej chemicznie czysty węglan wapnia (CaCO_3).
26. Źródło torfu, glinki kaolinowej i piasku powinno być znane i udokumentowane. Jeżeli pochodzenie jest nieznanne lub wywołuje pewne obawy, wówczas poszczególne składniki osadu należy sprawdzić pod kątem zanieczyszczenia chemicznego (np. metalami ciężkimi, związkami chloroorganicznymi, związkami fosforoorganicznymi).
27. Suche składniki osadu należy jednolicie wymieszać przed dokładnym wymieszanym wodnej substancji biogennej z osadem. Wilgotny osad należy przygotować co najmniej dwa dni przed użyciem w celu zapewnienia dokładnego namoczenia torfu i uniemożliwienia wypływania na powierzchnię hydrofobowych cząstek torfu, po przykryciu osadu podłożem; przed użyciem wilgotny osad można przechowywać w miejscu bez dostępu światła.
28. Na potrzeby badania osad przenosi się do pojemników o odpowiedniej wielkości, takich jak doniczki na rośliny, które pasują do szklanych naczyń (powierzchnia osadu powinna zajmować około 70 % lub więcej powierzchni naczynia). W przypadkach, gdy dno pojemnika posiada otwory, kawałek bibuły filtracyjnej na dnie pomoże utrzymać osad w pojemniku. Doniczki wypełnia się osadem tak, aby powierzchnia osadu była równa, następnie pokrywa się ją cienką warstwą (~ 2–3 mm) obojętnego materiału np. piasku, drobnego żwiru ogrodniczego (lub pokruszonych koralowców) w celu utrzymania osadu na miejscu.

Pożywka użyta do badania

29. Do uprawy i badania *Myriophyllum spicatum* zaleca się stosowanie pożywki Smarta i Barko (12). Sposób przygotowania tej pożywki opisano w dodatku 1. Aby uzyskać optymalny wzrost rośliny, pH pożywki (faza wodna) po rozpoczęciu badania powinno wynosić od 7,5 do 8,0.

Układ doświadczalny

30. Do badania należy użyć co najmniej sześciu naczyń badawczych z kontrpróbą w odniesieniu do próby kontrolnej niepoddawanej działaniu substancji i minimum czterech naczyń badawczych z kontrpróbą w odniesieniu do każdego z co najmniej pięciu poziomów stężeń.
31. Jeżeli wyznaczenie NOEC nie jest wymagane, plan badania można zmienić, zwiększając liczbę stężeń i zmniejszając liczbę kontrprób przypadających na stężenie.
32. Każde naczynie badawcze odpowiada jednej kontrpróbie zawierającej trzy pędy. Istnieją dwie możliwości uprawy trzech pędów w każdym naczyniu badawczym:
 - plan badania A: jeden pęd w każdej doniczce i trzy doniczki w każdym naczyniu.
 - plan badania B: trzy pędy w każdej doniczce i jedna doniczka w każdym naczyniu.
 - Alternatywne plany badania obejmujące jeden pęd w każdej doniczce umieszczonej w naczyniu badawczym są dopuszczalne, pod warunkiem że replikacja jest należycie dostosowana w celu spełnienia wymaganych kryteriów ważności.
33. Należy losowo przydzielić poszczególne naczynia badawcze do grup badanych. Wymagany jest losowy plan umieszczania naczyń badawczych w obszarze badania, aby ograniczyć do minimum wpływ przestrzennych różnic światłości lub temperatury.

Stężenia badanej substancji chemicznej i grupy kontrolne

34. Stężenia powinny zazwyczaj być ułożone w serii geometrycznej; badane stężenia nie powinny się różnić o wielokrotność większą niż 3,2. W doborze odpowiednich badanych stężeń pomocna będzie uprzednia znajomość toksyczności badanej substancji chemicznej z badania ustalającego zakres.
35. Aby określić EC_x , badane stężenia powinny obejmować swoim zakresem wartość EC_x w celu zapewnienia odpowiedniego poziomu ufności. Na przykład jeżeli oszacowuje się EC_{50} , to najwyższe badane stężenie powinno być większe od wartości EC_{50} . Jeżeli wartość EC_{50} leży poza zakresem badanych stężeń, to związane z tym przedziały ufności będą większe, a odpowiednia ocena statystycznego dopasowania modelu może nie być możliwa. Wykorzystanie większej ilości badanych stężeń poprawi przedziały ufności wokół otrzymanej wartości EC_x .
36. Aby określić LOEC/NOEC (opcjonalny punkt końcowy) najniższe badane stężenie powinno być wystarczająco niskie, aby wzrost nie różnił się znacząco od wzrostu roślin w grupie kontrolnej. Ponadto najwyższe badane stężenie powinno być dostatecznie wysokie, aby wzrost był znacząco mniejszy niż w grupie kontrolnej. Wykorzystanie większej liczby kontrprób zwiększy moc statystyczną planu ze stężeniem niewywołującym żadnych zmian / planu ANOVA.

Badanie graniczne

37. W przypadkach, gdy z badania ustalającego zakres wynika, że badana substancja chemiczna nie wywołuje działań niepożądanych w stężeniach do 100 mg/l lub do jej rozpuszczalności granicznej w pożywce użytej do badania, lub – w przypadku postaci użytkowej – do jej dyspergowalności granicznej, można przeprowadzić badanie graniczne ułatwiające porównanie reakcji w grupie kontrolnej i jednej grupie badanej – przy stężeniu 100 mg/l lub równym granicznej rozpuszczalności, lub równym suchemu osadowi w ilości 1 000 mg/kg. Niniejsze badanie należy prowadzić zgodnie ogólnymi zasadami standardowego badania dawka-odpowieź, z tym że zaleca się zwiększenie minimalnej liczby kontrprób do sześciu naczyń badawczych na kontrolę i stężenie. Wzrost w grupie kontrolnej i grupie badanej można poddać analizie przy użyciu testu statystycznego do porównywania średnich, np. testu t-Studenta.

Roztwory do badań

38. Roztwory do badań przygotowuje się zazwyczaj przez rozcieńczenie roztworu podstawowego, przygotowanego przez rozpuszczenie lub rozproszenie badanej substancji chemicznej w pożywce Smarta i Barko, przy użyciu wody demineralizowanej (tj. destylowanej lub dejonizowanej) (zob. dodatek 1).

39. Najwyższe badane stężenie zwykle nie powinno przekraczać rozpuszczalności badanej substancji chemicznej w wodzie lub, w przypadku postaci użytkowych, dyspergowalności w warunkach badania.
40. W przypadku badanych substancji chemicznych o słabej rozpuszczalności w wodzie może być konieczne przygotowanie stężonego roztworu podstawowego lub rozproszenie substancji chemicznej przy użyciu rozpuszczalnika organicznego lub środka dyspergującego, aby ułatwić dodanie precyzyjnych ilości badanej substancji chemicznej do pożywki użytej do badania oraz jej rozproszenie i rozpuszczenie. Należy dołożyć wszelkich starań, aby uniknąć wykorzystania takich rozpuszczalników lub środków dyspergujących. Użycie pomocniczych rozpuszczalników lub środków dyspergujących nie powinno powodować fitotoksyczności. Na przykład do powszechnie używanych rozpuszczalników, które nie powodują fitotoksyczności w stężeniach do 100 µl/l, należą aceton i dimetyloformamid. W przypadku użycia rozpuszczalnika lub środka dyspergującego w sprawozdaniu należy podać jego stężenie końcowe i utrzymać je na minimalnym poziomie ($\leq 100 \mu\text{l/l}$). W tych okolicznościach we wszystkich grupach badanych i grupach kontrolnych (kontrola z rozpuszczalnikiem) należy zachować takie samo stężenie rozpuszczalnika lub środka dyspergującego. Kontrolne próby stanowiące próbę kontrolną niepoddawaną działaniu substancji, które nie zawierają rozpuszczalnika ani środka dyspergującego, także są włączone do planu badania. Dalsze wskazówki na temat wykorzystania środków dyspergujących podano w wytycznych OECD (11).

PROCEDURA BADAWCZA

41. Procedura badawcza różni się w zależności od sposobu podawania badanej substancji chemicznej (tj. podczas fazy wodnej lub osadowej). Należy uwzględnić prawdopodobne zachowanie badanej substancji chemicznej w układzie woda-osad w celu poinformowania o wybranym schemacie narażenia stosowanym w ramach badania (tj. statycznym lub wymiany statycznej, wzbogaconej wodzie lub wzbogaconym osadzie). W niektórych przypadkach korzystniejsze może być prowadzenie badań wzbogaconego osadu w odniesieniu do substancji chemicznych, w przypadku których przewiduje się znaczące oddzielenie od osadu.

Faza ukorzenia

42. Zdrowe wierzchołki/końcówki pędów tj. bez bocznych pędów odcina się od kultury rośliny w celu uzyskania długości pędu wynoszącej 6 cm (± 1 cm). W planie badania A (jeden pęd w każdej doniczce i trzy doniczki w każdym naczyniu) w każdej doniczce umieszcza się pojedynczą końcówkę pędu. W planie badania B (trzy pędy w każdej doniczce i jedna doniczka w każdym naczyniu) w każdej doniczce wypełnionej osadem umieszcza się od czterech do pięciu wierzchołków pędu.
43. W obu przypadkach należy obsadzić większą liczbę doniczek w celu umożliwienia selekcji jednolitych roślin na etapie rozpoczęcia badania oraz w celu zapewnienia zapasowych roślin wykorzystywanych do inspekcji wzrostu korzeni bezpośrednio przed podaniem substancji chemicznej oraz zapasowych roślin, które będą zbierane na potrzeby przeprowadzenia pomiarów biomasy i długości pędów w dniu 0.
44. Pędy umieszcza się tak, aby około 3 cm rośliny, zakrywając co najmniej dwa węzły, znajdowały się pod powierzchnią osadu.
45. Następnie doniczki przenosi się do naczyń badawczych trzymanyh w tych samych warunkach otoczenia, co warunki fazy narażenia, i przetrzymuje przez 7 dni w pożywce Smarta i Barko w celu wywołania wzrostu korzeni.
46. Po tym czasie należy usunąć kilka roślin znajdujących się w dodatkowych doniczkach w celu zbadania wzrostu korzeni. Jeżeli wzrost korzenia nie jest widoczny (tj. końcówki korzenia nie są widoczne), należy wydłużyć fazę ukorzenia do czasu, gdy wzrost korzenia będzie widoczny. Zaleca się przeprowadzenie tego etapu w celu zapewnienia aktywnego wzrostu roślin w chwili rozpoczęcia badania.

Wybór jednolitego materiału roślinnego

47. W planie badania A (jeden pęd w każdej doniczce i trzy doniczki w każdym naczyniu) przed rozpoczęciem badania dokonuje się wyboru roślin w doniczkach pod kątem jednorodności. W planie badania B (trzy pędy w każdej doniczce i jedna doniczka w każdym naczyniu), rośliny stanowiące nadwyżkę usuwa się i zostawia się trzy rośliny o jednolitym rozmiarze i wyglądzie.

Narażenie na działanie substancji podczas fazy wodnej

48. Rośliny w doniczkach, które wybrano z powodu ich jednorodności, umieszcza się w naczyniach badawczych zgodnie z wymogami układu doświadczalnego. Następnie do naczynia badawczego dodaje się pożywkę Smarta i Barko. Należy dołożyć starań, aby uniknąć wzburzenia osadu. W tym celu można dodać pożywkę przy wykorzystaniu lejka lub dysku wykonanego z tworzywa sztucznego służącego do przykrycia osadu podczas wlewania pożywki do naczyń badawczych, pod warunkiem że dysk zostanie od razu usunięty. Ewentualnie doniczki z roślinami można umieścić w naczyniach badawczych po dodaniu pożywki. W obu przypadkach na początku fazy narażenia można korzystać ze świeżych pożywek, jeżeli jest to niezbędne do zminimalizowania potencjalnego nagromadzenia glonów i bakterii lub do umożliwienia przygotowania pojedynczych partii roztworu do badań we wszystkich kontrpróbach.
49. Długość pędu wystającą poza osad mierzy się przed dodaniem pożywki lub albo po jej dodaniu.
50. Przed wprowadzeniem pożywki użytej do badań do naczyń badawczych do pożywki można dodać odpowiednią ilość badanej substancji chemicznej. Ewentualnie badaną substancję chemiczną można wprowadzić do pożywki po wprowadzeniu jej do naczyń badawczych. Należy dopilnować, aby badana substancja chemiczna została równomiernie rozprowadzona w całym układzie badawczym bez wzburzenia osadu.
51. We wszystkich przypadkach na początku badania odnotowuje się wygląd pożywek użytych do badań (np. czy są przejrzyste, mętne itd.).

Narażenie na działanie substancji poprzez osad

52. Wzbogacone osady wybranego stężenia przygotowuje się poprzez dodanie roztworu badanej substancji chemicznej bezpośrednio do świeżego osadu. Roztwór podstawowy badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w wodzie dejonizowanej miesza się z osadem preparowanym przy użyciu walcarki, mieszalnika pasz lub ręcznie. Jeżeli badana substancja chemiczna słabo rozpuszcza się w wodzie, można ją rozpuścić w jak najmniejszej objętości odpowiedniego rozpuszczalnika organicznego (np. heksanu, acetonu lub chloroformu). Roztwór taki następnie miesza się z drobnym piaskiem kwarcowym w ilości około 10 gramów na jedno naczynie badawcze. Należy pozwolić, by rozpuszczalnik wyparował, a następnie zmieszać piasek z ilością osadu odpowiednią dla każdej zlewki użytej w badaniu. Do rozpuszczania, rozpraszania lub emulgacji badanej substancji chemicznej można używać jedynie łatwo ulatniających się czynników. Należy pamiętać o tym, że należy uwzględnić objętość/masę piasku wzbogaconego o badaną substancję chemiczną w gotowym preparacie osadu (tj. osad należy zatem przygotować z mniejszej ilości piasku). Należy dopilnować, aby badana substancja chemiczna dodana do osadu została dokładnie i równomiernie rozprowadzona w osadzie.
53. Doniczki napełnia się wzbogaconym osadem (jak opisano powyżej). Rośliny, które wybrano ze względu na ich jednorodność oraz odpowiedni system korzeniowy, wyjmuje się z doniczek wykorzystywanych w fazie ukorzeniania i przenosi się je do wzbogaconego osadu, jak opisano powyżej.
54. Doniczki umieszcza się w naczyniach badawczych zgodnie z wymogami układu doświadczalnego. Następnie ostrożnie dodaje się pożywkę Smarta i Barko (tj. z użyciem lejka) w celu uniknięcia wzburzenia osadu. Długość pędu wystającą ponad osad mierzy się przed dodaniem pożywki albo po jej dodaniu.

Utrzymanie poziomu wody w czasie trwania badania

55. Należy odnotować końcową objętość wody i zaznaczyć poziom wody na każdym naczyniu badawczym. Jeżeli w czasie trwania badania wyparuje więcej niż 10 % wody, poziom wody należy dostosować przy użyciu wody destylowanej. W razie potrzeby zlewki można luźno przykryć przezroczystym wieczkiem, takim jak przezroczyste pokrywy z tworzywa sztucznego, aby zminimalizować parowanie i zanieczyszczenie zarodnikami glonów.

Warunki badania

56. Oświetlenie w postaci ciepłego lub chłodnego białego światła fluorescencyjnego jest używane do zapewnienia natężenia promieniowania z zakresu około 140 (\pm 20) $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, mierzonego jako promieniowanie fotosyntetycznie czynne (400–700 nm) na powierzchni wody i przy zastosowaniu rytmu dzień/noc w stosunku 16:8 godzin. Jakikolwiek odstępstwa od wybranego natężenia promieniowania nie powinny przekraczać \pm 15 %.

57. Temperatura w naczyniach badawczych wynosi 20 ± 2 °C.
58. Wartość pH pożywki kontrolnej nie powinna wzrosnąć w trakcie badania o więcej niż 1,5 jednostki. Odchylenie o więcej niż 1,5 jednostki nie spowoduje jednak unieważnienia badania, jeśli można wykazać, że spełniono określone wcześniej kryteria ważności.

Czas trwania badania

59. Okres narażenia wynosi 14 dni.

Pomiary i oznaczenia analityczne

60. Po zakończeniu fazy ukorzenia i bezpośrednio przed poddaniem działaniu substancji chemicznej (tj. w dniu 0) zbiera się dodatkowe rośliny z pięciu losowo wybranych doniczek w układzie uwzględniającym trzy rośliny w jednej doniczce lub z 15 doniczek w układzie uwzględniającym jedną roślinę w jednej doniczce w celu oceny długości pędów oraz mokrej i suchej masy, jak opisano poniżej.
61. Rośliny przeniesione do fazy narażenia poddaje się następującym ocenom, które przedstawiono w tabeli 1:
- wyniki oceny długości pędu głównego, liczby pędów bocznych i długości pędów bocznych odnotowuje się przynajmniej pod koniec okresu narażenia (tj. w dniu 14);
 - wyniki oceny wizualnej stanu zdrowia roślin odnotowuje się co najmniej trzy razy podczas okresu narażenia (tj. w dniach 0, 7 i 14);
 - oceny mokrej masy i suchej masy pędów przeprowadza się pod koniec badania (tj. w dniu 14).
62. Długość pędów określa się przy użyciu linijki. Jeżeli obecne są pędy boczne, należy również dokonać pomiaru ich liczby i długości.
63. Oceny wizualne stanu zdrowia roślin przeprowadza się poprzez odnotowanie wyglądu roślin oraz ogólnego stanu pożywki użytej do badań. Należy zanotować następujące obserwacje:
- występowanie nekrozy, chlorozy lub innego odbarwienia, takiego jak nadmierne czerwienienie w porównaniu z roślinami kontrolnymi;
 - rozwój zanieczyszczenia bakteriami lub glonami;
 - występowanie anomalii wzrostu takich jak karłowatość, zmienionej odległości między węzłami, zniekształconych pędów/liści, proliferacji pędów bocznych, utraty liści, utraty turgoru i fragmentacji łodygi;
 - oceny wizualne stanu zdrowia korzenia przeprowadza się na zakończenie badania, ostrożnie wymywając osad z korzeni w celu umożliwienia obserwacji systemu korzeniowego. Poniżej przedstawiono proponowaną skalę oceny w stosunku do roślin kontrolnych:
 - 1) brak korzeni
 - 2) kilka korzeni
 - 3) korzenie rozwinięte w stopniu umiarkowanym
 - 4) bardzo dobrze rozwinięte korzenie, przypominające korzenie roślin z próby kontrolnej.
64. Oceny mokrej masy przeprowadza się na początku i na koniec badania, odcinając pęd na poziomie osadu, a następnie osuszając go przed ważeniem. Należy dopilnować, by usunąć cząsteczki osadu, które mogą przywierać do podstawy pędu. Następnie przed ponownym ważeniem i odnotowaniem suchej masy materiał składający się z pędów umieszcza się w piecu suszarniczym w temperaturze około 60 °C i suszy się do uzyskania stałej masy.
65. W tabeli 1 przedstawiono podsumowanie minimalnych ocen biologicznych, które należy przeprowadzić w czasie trwania badania.

Tabela 1

Harmonogram przeprowadzania ocen

Dzień po podaniu działania substancji chemicznej (DAT)	<i>Myriophyllum spicatum</i>			
	Długość pędu, długość pędów bocznych i ich liczba	Ocena wizualna pędów	Mokra i sucha masa pędu Ocena wizualna korzeni	pH O ₂
0	A	A	A	A
4	—	—	—	—
7	—	A	—	A
14	A	A	A	A

A: wskazuje, że w tych sytuacjach wymagane jest przeprowadzenie ocen
 —: wskazuje brak potrzeby przeprowadzania pomiarów

Częstotliwość pomiarów i oznaczeń analitycznych

66. Temperaturę pożywki w naczyniu uzupełniającym przetrzymywanym w takich samych warunkach w komorze wzrostu, inkubatorze lub pomieszczeniu należy odnotowywać co najmniej codziennie (lub w sposób ciągły przy użyciu rejestratora).
67. Wartość pH pożywki użytej do badań i zawarte w niej stężenie rozpuszczonego tlenu należy sprawdzać na początku badania, co najmniej raz w trakcie badania i na koniec badania we wszystkich naczyniach z kontrpróbą. Pomiaru należy przeprowadzać za każdym razem o tej samej porze dnia. Jeżeli do przygotowania wszystkich kontrprób zawierających każde badane stężenie wykorzystuje się roztwory o dużej objętości, dopuszczalne jest przeprowadzenie jednego pomiaru każdego roztworu o dużej objętości w dniu 0.
68. Natężenie promieniowania należy mierzyć w komorze wzrostu, inkubatorze lub pomieszczeniu w punktach odpowiadających poziomowi powierzchni wody. Pomiaru należy przeprowadzać co najmniej raz na początku badania lub w ciągu badania. Metoda detekcji i pomiaru światła, w szczególności typ czujnika, będzie miała wpływ na wartość pomiarową. Nad czujniki jednokierunkowe przedkładane są czujniki sferyczne (które reagują na światło padające pod wszystkimi kątami powyżej i poniżej płaszczyzny pomiaru) oraz czujniki „kosinusowe” (które reagują na światło padające pod wszystkimi kątami powyżej płaszczyzny pomiaru) i dają wyższe odczyty w przypadku opisywanego tu typu wielopunktowego źródła światła.

Pomiary analityczne badanej substancji chemicznej

69. Prawidłowe stosowanie badanej substancji chemicznej należy potwierdzić wynikami pomiarów analitycznych stężeń badanej substancji chemicznej.
70. Próbkę wody ze wszystkich badanych stężeń, które posłużą do przeprowadzenia analizy badanej substancji chemicznej, należy pobrać krótko po rozpoczęciu badania (tj. w dniu podania substancji w przypadku stabilnych badanych substancji chemicznych lub godzinę po podaniu substancji w przypadku niestabilnych substancji chemicznych) oraz na koniec badania.
71. Stężenia w osadzie i w osadowej wodzie porowej należy określić na początku i na końcu badania przynajmniej w próbce zawierającej najwyższe badane stężenie, chyba że wiadomo, iż badana substancja chemiczna jest stabilna w wodzie (> 80 % stężenia nominalnego). Przeprowadzenie pomiarów osadu i wody porowej może nie być konieczne, jeżeli podział badanej substancji chemicznej między wodą a osadem został wyraźnie określony w badaniu stosunku woda/osad przeprowadzonym w porównywanych warunkach (np. stosunek osadu do wody, metoda podania, rodzaj osadu).

72. Istnieje prawdopodobieństwo, że pobieranie próbek osadu na początku badania zaburzy stabilność układu badawczego. W związku z tym wymagane może być użycie dodatkowych naczyń badawczych zawierających badaną substancję chemiczną, które ułatwią wykonywanie oznaczeń analitycznych na początku i na końcu badania. Podobnie, jeżeli istnieje konieczność przeprowadzenia ocen pośrednich, tj. w dniu 7, a do przeprowadzenia analizy potrzebne są duże próbki osadu, których nie można w łatwy sposób pobrać z układu badawczego, należy przeprowadzić oznaczenia analityczne z wykorzystaniem dodatkowych naczyń badawczych, w których substancję chemiczną podano w taki sam sposób, jak w naczyniach wykorzystywanych do przeprowadzenia ocen biologicznych.
73. Aby oddzielić wodę porową, zaleca się odwirowanie np. przy 10 000 g w temp. 4°C przez 30 minut. Jeżeli jednak wykazano, że badana substancja chemiczna nie jest absorbowana przez filtry, dopuszczalna jest również filtracja. W niektórych przypadkach analiza stężeń w wodzie porowej może być niemożliwa ze względu na zbyt mały rozmiar próbki.
74. W badaniach półstatycznych (tj. w których narażenie na działanie substancji ma miejsce podczas fazy wodnej), w których nie oczekuje się, że stężenie danej badanej substancji chemicznej (danych badanych substancji chemicznych) utrzyma się w zakresie 20 % stężenia nominalnego w czasie trwania badania bez wymiany roztworów do badań, podczas każdej wymiany należy pobrać próbki wykorzystanych i świeżych roztworów do badań do celów analizy stężenia badanej substancji chemicznej.
75. W przypadkach, w których zmierzone stężenie początkowe badanej substancji chemicznej nie mieści się w granicach 20 % stężenia nominalnego, lecz można przedstawić wystarczające dowody wykazujące, że stężenia początkowe są powtarzalne i stabilne (tj. zawierają się w granicach 80–120 % stężenia początkowego), oznaczenia chemiczne można przeprowadzać tylko przy najwyższych i najniższych badanych stężeniach.
76. We wszystkich przypadkach oznaczenie stężeń badanej substancji chemicznej należy wykonywać wyłącznie na jednym naczyniu z kontrpróbą przy każdym badanym stężeniu. Ewentualnie na potrzeby analizy można połączyć roztwory do badań ze wszystkich kontrprób dla każdego stężenia.
77. Jeżeli istnieją dowody, że stężenie badanej substancji chemicznej zostało utrzymane w granicach 20 % nominalnego lub zmierzonego stężenia początkowego w ciągu całego badania, to analizę wyników i późniejsze wyprowadzenie punktów końcowych można oprzeć na nominalnych lub zmierzonych wartościach początkowych.
78. W tych przypadkach stężenia efektywne należy oszacować w oparciu o nominalne lub zmierzone stężenia substancji w wodzie na początku badania.
79. Jeżeli jednak istnieją dowody wskazujące na to, że w czasie trwania badania stężenie zmniejszyło się (tj. nie utrzymuje się w granicach 20 % nominalnego lub zmierzonego stężenia początkowego w komorze, w której podano substancję chemiczną), to analiza wyników należy oprzeć na średniej geometrycznej stężenia podczas narażenia lub na modelach opisujących spadek stężenia badanej substancji chemicznej w komorze, w której podano substancję chemiczną (11).

OCENA DANYCH

80. W przypadkach, w których wymagane jest użycie rozpuszczalnika / środka dyspergującego, na potrzeby przeprowadzenia analiz statystycznych można połączyć ze sobą dane z prób kontrolnych poddawanych działaniu rozpuszczalnika i prób kontrolnych niepoddawanych działaniu substancji, pod warunkiem że różnice w reakcji prób poddanych i niepoddanych działaniu rozpuszczalnika nie są w statystycznie istotny sposób różne.

Zmienne zależne

81. Celem badania jest określenie wpływu badanej substancji chemicznej na wzrost wegetatywny gatunków doświadczalnych przy wykorzystaniu dwóch zmiennych zależnych, średniej właściwej szybkości wzrostu i przyrostu, w następujący sposób:

Średnia właściwa szybkość wzrostu

82. Wartość niniejszej zmiennej zależnej określa się na podstawie zmian logarytmów całkowitej długości pędów, całkowitej mokrej masy pędów i całkowitej suchej masy pędów w czasie w próbach kontrolnych i w każdej grupie badanej. Wspomnianą zmienną oblicza się dla każdej kontrpróby z każdej grupy kontrolnej i grupy badanej. Należy obliczyć średnią długość i masę trzech roślin dla każdego naczynia badawczego (z kontrpróbą), a następnie obliczyć szybkość wzrostu dla każdej kontrpróby, korzystając z następującego wzoru:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

gdzie:

$\mu_{i,j}$: średnia właściwa szybkość wzrostu od czasu i do czasu j,

N_i : zmienna pomiarowa w naczyniu badawczym lub kontrolnym o czasie i,

N_j : zmienna pomiarowa w naczyniu badawczym lub kontrolnym o czasie j,

t: czas mierzony od i do j.

83. Z reakcji kontrprób należy wyliczyć średnią wartość szybkości wzrostu wraz z oszacowaniami wariancji dla każdej grupy badanej i grupy kontrolnej.
84. Średnią właściwą szybkość wzrostu należy obliczyć dla całego okresu badania (czas „i” w powyższym równaniu jest początkiem badania, a czas „j” jest końcem badania). Dla każdego badanego stężenia i dla każdej grupy kontrolnej należy obliczyć średnią wartość średniej właściwej szybkości wzrostu wraz z oszacowaniami wariancji.
85. Następnie można obliczyć procentowe zahamowanie szybkości wzrostu (I_r) dla każdego badanego stężenia (grupy badanej) zgodnie z poniższym wzorem:

$$\%I_r = \frac{(\mu_c - \mu_T)}{\mu_c} \times 100$$

gdzie:

% I_r : procentowe zahamowanie średniej właściwej szybkości wzrostu

μ_c : średnia wartość μ_{in} w próbie kontrolnej

μ_T : średnia wartość μ_{in} w grupa badanej

Przyrost

86. Wartość niniejszej zmiennej zależnej określa się na podstawie zmian całkowitej długości pędów, całkowitej mokrej masy pędów i całkowitej suchej masy pędów w czasie w próbach kontrolnych i w każdej grupie badanej. Średnią procentowe zahamowanie przyrostu (% I_y) można obliczyć dla każdej grupy badanej w następujący sposób:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

gdzie:

% I_y : procentowe zmniejszenie przyrostu

b_c : biomasa końcowa minus biomasa początkowa dla grupy kontrolnej

b_T : biomasa końcowa minus biomasa początkowa dla grupy badanej

Wykreślanie krzywych stężenie-odpowiedź

87. Należy wykreślić krzywe stężenie-odpowiedź wiążące średnie procentowe zahamowanie zmiennej zależnej (I_r lub I_y obliczone w sposób wskazany powyżej) i logarytm stężenia badanej substancji chemicznej.

Oszacowanie EC_x

88. Oszacowania EC_x (np. EC_{50}) powinny być oparte zarówno na średniej właściwej szybkości wzrostu (E_rC_x), jak i na przyroście (E_yC_x), przy czym każdy z tych parametrów powinien być z kolei oparty na całkowitej mokrej masie pędu, całkowitej suchej masie pędu i całkowitej długości pędów.
89. Należy zauważyć, że wartości EC_x obliczone przy użyciu tych dwóch zmiennych zależnych nie są porównywalne i różnicę tę należy uwzględnić przy wykorzystywaniu wyników badania. Jeżeli spełnione są warunki badania określone w niniejszej metodzie badawczej, wartości EC_x oparte na średniej właściwej szybkości wzrostu (E_rC_x) będą w większości przypadków wyższe od wyników opartych na przyroście (E_yC_x) ze względu na podstawę matematyczną tych podejść. Nie należy interpretować tego jako różnicy we wrażliwości pomiędzy tymi dwiema zmiennymi zależnymi, lecz jedynie jako stwierdzenie, że wartości te są różne pod względem matematycznym.

Procedury statystyczne

90. Celem jest uzyskanie ilościowej zależności stężenie-odpowiedź za pomocą analizy regresji. Możliwe jest zastosowanie ważonej regresji liniowej po przeprowadzeniu transformacji linearyzującej danych reakcji – na przykład do jednostek probit, logit albo Weibulla (13), lecz preferowane są procedury regresji nieliniowej, które lepiej sprawdzają się w przypadku nieuniknionych nieregularności danych i odchyień od wyrównanych rozkładów. Przy zbliżaniu się do zerowego albo całkowitego zahamowania nieregularności takie mogą zostać powiększone przez transformację, zakłócając analizę (13). Należy zwrócić uwagę, że standardowe metody analizy przy użyciu transformat probit, logit albo Weibulla są przeznaczone do stosowania do danych binarnych (np. dotyczących upadkowości lub przeżywalności) i muszą zostać zmodyfikowane, aby uwzględnić dane dotyczące szybkości wzrostu lub przyrostu. Szczegółowe procedury wyznaczania wartości EC_x na podstawie ciągłych danych można znaleźć w (14) (15) (16) (17).
91. Dla każdej zmiennej zależnej, która ma być analizowana, należy zastosować zależność stężenie-odpowiedź do obliczenia oszacowań punktowych wartości EC_x . Określa się 95 % granice ufności dla każdej zmiennej, przy czym zgodność danych reakcji z modelem regresji należy ocenić graficznie lub statystycznie. Analizę regresji należy przeprowadzić z zastosowaniem reakcji z poszczególnych kontrprób, a nie średnich z grup badanych.
92. Oszacowania wartości EC_{50} i granice ufności można również otrzymać przy użyciu interpolacji liniowej z zastosowaniem metody bootstrap (18), jeżeli dostępne modele/metody regresji są nieodpowiednie do danych.
93. W celu oszacowania LOEC, a następnie NOEC konieczne jest porównanie średnich z grup badanych przy użyciu technik analizy wariancji (ANOVA). Średnią dla każdego stężenia następnie porównuje się ze średnią kontrolną przy użyciu odpowiedniej metody badawczej (np. testów Dunnetta, Williamsa) (19) (20) (21) (22). Należy ocenić, czy przyjęte w ANOVA założenie rozkładu normalnego (ND) i jednorodności wariancji (VH) pozostaje ważne. Ocenę tę należy przeprowadzić za pomocą testu Shapiro-Wilka (ND) lub testu Levene'a (VH). Niespełnienie założenia o ND i jednorodności wariancji można niekiedy skorygować za pomocą transformacji logarytmicznej danych. Jeżeli heterogeniczność wariancji lub odchylenie od ND są ekstremalne i nie można ich skorygować przez transformację, należy rozważyć analizę za pomocą takich metod, jak test t Welcha z korektą Bonferroniego, regresyjny test Jonckheere'a Terpstry i test Mediana z korektą Bonferroniego. Dodatkowe wskazówki dotyczące wyznaczania NOEC można znaleźć w (16).

SPRAWOZDAWCZOŚĆ

94. Szczegółowe informacje zawarte w sprawozdaniu z badania są następujące:

Badana substancja chemiczna

Substancja jednoskładnikowa:

— wygląd fizyczny, rozpuszczalność w wodzie i dodatkowe istotne właściwości fizykochemiczne;

- dane identyfikacyjne substancji chemicznej, takie jak: nazwa IUPAC lub CAS, numer CAS, kod SMILES lub InChI, wzór strukturalny, czystość, nazwa chemiczna zanieczyszczeń, w stosownych przypadkach i jeśli jest to praktycznie wykonalne, itp.

Substancja wieloskładnikowa, UVCB i mieszaniny:

- opisane w miarę możliwości poprzez podanie nazwy chemicznej (zob. powyżej), określenie ilości oraz istotnych właściwości fizykochemicznych składników.

Gatunek doświadczalny

- nazwa systematyczna i źródło.

Warunki badania

- czas trwania i warunki fazy ukorzenia;
- zastosowana procedura badawcza (statyczna, półstatyczna lub z wykorzystaniem impulsów);
- data rozpoczęcia badania i czas jego trwania;
- pożywka użyta do badań, tj. osad i płynna pożywka;
- opis układu doświadczalnego: komora wzrostowa / pomieszczenie wzrostowe lub laboratorium, naczynia badawcze i przykrywki, objętości roztworów, długość i masa roślin użytych do badania w każdym naczyniu badawczym na początku badania, stosunek powierzchni osadu do powierzchni wody, stosunek objętościowy osadu i wody;
- badane stężenia (nominalne i zmierzone, w stosownych przypadkach) oraz liczba kontrprób na stężenie;
- metody przygotowywania roztworów podstawowych i roztworów do badań, w tym zastosowanie ewentualnych rozpuszczalników lub środków dyspergujących;
- temperatura podczas badania;
- źródło światła, natężenie promieniowania ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$);
- wartości pH pożywki użytej do badań i pożywki kontrolnej oraz wygląd pożywki użytej do badań na początku i na końcu;
- stężenia tlenu;
- metoda analizy wraz z odpowiednimi danymi oceny jakości (badania walidacyjne, odchylenia standardowe lub granice ufności analiz);
- metody określania zmiennych pomiarowych, np. długości, suchej masy, mokrej masy;
- wszelkie odstępstwa od niniejszej metody badawczej.

Wyniki

- dane pierwotne: długość pędu i masa pędów roślin/doniczkę oraz inne zmienne pomiarowe w każdym naczyniu badawczym i kontrolnym podczas każdej obserwacji i analizy zgodnie z harmonogramem oceny przedstawionym w tabeli 1;
- średnie i odchylenia standardowe dla każdej zmiennej pomiarowej;
- krzywe wzrostu dla każdego stężenia;
- czas podwojenia/szybkość wzrostu w próbie kontrolnej na podstawie długości pędu i mokrej masy z uwzględnieniem współczynnika zmienności dla przyrostu mokrej masy;
- obliczone zmienne zależne dla każdej kontrpróby poddanej działaniu substancji chemicznej wraz z wartościami średnimi i współczynnikiem zmienności dla kontrprób;
- graficzne przedstawienie zależności stężenie/skutek;
- oszacowania toksycznych punktów końcowych dla zmiennych zależnych, np. EC_{50} , oraz związane z nimi przedziały ufności. LOEC lub NOEC, jeżeli zostały obliczone, oraz metody statystyczne użyte do ich wyznaczenia;

- jeżeli zastosowano ANOVA – wielkość wpływu, który można wykryć (np. najmniejsza znacząca różnica);
- wszelka stymulacja wzrostu stwierdzona w którejkolwiek próbie poddanej działaniu substancji chemicznej;
- wszelkie wizualne oznaki fitotoksyczności, jak również obserwacje roztworów do badań;
- omówienie wyników, w tym ewentualny wpływ na wynik badania będący skutkiem odstępstw od niniejszej metody badawczej.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Rozdział C.26 niniejszego załącznika: Badanie inhibicji wzrostu u *Lemna* sp.,.
- (2) Rozdział C.3 niniejszego załącznika: Badanie zahamowania wzrostu słodkowodnych glonów i sinic
- (3) Maltby, L. *et al.* (2010), Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14–16 stycznia 2008 r.
- (4) Arts, G.H.P. *et al.* (2008), Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, *Environmental Pollution*, t. 153, s. 199–206.
- (5) ISO 16191:2013 Water quality– Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of *Myriophyllum aquaticum*.
- (6) Knauer, K. *et al.* (2006), Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants, *Pest Management Science*, t. 62/8, s. 715–722.
- (7) Rozdział C.50 niniejszego załącznika: Badanie toksyczności na *Myriophyllum spicatum* w układzie pozbawionym osadu.
- (8) Rozdział C.28 niniejszego załącznika: Badanie toksyczności w układzie osad-woda na ochotkowatych z wykorzystaniem wzbogaconej wody.
- (9) Ratte, M., H. Ratte (2014), „*Myriophyllum* Toxicity Test: Result of a ring test using *M. aquaticum* and *M. spicatum* grown in a water-sediment system”, Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, seria dotycząca badań i oceny nr 206, OECD Publishing, Paryż.
- (10) Davies, J. *et al.* (2003), Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron – a case study, *Pest Management Science*, t. 59/2, s. 231–237.
- (11) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria dotycząca badań i oceny, nr 23, OECD Publishing, Paryż.
- (12) Smart, R.M., J.W. Barko (1985), Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, *Aquatic Botany*, t. 21/3, s. 251–263.
- (13) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science and Technology*, t. 18/9, s. 713–718.
- (14) Nyholm, N. *et al.* (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chemistry*, t. 11/2, s. 157–167.
- (15) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, t. 11/10, 1485–1494.
- (16) OECD (2006), „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application”, Publikacje OECD na temat środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa, Seria dotycząca badań i oceny, nr 54, OECD Publishing, Paryż.
- (17) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, t. 29/2, s. 93–96.

-
- (18) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.
 - (19) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, t. 50/272, s. 1096–1121.
 - (20) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, t. 20/3, s. 482–491.
 - (21) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, t. 27/1, s. 103–117.
 - (22) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, t. 28/2, s. 519–531.
-

Dodatek 1

SKŁAD POŻYWKI SMARTA I BARKO

Składnik	Ilość odczynnika dodanego do wody (*) (mg/l)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	91,7
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	69,0
NaHCO_3	58,4
KHCO_3	15,4
pH (równowaga powietrza)	7,9

(*) woda demineralizowana (tj. destylowana lub dejonizowana)

Dodatek 2

DEFINICJE

Biomasa oznacza mokrą lub suchą masę materii żywej obecnej w populacji. W niniejszym badaniu biomasa stanowi sumę mas pędu głównego, wszystkich gałązek bocznych i wszystkich korzeni.

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Chloroza oznacza zmianę barwy organizmu doświadczalnego, w szczególności okółków, z zielonej na żółciejącą.

EC_x oznacza stężenie badanej substancji chemicznej rozpuszczonej w pożywce użytej do badań, powodujące ograniczenie wzrostu *Myriophyllum spicatum* o x % (np. o 50 %) w określonym okresie narażenia (który należy dokładnie określić, jeżeli odbiega od pełnego lub zwykłego czasu trwania badania). Aby jednoznacznie oznaczyć wartość EC wynikającą z szybkości wzrostu albo przyrostu, w odniesieniu do szybkości wzrostu używa się symbolu „E_xC”, a w odniesieniu do przyrostu – symbolu „E_yC”, po którym następuje użyta zmienna pomiarowa, np. E₁C (długość pędu głównego).

Wzrost oznacza wzrost wartości zmiennej pomiarowej, np. długości pędu głównego, całkowitej długości gałązek bocznych, całkowitej długości pędów, całkowitej długości korzenia, mokrej masy, suchej masy lub liczby okółków, w okresie badania.

Szybkość wzrostu (średnia właściwa szybkość wzrostu) oznacza logarytmiczny wzrost wartości zmiennej pomiarowej w okresie narażenia. Uwaga: zmienne zależne związane z szybkością wzrostu są niezależne od czasu trwania badania, o ile przebieg wzrostu organizmów kontrolnych nienarażonych na działanie substancji jest wykładniczy.

Najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany, (LOEC) oznacza najniższe badane stężenie, przy którym obserwuje się, że substancja chemiczna ma statystycznie istotny wpływ na ograniczenie wzrostu (przy $p < 0,05$) w porównaniu z grupą kontrolną w danym czasie narażenia. Jednakże wszystkie badane stężenia powyżej LOEC powinny wywierać szkodliwy skutek równy skutkom lub większy niż skutki obserwowane przy LOEC. W przypadku gdy oba warunki nie mogą być spełnione, należy szczegółowo wyjaśnić, w jaki sposób wybrano LOEC (a następnie NOEC).

Zmienne pomiarowe oznaczają dowolnego typu zmienne, które mierzy się, aby wyrazić punkt końcowy przy użyciu jednej zmiennej zależnej lub większej ich liczby. W niniejszej metodzie badawczej długość pędu głównego, całkowita długość gałązek bocznych; całkowita długość pędów, całkowita długość korzenia, mokra masa, sucha masa oraz liczba okółków stanowią zmienne pomiarowe.

Monokultura oznacza kulturę z jednym gatunkiem rośliny.

Nekroza oznacza martwą (tj. barwy białej lub ciemnobrązowej) tkankę organizmu doświadczalnego.

Najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian, (NOEC) oznacza badane stężenie bezpośrednio poniżej LOEC.

Zmienna zależna oznacza zmienną służącą do szacowania toksyczności, uzyskaną z dowolnych zmierzonych zmiennych opisujących biomasę za pomocą różnych metod obliczania. W przypadku niniejszej metody badawczej szybkość wzrostu i przyrost są zmiennymi zależnymi wyprowadzonymi ze zmiennych pomiarowych, takich jak: długość pędu głównego, całkowita długość pędów, mokra masa, sucha masa czy liczba okółków.

Badanie półstatyczne (z wymianą) oznacza badanie, w którym roztwór do badań jest okresowo wymieniany w określonych odstępach czasu w trakcie badania.

Badanie statyczne oznacza metodę badawczą bez wymiany roztworu do badań w trakcie badania.

Badana substancja chemiczna oznacza każdą substancję lub mieszaninę badaną za pomocą niniejszej metody badawczej.

Punkt końcowy badania opisuje ogólny czynnik, który będzie ulegał zmianie pod wpływem badanej substancji chemicznej w porównaniu z grupą kontrolną, co jest celem badania. W niniejszej metodzie badawczej punktem końcowym badania jest zahamowanie wzrostu, które można wyrazić za pomocą różnych zmiennych zależnych opartych na jednej zmiennej pomiarowej lub większej ich liczbie.

Pożywka użyta do badań oznacza kompletną syntetyczną pożywkę, na której wzrastają rośliny wykorzystywane do badań, gdy są narażone na działanie badanej substancji chemicznej. Badana substancja chemiczna jest zwykle rozpuszczona w pożywce użytej do badania.

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

Przyrost oznacza wartość zmiennej pomiarowej wyrażającą biomasę na końcu okresu narażenia pomniejszoną o wartość zmiennej pomiarowej na początku okresu narażenia. Uwaga: jeżeli przebieg wzrostu organizmów nienarażonych na działanie substancji jest wykładniczy, wartość zmiennych zależnych opartych na przyroście będzie ulegała zmniejszeniu wraz z upływem czasu trwania badania..”.
