

II

(Nezakonodajni akti)

UREDBE

UREDBA KOMISIJE (EU) 2017/735

z dne 14. februarja 2017

o spremembi Priloge k Uredbi (ES) št. 440/2008 o določitvi testnih metod v skladu z Uredbo (ES) št. 1907/2006 Evropskega parlamenta in Sveta o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH) zaradi njene prilagoditve tehničnemu napredku

(Besedilo velja za EGP)

EVROPSKA KOMISIJA JE –

ob upoštevanju Pogodbe o delovanju Evropske unije,

ob upoštevanju Uredbe (ES) št. 1907/2006 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 18. decembra 2006 o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH) ter o ustanovitvi Evropske agencije za kemikalije in o spremembi Direktive 1999/45/ES ter o razveljavitvi Uredbe Sveta (EGS) št. 793/93 in Uredbe Komisije (ES) št. 1488/94 ter Direktive Sveta 76/769/EGS in direktiv Komisije 91/155/EGS, 93/67/EGS, 93/105/ES in 2000/21/EC ⁽¹⁾, in zlasti člena 13(2) Uredbe,

ob upoštevanju naslednjega:

- (1) Uredba Komisije (ES) št. 440/2008 ⁽²⁾ vsebuje preskusne metode za ugotavljanje fizikalno-kemijskih lastnosti, toksičnosti in ekotoksičnosti kemikalij, ki se uporabljajo za namene Uredbe (ES) št. 1907/2006.
- (2) Uredbo (ES) št. 440/2008 je treba posodobiti, da bo vključevala nove in posodobljene preskusne metode, ki jih je nedavno sprejela Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj (OECD), da bo upoštevala tehnični napredek in da se zagotovi zmanjšanje števila živali, ki se uporabljajo v poskusne namene, v skladu z Direktivo 2010/63/EU Evropskega parlamenta in Sveta ⁽³⁾. O tem osnutku so bila opravljena posvetovanja z deležniki.
- (3) Prilagoditev tehničnemu napredku vsebuje dvajset preskusnih metod: novo metodo za ugotavljanje fizikalno-kemijske lastnosti, pet novih in eno posodobljeno preskusno metodo za oceno ekotoksičnosti, dve posodobljeni preskusni metodi za oceno usode in vedenja v okolju ter štiri nove in sedem posodobljenih preskusnih metod za ugotavljanje učinkov na zdravje ljudi.
- (4) OECD redno pregleduje svoje smernice za preskušanje, da ugotovi, katere so znanstveno zastarele. S to prilagoditvijo tehničnemu napredku se črta šest metod, za katere so bile ustrezne smernice OECD za preskušanje razveljavljene.

⁽¹⁾ UL L 396, 30.12.2006, str. 1.

⁽²⁾ Uredba Komisije (ES) št. 440/2008 z dne 30. maja 2008 o določitvi testnih metod v skladu z Uredbo (ES) št. 1907/2006 Evropskega parlamenta in Sveta o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH) (UL L 142, 31.5.2008, str. 1).

⁽³⁾ Direktiva 2010/63/EU Evropskega parlamenta in Sveta z dne 22. septembra 2010 o zaščiti živali, ki se uporabljajo v znanstvene namene (UL L 276, 20.10.2010, str. 33).

- (5) Uredbo (ES) št. 440/2008 bi bilo zato treba ustrezno spremeniti.
- (6) Ukrepi iz te uredbe so v skladu z mnenjem odbora, ustanovljenega v skladu s členom 133 Uredbe (ES) št. 1907/2006 –

SPREJELA NASLEDNJO UREDBO:

Člen 1

Priloga k Uredbi (EU) št. 440/2008 se spremeni v skladu s Prilogo k tej uredbi.

Člen 2

Ta uredba začne veljati dvajseti dan po objavi v *Uradnem listu Evropske unije*.

Ta uredba je v celoti zavezujoča in se neposredno uporablja v vseh državah članicah.

V Bruslju, 14. februarja 2017

Za Komisijo
Predsednik
Jean-Claude JUNCKER

PRILOGA

Priloga k Uredbi (ES) št. 440/2008 se spremeni:

(1) V delu A se doda naslednje poglavje:

„A.25 DISOCIACIJSKE KONSTANTE V VODI (TITRACIJSKA METODA – SPEKTROFOTOMETRIČNA METODA – KONDUKTOMETRIČNA METODA)

UVOD

Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD 112 (1981).

Predpogoji

- Ustrezna analitska metoda
- Topnost v vodi

Napotki

- Strukturna formula
- Električna prevodnost za konduktometrično metodo

Omejitvene izjave

- Vse preskusne metode se lahko izvedejo na čistih snoveh ali snoveh komercialne čistosti. Upoštevati je treba morebitne učinke nečistot na rezultate.
- Titracijska metoda ni primerna za slabo topne snovi (glej Preskusne raztopine v nadaljevanju).
- Spektrofotometrična metoda se uporablja le za snovi, ki imajo precej drugačen absorpcijski spekter UV/vidne svetlobe za disociirane in nedisociirane oblike. Ta metoda je lahko primerna tudi za slabo topne snovi in nekislinsko-bazične disociacije, npr. tvorbo kompleksa.
- V primerih, v katerih drži Onsagerjeva enačba, se lahko konduktometrična metoda uporablja tudi pri razmeroma nizkih koncentracijah in celo v primerih nekislinsko-bazičnega ravnotežja.

Standardni dokumenti

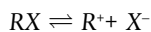
Ta preskusna metoda temelji na metodah iz virov, navedenih v oddelku „Viri“, in na Predhodnem osnutku smernic za prijavo nove snovi (Preliminary Draft Guidance for Premanufacture Notification) Agencije za varstvo okolja ZDA (EPA), 18. avgust 1978.

METODA – UVOD, NAMEN, PODROČJE UPORABE, POMEN, UPORABA IN OMEJITVE PRESKUSA

Pri oceni vpliva snovi na okolje je pomembna njena disociacija v vodi. Ta vpliva na obliko snovi, ki določa njeno vedenje in transport. Lahko vpliva na adsorpcijo kemikalije v tla in sedimente ter absorpcijo v biološke celice.

Opredelitve in enote

Disociacija je reverzibilen razcep v eno ali več kemijskih oblik, ki so lahko ionske. Proces je običajno označen z enačbo:



in konstanta ravnotežnih koncentracij, ki vpliva na reakcijo, je

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

Na primer v posebnem primeru, v katerem je R vodik (snov je kislina), je konstanta:

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

ali

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

Referenčne snovi

Naslednjih referenčnih snovi ni treba uporabiti vsakič, ko se preučuje nova snov. Navedene so zlasti zato, da se lahko občasno izvede kalibracija metode ter da se lahko v primeru uporabe druge metode primerjajo rezultati.

	pK _a (1)	Temp. v °C
p-nitrofenol	7,15	25 (1)
benzojska kislina	4,12	20
p-kloroanilin	3,93	20

(1) Za 20 °C vrednost ni na voljo, vendar se lahko predvideva, da je variabilnost rezultatov meritev večja kot pričakovana odvisnost od temperature.

Koristno bi bilo imeti snov z več vrednostmi pK, kot je navedeno v Načelu metode v nadaljevanju. Taka snov bi lahko bila:

citronska kislina	pK _a (8)	Temp. v °C
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Načelo preskusne metode

Opisani kemijski proces je na splošno le malo odvisen od temperature v okoljsko ustreznem temperaturnem območju. Za določanje konstante disociacije je potrebno merjenje koncentracij disociiranih in nedisociiranih oblik kemijske snovi. Ustrezna konstanta se lahko določi na podlagi poznavanja stehiometrije disociacijske reakcije, kot je navedeno v Opredelitvah in enotah. V posebnem primeru, opisanem pri tej preskusni metodi, se snov vede kot kislina ali baza, in najprimernejši način za določitev je ugotovitev relativnih koncentracij ioniziranih in neioniziranih oblik snovi ter vrednosti pH raztopine. Razmerje med temi elementi se izračuna po enačbi za pK_a, ki je navedena v Opredelitvah in enotah. Nekatere snovi imajo več kot eno konstanto disociacije in razviti je mogoče podobne enačbe. Nekatere tukaj opisane metode so primerne tudi za disociacijo nekislin/baz.

Merila kakovosti

Ponovljivost

Konstanto disociacije bi bilo treba ponoviti (najmanj tri določanja) v območju ± 0,1 logaritemske enote.

OPIS PRESKUSNEGA POSTOPKA

Za določitev vrednosti pK_s obstajata dva osnovna pristopa. Eden vključuje titracijo znane količine snovi s standardno kislino ali bazo, kot je ustrezno; drugi pa ugotovitev relativne koncentracije ioniziranih in neioniziranih oblik ter njihove odvisnosti od vrednosti pH.

Priprave

Metode, ki temeljijo na navedenih načelih, se lahko razvrstijo kot titracija, spektrofotometrični in konduktometrični postopek.

Preskusne raztopine

Pri titracijski in konduktometrični metodi je treba kemično snov raztopiti v destilirani vodi. Pri spektrofotometrični metodi in drugih metodah se uporabljajo pufrske raztopine. Koncentracija preskusne snovi ne sme presegati 0,01 M ali polovice koncentracije nasičenosti in pri pripravi raztopin je treba uporabiti najčistejšo obliko snovi, ki je na voljo. Če je snov le težko topna, se lahko raztopi v majhni količini topila, ki se meša z vodo, preden se doda k zgoraj navedenim koncentracijam.

Z uporabo Tyndallovega pramena svetlobe je treba preveriti, ali so v raztopinah prisotne emulzije, zlasti če je bilo za povečanje topnosti uporabljeno sotopilo. Kadar se uporabljajo pufrske raztopine, koncentracija puфра ne bi smela presegati 0,05 M.

Preskusni pogoji

Temperatura

Temperaturo je treba nadzorovati pri vsaj ± 1 °C. Določanje bi bilo treba po možnosti izvesti pri 20 °C.

Če obstaja sum odvisnosti od temperature, je treba določanje izvesti pri vsaj še dveh drugih temperaturah. V tem primeru morajo biti temperaturni intervali 10 °C, nadzor temperature pa pri $\pm 0,1$ °C.

Analize

Metoda se določi glede na naravo snovi, ki se preskuša. Biti mora dovolj občutljiva, da se lahko pri vsaki posamezni koncentraciji preskusne raztopine določijo različne oblike.

Izvedba preskusa

Titracijska metoda

Preskusna raztopina se določi s titracijo s raztopino standardne baze ali kisline, kot je ustrezno, pri čemer se po vsakem dodajanju titranta izmeri vrednost pH. Pred ekvivalentno točko ga je treba posamično dodati vsaj desetkrat. Če je ravnotežje doseženo dokaj hitro, se lahko uporabi zapisovalni potenciometer. Pri tej metodi mora biti natančno znana skupna količina snovi in njena koncentracija. Izvajati je treba ukrepe za preprečitev vdora ogljikovega dioksida. Podrobnosti o postopku, ukrepih in izračunu so navedene v standardnih preskusih, npr. v virih (1) (2) (3) (4).

Spektrofotometrična metoda

Kadar se koeficienti ekstinkcije ioniziranih in neioniziranih oblik snovi znatno razlikujejo, se določi valovna dolžina. Absorpcijski spekter UV/vidne svetlobe se pridobi iz raztopin s konstantno koncentracijo pri vrednosti pH, pri kateri je snov v glavnem neionizirana in popolnoma ionizirana, ter pri več vmesnih vrednostih pH. To je mogoče izvesti bodisi tako, da se v razmeroma veliko količino raztopine snovi v večkomponentnem pufru postopoma dodaja koncentrirana kislina (baza), sprva pri visoki (nizki) vrednosti pH (ref. 5), bodisi tako, da se v konstantne količine različnih pufrskih raztopin, ki obsegajo želeni razpon vrednosti pH, dodajajo enake količine osnovne raztopine snovi v npr. vodi, metanolu. Zadostno število vrednosti za pK_s se iz vrednosti pH in absorbance pri izbrani valovni dolžini izračuna tako, da se uporabijo podatki za vsaj 5 vrednosti pH, pri katerih je snov ionizirana v razponu od vsaj 10 % do manj kot 90 %. Nadaljnje podrobnosti o preskusu in metodi izračuna so na voljo v viru (1).

Konduktometrična metoda

Z uporabo celice z majhno, znano celično konstanto se izmeri prevodnost približno 0,1 M raztopine snovi v prevodni vodi. Izmerijo se tudi prevodnosti določenega števila natančno narejenih razredčitev te raztopine. Koncentracija se vsakič prepolovi, serije pa bi morale obsegati vsaj en red velikosti v koncentraciji. Omejena prevodnost pri neskončni razredčitvi se ugotovi z izvedbo podobnega poskusa z natrijevo soljo in ekstrapolacijo. Nato se lahko z Onsagerjevo enačbo iz prevodnosti vsake raztopine izračuna stopnja disociacije, iz česar se lahko z Ostwaldovim zakonom razredčenja izračuna konstanta disociacije po enačbi $K = \alpha^2 C / (1 - \alpha)$, pri čemer je C koncentracija v molih na liter, α pa disociirana frakcija. Izvajati je treba ukrepe za preprečitev vdora CO_2 . Nadaljnje podrobnosti o preskusu in metodi izračuna so na voljo v standardnih besedilih ter virih (1) (6) (7).

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

Titracijska metoda

Vrednost pK_a se izračuna za 10 merjenih točk na titracijski krivulji. Izračunata se odklon srednje vrednosti in standardni odklon takih vrednosti pK_a . Poleg predstavitve v preglednicah bi bilo treba vključiti grafični prikaz vrednosti pH glede na volumen standardne baze ali kisline.

Spektrofotometrične metode

Absorbanco in vrednost pH je treba za vsak spekter predstaviti v preglednicah. Vsaj pet vrednosti za vrednost pK_a se izračuna iz podatkovnih točk znotraj spektra, izračunata se tudi srednja vrednost in standardni odklon teh rezultatov.

Konduktometrična metoda

Za vsako koncentracijo kisline in vsako koncentracijo mešanice enega ekvivalenta kisline in 0,98 ekvivalenta natrijevega hidroksida brez karbonatov, se izračuna ekvivalent prevodnosti Λ . Kislina je v presežku, da se prepreči presežni OH^- zaradi hidrolize. Razmerje $1 / \Lambda$ je grafično prikazano glede na \sqrt{C} in Λ_0 soli se lahko ugotovi z ekstrapolacijo na nično koncentracijo.

Vrednost Λ_0 kisline se lahko izračuna z uporabo vrednosti za H^+ in Na^+ iz virov. Vrednost pK_a za vsako koncentracijo se lahko izračuna po enačbi $\alpha = \Lambda_1 / \Lambda_0$ in $K_a = \alpha^2 C / (1 - \alpha)$. Za K_a se lahko dobijo boljše vrednosti s popravki za mobilnost in aktivnost. Izračunati bi bilo treba srednjo vrednost in standardni odklon vrednosti pK_a .

Poročilo o preskusu

Vse neobdelane podatke in izračunane vrednosti pK_a je treba predložiti skupaj z metodo izračuna (po možnosti v obliki preglednic, kot je predlagano v ref. 1) ter opisanimi statističnimi parametri. Pri titracijski metodi je treba navesti podrobnosti o standardizaciji titrantov.

Pri spektrofotometrični metodi je treba navesti vse spektre. Pri konduktometrični metodi je treba poročati o podrobnostih določanja konstante celice. Navesti bi bilo treba informacije o uporabljeni tehniki, analitski metodi in naravi vseh uporabljenih pufrov.

Poročati bi bilo treba o preskusnih temperaturah.

VIRI

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

- (3) ASTM D 1293 (1974). Annual ASTM Standards, Philadelphia.
 - (4) Standard Method 242. APHA/AWWA/WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, 14. izdaja, American Public Health Association, Washington, D. C., 1976.
 - (5) Clark, J. in Cunliffe, A. E. (marec 1973). Rapid spectrophotometric measurement of ionisation constants in aqueous solution. *Chem. Ind. (London)* 281.
 - (6) ASTM D 1125 (1974). Annual ASTM Standards, Philadelphia.
 - (7) Standard Method 205 – APHA/AWWA/NPCF (glej (4) zgoraj).
 - (8) *Handbook of Chemistry and Physics*, 60. izdaja. CRC-Press, Boca Raton, Florida, 33431 (1980).“
- (2) Poglavlje B.5 dela B se nadomesti z naslednjim:

„B.5 AKUTNO DRAŽENJE OČI/JEDKOST ZA OČI

UVOD

Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD (TG) 405 (2012). Smernice OECD za preskušanje kemikalij se redno preverjajo, s čimer se zagotovi, da izražajo najboljša razpoložljiva znanstvena spoznanja. Pri prejšnjih preverjanjih te smernice za preskušanje je bila posebna pozornost namenjena možnim izboljšavam z ocenjevanjem vseh obstoječih podatkov o preskusni kemikaliji, da bi se izognili nepotrebnim testiranjem na živalih v laboratoriju in tako obravnavali pomisleke glede dobrobiti živali. V smernico TG 405 (sprejeto leta 1981 ter posodobljeno v letih 1987, 2002 in 2012) je vključeno priporočilo, da je treba pred začetkom izvajanja opisanega preskusa akutnega draženja oči/jedkosti za oči *in vivo* izvesti analizo, ki temelji na zanesljivosti dokazov (1), na podlagi ustreznih obstoječih podatkov. Kadar ni na voljo dovolj podatkov, je priporočljivo, da se pridobijo z uporabo zaporednega preskušanja (2) (3). Strategija preskušanja vključuje izvajanje validiranih in sprejetih preskusov *in vitro* ter se zagotovi kot dodatek k tej preskusni metodi. Celovita strategija preskušanja je za namen Uredbe (ES) št. 1907/2006 o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH) ⁽¹⁾ vključena tudi v ustrezne smernice agencije ECHA (21). Testiranja na živalih je treba izvesti šele, če se po proučitvi razpoložljivih alternativnih metod ugotovi, da so nujni in da je uporaba navedenih metod primerna. Ob pripravi te posodobljene preskusne metode se pojavljajo primeri, ko je njena uporaba še vedno potrebna ali se zahteva v skladu z nekaterimi regulativnimi okviri.

Zadnja posodobitev je bila v glavnem usmerjena na uporabo analgetikov in anestetikov ter ni vplivala na osnovni koncept in strukturo smernice za preskušanje. ICCVAM ⁽²⁾ in neodvisna mednarodna znanstvena strokovna skupina za ocenjevanje sta pregledala uporabnost in omejitve redne uporabe topičnih anestetikov, sistemskih analgetikov in humanih končnih točk med oceno varnosti draženja oči *in vivo* (12). V pregledu sta ugotovila, da bi se z uporabo topičnih anestetikov in sistemskih analgetikov lahko izognili večini bolečine in trpljenja ali vsej bolečini in trpljenju, ne da bi to vplivalo na rezultate poskusa, ter priporočila, da bi bilo treba te snovi vedno uporabljati. Pri tej preskusni metodi se upošteva ta pregled. Med preskušanjem akutnega draženja oči in jedkosti za oči *in vivo* bi bilo treba redno uporabljati topične anestetike, sistemske analgetike in humane končne točke. Izjeme glede njihove uporabe bi bilo treba utemeljiti. Z izboljšanimi, opisanimi v tej metodi, se bosta v večini primerov preskušanja, pri katerih je še vedno potrebno *in vivo* preskušanje varnosti za oči, bolečina in trpljenje živali znatno zmanjšala ali se bo bolečini in trpljenju živali mogoče izogniti.

Uravnoteženo vnaprejšnje lajšanje bolečin bi moralo vključevati (i) redno dajanje topičnih anestetikov (npr. proparokain ali tetrakain) in sistemskih analgetikov (npr. buprenorfin) pred preskušanjem, (ii) redni program dajanja sistemskih analgetikov po tretiranju (npr. buprenorfin in meloksikam), (iii) načrt opazovanja, spremljanja in evidentiranja živali za odkrivanje kliničnih znakov bolečine in/ali trpljenja ter (iv) načrt opazovanja, spremljanja in evidentiranja narave, resnosti in napredovanja poškodb oči. Nadaljnje podrobnosti so navedene v posodobljenih postopkih v nadaljevanju. Po dajanju preskusne kemikalije se ne smejo uporabiti nobeni dodatni topični anestetiki ali analgetiki, da ne bi prihajalo do motenja študije. Protivnetni analgetiki (npr. meloksikam) se ne smejo nanašati topično, sistemsko uporabljeni odmerki pa ne smejo vplivati na učinke na oči.

Opredelitve so navedene v dodatku k preskusni metodi.

⁽¹⁾ Uredba (ES) št. 1907/2006 Evropskega parlamenta in sveta z dne 18. decembra 2006 o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH) ter o ustanovitvi Evropske agencije za kemikalije in o spremembi Direktive 1999/45/ES ter o razveljavitvi Uredbe Sveta (EGS) št. 793/93 in Uredbe Komisije (ES) št. 1488/94 ter Direktive Sveta 76/769/EGS in direktiv Komisije 91/155/EGS, 93/67/EGS, 93/105/ES in 2000/21/ES. UL L 304, 22.11.2007, str. 1.

⁽²⁾ Medagencijski usklajevalni odbor ZDA za validacijo alternativnih metod.

ZAČETNI PREUDARKI

Za znanstveno zanesljivost in dobrobit živali je koristno, da se preskusi *in vivo* začnejo izvajati šele, ko se z analizo, ki temelji na zanesljivosti dokazov, ocenijo vsi razpoložljivi podatki, ki se nanašajo na potencial kemikalije za draženje oči/jedkost za oči. V take podatke so vključeni dokazi iz obstoječih študij na ljudeh in/ali laboratorijskih živalih, dokazi o draženju oči/jedkosti za oči ene ali več strukturno sorodnih snovi ali mešanic takih snovi, podatki, ki kažejo visoko kislost ali alkalnost kemikalije (4) (5), ter rezultati iz potrjenih in sprejetih preskusov jedkosti za kožo in jedkosti za oči/draženje oči *in vitro* ali *ex vivo* (6) (13) (14) (15) (16) (17). Študije se lahko izvedejo pred analizo, ki temelji na zanesljivosti dokazov, ali kot posledica take analize.

S tako analizo se lahko pri nekaterih kemikalijah nakaže potreba po *in vivo* študijah potenciala kemikalije za jedkost za oči/draženje oči. V vseh takih primerih je treba pred proučitvijo uporabe očesne študije *in vivo* po možnosti najprej izvesti študijo *in vitro* in/ali *in vivo* učinkov jedkosti za kožo, ki jih ima kemikalija, ter jih oceniti v skladu s strategijo zaporednega preskušanja s preskusno metodo B.4 (7) ali celovito strategijo preskušanja, opisano v smernicah agencije ECHA (21).

Strategija zaporednega preskušanja, v katero so vključeni potrjeni preskusi *in vitro* ali *ex vivo* jedkosti za oči/draženja oči, je k tej preskusni metodi vključena kot dodatek, za namen uredbe REACH pa v smernice agencije ECHA (21). Priporočljivo je, da se ta strategija preskušanja upošteva pred izvedbo preskusa *in vivo*. Za nove kemikalije je priporočljivo, da se znanstveno zanesljivi podatki o jedkosti/draženju kemikalije pridobijo s postopnim načinom preskušanja. Za obstoječe kemikalije, za katere ni na voljo dovolj podatkov o jedkosti za kožo in oči/draženju kože in oči, se lahko s to strategijo zapolnijo vrzeli v podatkih. Uporabo drugačne strategije ali postopka preskušanja ali odločitev o tem, da se ne bo uporabil postopen način preskušanja, je treba utemeljiti.

NAČELO PRESKUSA IN VIVO

Po predhodnem tretiranju s sistemskimi analgetiki in nanosu ustreznih topičnih anestetikov se kemikalija, ki jo je treba preskusiti, v enkratnem odmerku nanese na eno oko poskusne živali; netretirano oko se uporablja za kontrolo. Stopnja dražilnosti/jedkosti za oči se oceni s seštevanjem lezij na očesni veznici, roženici in šarenici, v točno določenih intervalih. Drugi učinki na oko in škodljivi sistemski učinki se prav tako opišejo, da se vsi učinki celovito ocenijo. Študija mora trajati dovolj dolgo, da se oceni popravljivost ali nepopravljivost učinkov.

Živali, ki kažejo znake hudega trpljenja in/ali bolečine v kateri koli fazi poskusa ali imajo lezije, skladne s humanimi končnimi točkami, opisanimi v tej preskusni metodi (glej odstavek 26), je treba humano usmrtiti in kemikalijo skladno s tem oceniti. Merila za sprejem odločitve o humani usmrtitvi umirajočih in hudo trpečih živali so navedena v dokumentu s smernicami OECD (8).

PRIPRAVA ZA PRESKUS IN VIVO

Izbira vrst

Kunec beličnik je najbolj zaželena laboratorijska žival in uporabljajo se zdrave mlade odrasle živali. Uporabo drugih sevov ali vrst je treba obrazložiti.

Priprava živali

Obe očesi vsake poskusne živali, začasno izbrane za poskus, je treba pregledati v 24 urah pred začetkom poskusa. Živali, pri katerih so vidni draženje oči, očesne napake ali že prej nastala poškodba roženice, se ne smejo uporabiti.

Pogoji nastanitve in hranjenja

Živali morajo biti nastanjene posamično. Temperatura v prostoru s poskusnimi živalmi mora biti za kunce 20 °C (\pm 3 °C). Čeprav mora biti relativna vlažnost vsaj 30-odstotna in po možnosti ne sme presegati 70 %, razen med čiščenjem prostora, si je treba prizadevati za 50–60-odstotno vlažnost. Osvetlitev mora biti umetna, pri čemer je zaporedje 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Izogibati se je treba preveč intenzivni svetlobi. Za hranjenje se lahko uporabijo običajne predpisane laboratorijske vrste hrane z neomejeno količino pitne vode.

PRESKUSNI POSTOPEK

Uporaba topičnih anestetikov in sistemskih analgetikov

V postopkih ocene varnosti za oči so priporočljivi naslednji postopki, da se bolečini in trpljenju izogne ali se ju zmanjša. Nadomestijo jih lahko alternativni postopki, ki so bili določeni kot dobra ali boljša možnost za izogibanje bolečini in trpljenju ali njuno lajšanje.

- Šestdeset minut pred nanašanjem preskusne kemikalije se podkožno vbrizga buprenorfin v odmerku 0,01 mg/kg, da se zagotovi terapevtska raven sistemske analgezije. Za buprenorfin in druge podobne opioidne analgetike, ki se dajejo sistemsko, ni znano ali pričakovano, da bi spremenili odzive oči (12).
- Pet minut pred nanašanjem preskusne kemikalije se v vsako oko kane po ena ali dve kapljici topičnega očesnega anestetika (npr. 0,5-odstotni proparakain hidroklorid ali 0,5-odstotni tetrakain hidroklorid). Da ne bi prihajalo do morebitnega motenja študije, se priporoča topični anestetik, ki ne vsebuje konzervansov. Oko vsake živali, ki ni bilo tretirano s preskusno kemikalijo, pač pa s topičnimi anestetiki, se uporablja za kontrolo. Če se pričakuje, da bo preskusna kemikalija povzročila precejšnje bolečine in trpljenje, poskus praviloma ne sme potekati *in vivo*. Vendar je treba v primeru dvoma ali, kadar je preskušanje potrebno, razmisliti o dodatnih odmerkih topičnega anestetika v 5-minutnih časovnih presledkih pred nanašanjem preskusne kemikalije. Uporabniki se morajo zavedati, da bi lahko večkratna uporaba topičnega anestetika nekoliko povečala resnost učinkov in/ali podaljšala čas, ki je potreben, da lezije, ki so jih povzročile kemikalije, izginejo.
- Osem ur po nanosu preskusne kemikalije, se podkožno vbrizgata buprenorfin v odmerku 0,01 mg/kg in meloksikam v odmerku 0,5 mg/kg, da se ohranja stalna terapevtska raven sistemske analgezije. Čeprav ni podatkov, da bi imel meloksikam pri podkožnem vbrizganju enkrat na dan protivnetni učinek na oko, se ga ne sme dati prej kot vsaj 8 ur po nanosu preskusne kemikalije, da bi se izognili vsem morebitnim motnjam pri študiji (12).
- Po prvih 8 urah po nanosu preskusne kemikalije je treba vsakih 12 ur podkožno vbrizgati buprenorfin v odmerku 0,01 mg/kg, skupaj s podkožnim vbrizganjem meloksikama v odmerku 0,5 mg/kg vsakih 24 ur, dokler očesne lezije ne izginejo ter niso več prisotni nobeni klinični znaki bolečine in trpljenja. Da bi zmanjšali pogostost dajanja analgetikov, se lahko razmisli o pripravkih analgetikov s podaljšanim sproščanjem.
- Če vnaprejšnja analgezija in topična anestezija ne zadostujeta, je treba takoj po nanosu preskusne kemikalije dati „odrešilni“ odmerek analgetika. Če žival med študijo kaže znake bolečine in trpljenja, se „odrešilni“ odmerek buprenorfina v višini 0,03 mg/kg podkožno vbrizga takoj in nato ponovno na vsakih 8 ur, če je to potrebno, namesto podkožnega vbrizganja v odmerku 0,01 mg/kg vsakih 12 ur. Meloksikam v odmerku 0,5 mg/kg se podkožno vbrizga vsakih 24 ur, skupaj z „odrešilnim“ odmerkom buprenorfina, vendar ne prej kot vsaj 8 ur po nanosu preskusne kemikalije.

Nanašanje preskusne kemikalije

Preskusno kemikalijo je treba dati v mešiček veznice enega očesa vsake živali, potem ko se spodnja veka nežno potegne stran od zrkla. Veka se nato nežno drži skupaj približno eno sekundo, da se prepreči izguba materiala. Drugo oko, ki ni tretirano, se uporablja za kontrolo.

Izpiranje

Oči poskusnih živali se ne smejo umivati najmanj 24 ur po vkapanju preskusne kemikalije, z izjemo trdnih snovi (glej odstavek 18) in v primeru takojšnjih jedkih ali dražilnih učinkov. Po 24 urah se lahko oko izpere, če je to ustrezno.

Uporaba satelitske skupine živali za raziskovanje vpliva izpiranja ni priporočena, razen če je znanstveno upravičena. Če je satelitska skupina potrebna, je treba uporabiti dva kunca. Pogoje izpiranja je treba skrbno dokumentirati, npr. čas izpiranja, sestava in temperatura raztopine za izpiranje, trajanje, volumen in hitrost nanašanja.

Velikost odmerka

(1) Preskušanje tekočih snovi

Za preskušanje tekočih snovi se uporablja odmerek v višini 0,1 ml. Razpršila se ne smejo uporabljati za vkapanje kemikalije neposredno v oko. Tekoče razpršilo je treba iztisniti in zbrati v posodo pred vkapanjem odmerka v višini 0,1 ml v oko.

(2) Preskušanje trdnih snovi

Pri preskušanju trdnih snovi, kašnatih zmesi in zdrobljenih kemikalij, mora imeti uporabljena količina volumen 0,1 ml ali težo, ki ne presega 100 mg. Preskusno kemikalijo je treba zdrobiti v fin prah. Volumen trdnega materiala je treba izmeriti po rahlem zgoščevanju, npr. z rahlim potrkavanjem na merilno posodo. Če fiziološki mehanizmi trdne preskusne kemikalije niso odstranili iz očesa poskusne živali na prvi časovni točki opazovanja 1 uro po nanosu, se lahko oko izplakne s fiziološko raztopino ali destilirano vodo.

(3) Preskušanje razpršil

Priporočeno je, da se vsa utekočinjena razpršila in razpršila pod pritiskom zberejo v posodo pred vkapanjem v oko. Izjema so kemikalije v posodah za razpršila pod pritiskom, ki jih ni mogoče zbrati zaradi izhlapevanja. V takih primerih je treba držati oko odprto in preskusno kemikalijo nanesti v oko z enostavnim vbrizgom, ki traja približno eno sekundo, z razdalje 10 cm neposredno pred ocesom. Ta razdalja se lahko spreminja glede na pritisk razpršila in njegovo vsebino. Paziti je treba, da se oko ne poškoduje zaradi pritiska razpršila. V ustreznih primerih bo morda treba oceniti potencial za nastanek „mehanske“ poškodbe očesa zaradi moči razpršila.

Oceno odmerka iz razpršila je mogoče dobiti z naslednjim poskusom: kemikalija se razprši na tehtalni papir skozi odprtino velikosti kunčjega očesa, ki je nameščena neposredno pred papir. Povečanje teže papirja se uporabi za določitev približne količine, razpršene v oko. Za hlapne kemikalije je odmerek mogoče oceniti s tehtanjem v zbirni posodi pred odstranitvijo preskusne kemikalije ali po njej.

Začetni preskus (*in vivo* preskus draženja oči/jedkosti za oči z uporabo ene živali)

Zelo priporočljivo je, da se poskus *in vivo* izvede najprej na eni živali (glej dodatek k tej preskusni metodi: Strategija zaporednega preskušanja draženja oči in jedkosti za oči). Na podlagi opazovanj je mogoče določiti resnost in popravljivost učinkov pred izvedbo potrditvenega poskusa na drugi živali.

Če rezultati tega poskusa pokažejo, da je kemikalija z uporabo opisanega postopka jedka ali zelo dražilna za oko, se nadaljnji poskusi o dražilnosti za oko ne izvedejo.

Potrditveni preskus (*in vivo* preskus draženja oči z dodatnimi živalmi)

Če se jedek ali zelo dražilen učinek ne opazi v začetnem poskusu, je treba dražilni ali negativni odziv potrditi z uporabo do dveh dodatnih živali. Če se pri začetnem poskusu opazi dražilni učinek, je priporočljivo, da se potrditveni poskus izvede zaporedoma – najprej na eni in šele nato na drugi živali, namesto da se dve dodatni živali izpostavita hkrati. Če se pri drugi živali pojavijo jedki ali zelo dražilni učinki, se poskus ne nadaljuje. Če rezultati pri drugi živali zadostujejo, da se določi razvrstitev glede na nevarnosti, se ne sme izvesti noben poskus več.

Obdobje opazovanja

Obdobje opazovanja mora biti dovolj dolgo, da se lahko v celoti ovrednoti obseg in popravljivost opaženih učinkov. Preskus je treba zaključiti, kadar koli žival pokaže znake hude bolečine ali trpljenja (8). Za določitev popravljivosti učinkov je običajno treba živali opazovati 21 dni po nanašanju preskusne kemikalije. Če se popravljivost opazi pred 21. dnem, je treba poskus takrat zaključiti.

Klinična opazovanja in uvrstitev očesnih reakcij v stopnje

Podrobno je treba oceniti, ali so eno uro po nanosu preskusne kemikalije na očeh prisotne ali odsotne očesne lezije, tako ocenjevanje pa je treba nato ponoviti vsaj enkrat dnevno. Živali je treba prve 3 dni ocenjevati večkrat na dan zaradi pravočasnega sprejetja odločitve o zaključku preskusa. Poskusne živali je treba v celotnem trajanju študije vsaj dvakrat dnevno – ali po potrebi pogosteje – redno ocenjevati, da se odkrijejo klinični znaki bolečine in/ali trpljenja (npr. ponavljajoče se praskanje ali drgnjenje očesa, čezmerno mežikanje, čezmerno solzenje) (9) (10) (11), pri čemer mora med opazovanji preteči vsaj 6 ur. To je potrebno, (i) da se ustrezno oceni, ali živali kažejo znake bolečine in trpljenja, da se sprejmejo informirane odločitve o potrebi po povečanju odmerka analgetikov, ter (ii) da se oceni, ali živali kažejo znake določenih humanih končnih točk, da se sprejmejo informirane odločitve o tem, ali jih je ustrezno humano evtanazirati, in da se zagotovi pravočasno sprejetje takih odločitev. Redno je treba uporabljati obarvanost s fluoresceinom in biomikroskop, kadar je to ustrezno (npr. pri ocenjevanju globine poškodbe v primeru ulceracije roženice), kot pripomoček pri odkrivanju in merjenju očesne poškodbe ter pri oceni, ali so bila izpolnjena določena merila za humano evtanazijo. Za referenčne namene in za trajno evidenco obsega očesnih poškodb se lahko zbirajo digitalne fotografije opaženih lezij. Testiranja na živalih se lahko izvajajo le toliko časa, kolikor je potrebno za pridobitev dokončnih informacij. Živali, ki kažejo hudo bolečino ali trpljenje, je treba nemudoma humano usmrtiti, kemikalijo pa oceniti skladno s tem.

Humano je treba usmrtiti živali z naslednjimi očesnimi lezijami, nastalimi po vkapanju kemikalije (za opis stopenj lezije glej preglednico 1): perforacija roženice ali značilna ulceracija roženice vključno s stafilomom, kri v sprednjem delu očesa, stopnja 4 motnjave roženice, odsotnost svetlobnega refleksa (odziv šarenice stopnje 2), ki traja 72 ur, ulceracija veznične vrečke, nekroza veznične membrane ali žmurke ali odstopanje. Te lezije so namreč na splošno nepopravljive. Poleg tega se priporoča, da se naslednje očesne lezije uporabijo kot humane končne točke za zaključek študij pred koncem načrtovanega 21-dnevnega obdobja opazovanja. Šteje se, da take lezije napovedujejo resne poškodbe, ki jih povzroči draženje ali jedkost, in poškodbe, za katere se pričakuje, da do konca 21-dnevnega obdobja opazovanja ne bodo popolnoma popravljive: velika globina poškodbe (npr. ulceracija roženice, ki se širi prek zgornjih plasti strome), uničenje limbusa > 50 % (kar je razvidno iz bledice veznega tkiva) in resna okužba očesa (gnojni izcedek). Ali kombinacija: vaskularizacije površine roženice (npr. panus), površine obarvanosti s fluoresceinom, ki se na podlagi dnevne ocene sčasoma ne zmanjšuje, in/ali odsotnosti reepitelizacije 5 dni po nanosu preskusne kemikalije se prav tako lahko štejejo kot morebitno uporabna merila, ki vplivajo na klinično odločitev o prezgodnjem zaključku študije. Vendar pa take ugotovitve posamično ne zadostujejo za utemeljitev predčasnega zaključka študije. Ko se ugotovijo resni učinki na oči, se je treba z lečečim veterinarjem ali veterinarjem, usposobljenim za laboratorijske živali, ali osebjem, usposobljenim za odkrivanje kliničnih lezij, posvetovati za klinični pregled, da se oceni, ali bi bilo treba zaradi kombinacije teh učinkov študijo predčasno zaključiti. Pridobiti je treba stopnje očesne reakcije (veznice, roženice in šarenice) ter jih zabeležiti po 1 uri, 24, 48 in 72 urah po nanosu preskusne kemikalije (preglednica 1). Živali, pri katerih se očesne lezije ne pojavijo, se ne smejo usmrtiti prej kot 3 dni po vkapanju. Živali z zmernimi očesnimi lezijami je treba opazovati, dokler lezije ne izginejo ali 21 dni, tj. do takrat, ko se raziskava zaključi. Izvesti in zabeležiti je treba opazovanja vsaj po 1 uri, 24 urah, 48 urah, 72 urah, 7 dneh, 14 dneh in 21 dneh, da se ugotovi status lezij in njihova popravljivost oziroma nepopravljivost. Opazovanja morajo biti po potrebi pogostejša, da se ugotovi, ali je treba poskusno žival iz humanih razlogov evtanazirati ali izključiti iz študije zaradi negativnih rezultatov.

Stopnje očesne reakcije (preglednica 1) je treba zabeležiti pri vsakem pregledu. Poročati je treba tudi o vseh drugih očesnih lezijah (npr. panus, obarvanost, spremembe v sprednjem delu očesa) ali škodljivih sistemskih učinkih.

Za lažji pregled reakcij se lahko uporablja binokularna lupa, ročni oftalmoskop, biomikroskop ali drug ustrezen pripomoček. Potem ko se po 24 urah zabeležijo rezultati opazovanja, se lahko oči nadalje pregledajo s fluoresceinom.

Določanje stopnje očesnih odzivov je neizogibno subjektivno. Da bi izboljšali usklajenost pri določanju stopnje očesnega odziva in pomagali preskuševalnim laboratorijem ter vsem sodelujočim pri oblikovanju in razlagi rezultatov opazovanja, mora biti osebje, ki izvaja ta opazovanja, ustrezno usposobljeno za uporabo sistema določanja stopnje.

PODATKI IN POROČANJE

Vrednotenje rezultatov

Rezultate draženja oči je treba oceniti v povezavi z vrsto in resnostjo lezij ter njihovo popravljivostjo oziroma nepopravljivostjo. Posamezni rezultati ne pomenijo absolutnega standarda za dražilne lastnosti kemikalije, ker se ocenjujejo tudi drugi učinki preskusne kemikalije. Namesto tega je treba posamezne rezultate obravnavati kot referenčne vrednosti, ki so pomembni le, če so potrjeni s popolnim opisom in vrednotenjem vseh opažanj.

Poročilo o preskusu

V poročilo o preskusu se vključijo naslednji podatki:

Utemeljitev preskusa in vivo: analiza, ki temelji na zanesljivosti dokazov, že obstoječih podatkov, vključno z rezultati strategije zaporednega preskušanja:

- opis pomembnih podatkov, ki so na voljo pred preskušanjem;
- podatki, pridobljeni na posamezni stopnji preskušanja;
- opis izvedenih preskusov *in vitro*, vključno s podrobnimi podatki o postopkih, in rezultatih, pridobljenih s preskusnimi/referenčnimi kemikalijami;
- opis izvedene študije *in vivo* o draženju kože/jedkosti za kožo, vključno s pridobljenimi rezultati;
- analiza, ki temelji na zanesljivosti dokazov, za izvedbo študije *in vivo*.

Preskusna kemikalija:

- identifikacijski podatki (npr. kemijsko ime in številka CAS, če je na voljo, čistost, znane nečistote, izvor, številka serije);
- fizikalno stanje in fizikalno-kemijske lastnosti (npr. vrednost pH, hlapnost, topnost, stabilnost, reakcija z vodo);
- v primeru zmesi je treba navesti sestavine, vključno z identifikacijskimi podatki o sestavnih snoveh (npr. kemijska imena in številke CAS, če so na voljo), ter njihove koncentracije;
- uporabljeni odmerki.

Vehikel:

- identifikacija, koncentracija (kjer je ustrezno), uporabljeni volumen;
- utemeljitev izbire vehikla.

Preskusne živali:

- uporabljena vrsta/sev, obrazložitev za uporabo živali, če to ni kunec beličnik;
- starost vsake živali ob začetku študije;
- število živali po spolu v preskusni in kontrolni skupini (če je potrebno);
- teža posamezne živali ob začetku in zaključku poskusa;
- izvor, nastanitveni pogoji, vrsta hrane itd.

Anestetiki in analgetiki:

- odmerki in čas dajanja v primeru dajanja topičnih anestetikov in sistemskih analgetikov;
- če se uporabi lokalni anestetik, njegova identifikacija, čistost, vrsta in morebitni medsebojni vpliv s preskusno kemikalijo.

Rezultati:

- opis metode, uporabljene za merjenje dražilnosti na vsaki časovni točki opazovanja (npr. ročni oftalmoskop, biomikroskop, fluorescein);
- preglednica s podatki o dražilnem/jedkem odzivu za vsako žival na vsaki časovni točki opazovanja do odstranitve vsake živali iz poskusa;
- opis stopnje in narave opaženega draženja ali jedkosti;
- opis drugih morebitnih opaženih lezij v očesu (npr. vaskularizacije, nastanek panusov, zlepkov, madežev);
- opis neočesnih lokalnih in sistemskih škodljivih učinkov, zabeleženje kliničnih znakov bolečine in trpljenja, digitalne fotografije in morebitne histopatološke ugotovitve.

Razprava o rezultatih**Razlaga rezultatov**

Sklepanje o veljavnosti rezultatov študij draženja oči na laboratorijskih živalih za ljudi je veljavno le v omejeni meri. V mnogih primerih je kunec beličnik bolj občutljiv na snovi, ki dražijo oči ali so jedke za oči, kot ljudje.

Pri razlagi podatkov je treba paziti, da se izključi draženje, ki je posledica sekundarne infekcije.

VIRI

- (1) Barratt, M. D. idr. (1995), The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard, ECVAM Workshop Report 8, ATLA 23, str. 410–429.
- (2) de Silva, O. idr. (1997), Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies, Food Chem. Toxicol 35, str. 159–164.
- (3) Worth, A. P. in Fentem, J. H. (1999), A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, str. 161–177.
- (4) Young, J. R. idr. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals, Toxicol. In Vitro, 2, str. 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, str. 227–231.
- (6) Fentem, J. H. idr. (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, str. 483–524.
- (7) Poglavje B.4 te priloge: *Akutna toksičnost: dermalna dražilnost/jedkost*.
- (8) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 19. (<http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).
- (9) Wright, E. M., Marcella, K. L. in Woodson, J. F. (1985), Animal pain: evaluation and control, Lab Animal, maj/junij, str. 20–36.
- (10) National Research Council (NRC) (2008), Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.
- (11) National Research Council (NRC) (2009), Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, Washington, DC: 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, NIH Publication No. 10-7514, Research Triangle Park, NC, ZDA: National Institute of Environmental Health Sciences.
- <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/OcuAnest-TMER.htm>.
- (13) Poglavje B.40 te priloge: *Jedkost za kožo in vitro: preskus transkutane električne upornosti (TER)*.
- (14) Poglavje B.40bis te priloge: *Jedkost za kožo in vitro: preskus z modelom človeške kože*.
- (15) OECD (2006), preskus št. 435: *In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, oddelek 4, OECD Pariz.
- (16) Poglavje B.47 te priloge: *Preskusna metoda za določanje motnjave in prepustnosti roženice goveda za opredelitev i) kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči, in ii) kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči*.
- (17) Poglavje B.48 te priloge: *Preskusna metoda na izoliranih očeh piščancev za opredelitev i) kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči, in ii) kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči*.
- (18) U.S. EPA (2003), Label Review Manual: 3. izdaja, EPA737-B-96-001, Washington, DC: ZDA, Environmental Protection Agency.
- (19) ZN (2011). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in usklajevanje kemikalij (GHS). Četrta revidirana izdaja, New York in Ženeva: Publikacije Združenih narodov.
- (20) ES (2008), Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006. Uradni list Evropske unije L 353, str. 1–1355.
- (21) Smernice agencije ECHA za zahteve po informacijah in oceno kemijske varnosti, poglavje R.7a: Posebne smernice o končnih točkah:
- http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf.

Preglednica 1

Razvrščanje očesnih lezij v stopnje

Roženica	Razred
Motnjava: stopnja gostote (odčitati jo je treba na najgostejšem predelu) (*)	
Ni ulceracije ali motnjave	0
Posamična ali razpršena območja motnjave (ne le rahlo manjši normalni lesk), podrobnosti šarenice jasno vidne	1
Lahko razločljivo prosojno območje; podrobnosti šarenice rahlo zabrisane	2
Biserovinasta površina; podrobnosti šarenice niso vidne; velikost zenice se komaj razloči	3

Roženica	Razred
Motna roženica; šarenica se prek motnjave ne razloči	4
Najvišji možni razred: 4	
Šarenica	
Normalna	0
Izrazito poglobljene gube, kongestija, zatekanje, zmerna hiperemija okoli roženice; ali injekcija; šarenica se odziva na svetlobo (počasen odziv je pozitiven)	1
Krvavenje, hudo uničenje ali ni odziva na svetlobo	2
Najvišji možni razred: 2	
Veznica	
Rdečina (se nanaša na palpebralno in bulbarno veznico; razen roženice in šarenice)	
Normalna	0
Nekatere krvne žilice nedvomno hiperemične (injicirane)	1
Razpršeno, škrlatno obarvanje; posameznih žilic ni mogoče zlahka razločiti	2
Razširjeno temno rdeče obarvanje	3
Najvišji možni razred: 3	
Hemoza	
Otekanje (nanaša se na veke in/ali žmurke)	
Normalna	0
Kakšno koli otekanje nad normalnim	1
Očitna oteklina z delnim vihanjem vek navzven	2
Oteklina, pri kateri so veke zaprte do približno polovice	3
Oteklina, pri kateri so veke več kot pol zaprte	4
Najvišji možni razred: 4	

(*) Zabeležiti je treba predel motnjave roženice.

Dodatek

OPREDELITVE POJMOV

Kisla/alkalna rezerva: Za kisle pripravke je to količina natrijevega hidroksida (v g) na 100 g pripravka, ki je potrebna za proizvodnjo določene vrednosti pH. Za alkalne pripravke je to količina natrijevega hidroksida (v g), ki je enakovredna količini žveplove kisline v g na 100 g pripravka, potrebna za proizvodnjo določene vrednosti pH (Young idr. 1988).

Kemikalija: snov ali zmes.

Nedražilne snovi: snovi, ki niso razvrščene v kategorije I, II ali III po EPA, kategorije 1, 2, 2A ali 2B po GHS ali kategoriji 1 ali 2 po EU dražilnih snovi za oči (17) (18) (19).

Jedka snov za oči: (a) kemikalija, ki povzroča nepopravljivo poškodbo očesnega tkiva; (b) kemikalije, ki so razvrščene v kategorijo 1 po GHS, kategorijo I po EPA ali kategorijo 1 po EU dražilnih snovi za oči (17) (18) (19).

Dražilna snov za oči: (a) kemikalija, ki povzroči popravljivo poškodbo očesa; (b) kemikalije, ki so razvrščene v kategoriji II ali III po EPA, kategorije 2, 2A ali 2B po GHS ali kategorijo 2 po EU dražilnih snovi za oči (17) (18) (19).

Zelo dražilna snov za oči: (a) kemikalija, ki povzroči poškodbo tkiva, ki po 21 dneh po nanosu ne izgine ali resno fizično poslabša vid; (b) kemikalije, ki so razvrščene v kategorijo 1 po GHS, kategorijo I po EPA ali kategorijo 1 po EU dražilnih snovi za oči (17) (18) (19).

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

Stopenjski pristop: stopenjsko preskušanje, pri katerem se v posebnem vrstnem redu pregledajo vsi obstoječi podatki o preskusni kemikaliji, pri čemer se na vsaki stopnji uporabi postopek, ki temelji na zanesljivosti dokazov, da se določi, ali je pred nadaljevanjem na naslednji stopnji na voljo dovolj podatkov za odločitev o razvrstitvi kemikalije glede na nevarnost, ki jo povzroča. Če se za preskusno kemikalijo na podlagi razpoložljivih podatkov lahko določi potencial za draženje, dodatno preskušanje ni potrebno. Če preskusni kemikaliji na podlagi razpoložljivih podatkov ni mogoče določiti potenciala za draženje, se izvede postopno zaporedno testiranje na živalih, dokler kemikalije ni mogoče jasno razvrstiti.

Zanesljivost dokazov (proces): prednosti in slabosti zbirke podatkov se uporabijo kot podlaga za sprejetje sklepa, ki iz posameznih podatkov morda ni razviden.

DODATEK K PRESKUSNI METODI B.5 ⁽¹⁾

ZAPOREDNO TESTIRANJE DRAŽENJA OČI IN JEDKOSTI ZA OČI

Splošni preudarki

Za znanstveno zanesljivost in dobrobit živali se je treba izogniti nepotrebni uporabi živali in zmanjšati število poskusov, ki bi najverjetneje povzročili resne odzive pri živalih. Vse informacije o kemikalijah, ki se nanašajo na njihovo morebitno dražilnost/jedkost za oči, je treba oceniti pred odločitvijo o preskušanju *in vivo*. Morda že obstaja dovolj dokazov za razvrstitev preskusne kemikalije glede na njen potencial jedkosti za oči ali draženja oči, ne da bi bilo treba izvesti poskuse na laboratorijskih živalih. Analiza, ki temelji na zanesljivosti dokazov, in zaporedno testiranje bosta zato zmanjšala potrebo po preskušanju *in vivo*, zlasti če bi kemikalija verjetno povzročila resne reakcije.

Priporočljivo je, da se z analizo, ki temelji na zanesljivosti dokazov, ocenijo obstoječe informacije v zvezi s tem, ali kemikalija draži oči in je jedka za oči, ter za odločitev, ali je treba poleg študij *in vivo* na očeh izvesti dodatne študije, ki bi pomagale opredeliti takšen potencial. Kadar so potrebne nadaljnje študije, je priporočljiva uporaba zaporednega preskušanja, da se pridobijo ustrezni eksperimentalni podatki. Pri snoveh, ki nimajo zgodovine preskušanja, je treba za pridobitev podatkov, potrebnih za oceno njihovega potenciala jedkosti za oči/draženja oči, uporabiti strategijo zaporednega preskušanja. Prvotna strategija preskušanja, opisana v tem dodatku, je bila razvita na delavnici OECD (1). Kasneje je bila potrjena in razširjena v Usklajen celostni sistem razvrstitve kemijskih snovi glede na nevarnosti za zdravje ljudi in vplive na okolje, kot sta ga novembra 1998 na 28. skupnem zasedanju potrdila Odbor za kemikalije in Delovna skupine za kemikalije (2) ter kot ga je leta 2011 posodobila skupina strokovnjakov OECD.

Čeprav to testiranje ni sestavni del preskusne metode B.5, predstavlja priporočeni pristop za določitev lastnosti, ki se nanašajo na draženje oči/jedkost za oči. Ta pristop je hkrati dobra praksa in etično merilo uspešnosti za preskušanje draženja oči/jedkosti za oči *in vivo*. Preskusna metoda vsebuje smernice za izvajanje preskusa *in vivo* in povzema dejavnike, ki jih je treba obravnavati pred začetkom takega preskusa. Z zaporednim testiranjem se zagotavlja, da se s pristopom, ki temelji na zanesljivosti dokazov, ocenijo obstoječi podatki o lastnostih kemikalij, ki dražijo oči/so jedke za oči, in da se s stopenjskim pristopom pridobijo ustrezni podatki o kemikalijah, za katere so potrebne dodatne študije ali študije niso bile izvedene. V testiranje je najprej vključena izvedba potrjenih in sprejetih preskusov *in vitro* ali *ex vivo*, nato pa študije v okviru preskusne metode B.4 v posebnih okoliščinah (3) (4).

Opis postopnega preskušanja

Preden se začnejo izvajati preskusi kot deli zaporednega testiranja (diagram), je treba oceniti vse razpoložljive podatke, da se določi potreba po preskušanju *in vivo* na očeh. Čeprav se pomembne informacije lahko pridobijo iz ocene posameznih parametrov (npr. najvišje vrednosti pH), je treba oceniti vse obstoječe podatke. Pri sprejemanju odločitve, ki temelji na zanesljivosti dokazov, je treba oceniti vse ustrezne podatke o učinkih zadevne kemikalije ali strukturno podobnih kemikalij in navesti obrazložitev za tako odločitev. Glavni poudarek mora biti namenjen obstoječim podatkom o vplivu kemikalije na ljudi in živali, čemur sledijo rezultati preskušanja *in vitro* ali *ex vivo*. Študijam *in vivo* jedkih kemikalij je treba izogibati, kadar koli je to mogoče. Dejavniki, ki se upoštevajo v strategiji preskušanja, so med drugim:

Ocena obstoječih podatkov, ki se nanašajo na ljudi in/ali živali, in/ali podatkov *in vitro* iz potrjenih in mednarodno sprejetih metod (prvi korak).

⁽¹⁾ Za uporabo celostne strategije preskušanja draženja oči v skladu z uredbo REACH glej tudi Smernice agencije ECHA za zahteve po informacijah in oceno kemijske varnosti, Poglavlje R.7a: Posebne smernice o končnih točkah: http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf.

Najprej je treba proučiti obstoječe podatke, ki se nanašajo na ljudi, npr. klinične in poklicne študije ter poročila o posameznih primerih, in/ali podatke o testiranju na živalih iz študij na očeh in/ali podatke *in vitro* iz potrjenih in mednarodno sprejetih metod za draženje oči/jedkost za oči, saj zagotavljajo informacije, ki so neposredno povezane z učinki na oči. Nato je treba oceniti razpoložljive podatke iz študij na ljudeh in/ali živalih, s katerimi se proučuje jedkost za kožo/draženje kože, in/ali študij *in vitro* iz potrjenih in mednarodno sprejetih metod za jedkost za kožo. Kemikalije, za katere je znano, da so jedke ali zelo dražilne za oči, se ne smejo vkapati v oči živali, enako velja tudi za kemikalije, ki so jedke ali zelo dražilne za kožo; take kemikalije je treba prav tako obravnavati kot jedke in/ali dražilne za oči. Kemikalij, za katere je v predhodno opravljenih študijah na očeh dovolj dokazov, da niso jedke ali dražilne, prav tako ni treba preskusiti s študijami *in vivo* na očeh.

Analiza razmerja med strukturo in aktivnostjo (SAR) (drugi korak).

Treba je upoštevati rezultate preskušanj strukturno podobnih snovi, če so na voljo. Kadar so na voljo zadostni podatki, ki se nanašajo na ljudi in/ali živali, o strukturno podobnih snoveh ali mešanicah takih snovi in je iz njih razviden njihov potencial jedkosti za oči/draženja oči, se lahko domneva, da bo preskusna kemikalija povzročila enake odzive. V navedenih primerih kemikalije morda ni treba preskusiti. Negativni podatki iz študij o strukturno podobnih snoveh ali mešanicah takih snovi v skladu s strategijo zaporednega preskušanja niso zadosten dokaz o tem, da kemikalija ni jedka/dražilna. Treba je uporabiti potrjene in sprejete pristope SAR, da se opredeli potencial za jedkost in dražilne učinke na kožo in oči.

Fizikalno-kemijske lastnosti in kemijska reaktivnost (tretji korak).

Kemikalije, ki kažejo najskrajnejše vrednosti pH, kot na primer $\leq 2,0$ ali $\geq 11,5$, imajo lahko močne lokalne učinke. Če je najskrajnejša vrednost pH podlaga za opredeljevanje kemikalije kot jedke ali dražilne za oči, potem se lahko upošteva tudi njena kisl/alkalna rezerva (puferska kapaciteta) (5) (6) (7). Če puferska kapaciteta kaže na to, da kemikalija ne sme biti jedka za oči (npr. kemikalije z najvišjo vrednostjo pH in nizko kisl/alkalno rezervo), je treba to potrditi z izvedbo dodatnega preskušanja, po možnosti s potrjenim in sprejetim preskusom *in vitro* ali *ex vivo* (glej odstavek 10).

Upoštevanje drugih obstoječih informacij (četrti korak).

V tej fazi je treba oceniti vse razpoložljive informacije o sistemski toksičnosti po dermalni poti. Upoštevati je treba tudi akutno dermalno toksičnost preskusne kemikalije. Če se pokaže, da je preskusna kemikalija po dermalni poti zelo toksična, je ni treba preskusiti v očesu. Čeprav ni nujno, da so akutna dermalna toksičnost in draženje oči/jedkost za oči medsebojno povezani, se lahko domneva, da bo sredstvo, ki je zelo toksično po dermalni poti, pokazalo visoko stopnjo toksičnosti tudi po vkapanju v oko. Take podatke je treba proučiti tudi med drugim in tretjim korakom.

Ocena jedkosti kemikalije za kožo, če se zahteva tudi za regulativne namene (peti korak).

Potencial, da je kemikalija jedka za kožo in zelo draži kožo, je treba najprej oceniti v skladu s preskusno metodo B.4 (4) in spremnim dodatkom (8), vključno z uporabo potrjenih in mednarodno sprejetih preskusnih metod *in vitro* za jedkost za kožo (9) (10) (11). Če se izkaže, da je kemikalija jedka ali zelo dražilna za kožo, se lahko šteje tudi, da je jedka ali zelo dražilna za oko. Zato ni potrebno nobeno dodatno preskušanje. Če kemikalija ni jedka ali zelo dražilna za kožo, je treba izvesti preskus *in vitro* ali *ex vivo* na očeh.

Rezultati preskusov *in vitro* ali *ex vivo* (šesti korak).

Kemikalije, pri katerih so se pri preskusu *in vitro* ali *ex vivo* (12) (13), ki je bil potrjen in mednarodno sprejet posebej za ocenjevanje jedkosti za oči/draženja oči, pokazale jedke ali zelo dražilne lastnosti, ni treba testirati na živalih. Lahko se domneva, da bodo take snovi povzročile podobne resne učinke *in vivo*. Če potrjeni in sprejeti preskusi *in vitro/ex vivo* niso na voljo, se lahko šesti korak preskoči ter se izvede neposredno sedmi korak.

Preskus *in vivo* na kuncih (sedmi in osmi korak).

Pri preskušanju *in vivo* na očeh je treba najprej izvesti začetni preskus na eni živali. Če rezultati tega preskusa pokažejo, da je kemikalija zelo dražilna ali jedka za oči, nadaljnega preskušanja ni treba izvesti. Če se pri navedenem poskusu niso odkrili jedki ali zelo dražilni učinki, se izvede potrditveni poskus na dveh dodatnih živalih. Od rezultatov potrditvenega poskusa je odvisno, ali so potrebni dodatni poskusi [glej preskusno metodo B.5].

STRATEGIJA PRESKUŠANJA IN OCENJEVANJA DRAŽENJA OČI/JEDKOSTI ZA OČI

Dejavnost	Ugotovitev	Sklepne ugotovitve
<p>1. Obstoječi podatki, ki se nanašajo na ljudi in/ali živali, in/ali podatki <i>in vitro</i> iz potrjenih in mednarodno sprejetih metod, ki kažejo učinke na oči</p> <p>Obstoječi podatki, ki se nanašajo na ljudi in/ali živali, in/ali podatki <i>in vitro</i> iz potrjenih in mednarodno sprejetih metod, ki kažejo jedke učinke na kožo</p> <p>Obstoječi podatki, ki se nanašajo na ljudi in/ali živali, in/ali podatki <i>in vitro</i> iz potrjenih in mednarodno sprejetih metod, ki kažejo zelo dražilne učinke na kožo</p>	<p>Huda poškodba oči</p> <p>Dražilna snov za oči</p> <p>Ni jedko/ni dražilno za oči</p> <p>Jedka snov za kožo</p> <p>Zelo dražilna snov za kožo</p>	<p>Končna točka preskusa na višjem nivoju biološke organizacije; upoštevati, da je snov jedka za oči. Preskušanje ni potrebno.</p> <p>Končna točka preskusa na višjem nivoju biološke organizacije; upoštevati, da je snov dražilna za oči. Preskušanje ni potrebno.</p> <p>Končna točka preskusa na višjem nivoju biološke organizacije; upoštevati, da snov ni jedka in dražilna za oči. Preskušanje ni potrebno.</p> <p>Domnevati, da je snov jedka za oči. Preskušanje ni potrebno.</p> <p>Domnevati, da je snov dražilna za oči. Preskušanje ni potrebno.</p>
↓		
<p><i>Informacije niso na voljo, ali pa razpoložljive informacije niso dokončne</i></p>		
↓		
<p>2. Izvedba SAR za jedkost za oči/draženje oči</p> <p>Upoštevati SAR za jedkost za kožo</p>	<p>Predvideti hudo poškodbo oči</p> <p>Predvideti draženje oči</p> <p>Predvideti jedkost za kožo</p>	<p>Domnevati, da je snov jedka za oči. Preskušanje ni potrebno.</p> <p>Domnevati, da je snov dražilna za oči. Preskušanje ni potrebno.</p> <p>Domnevati, da je snov jedka za oči. Preskušanje ni potrebno.</p>
↓		
<p><i>Predvidevanja niso mogoča, ali pa niso dokončna ali negativna</i></p>		
↓		
<p>3. Izmeriti vrednost pH (pufrsko kapaciteto, če je ustrezno)</p>	<p>vrednost pH ≤ 2 ali $\geq 11,5$ (z visoko pufrsko kapaciteto, če je ustrezno)</p>	<p>Domnevati, da je snov jedka za oči. Preskušanje ni potrebno.</p>
↓		
<p><i>2 < vrednost pH < 11,5 ali vrednost pH $\leq 2,0$ ali $\geq 11,5$ z nizko pufrsko kapaciteto ali brez nje, če je to ustrezno</i></p>		
↓		

Dejavnost	Ugotovitev	Sklepne ugotovitve
<p>4. Upoštevati obstoječe podatke o sistemski toksičnosti po dermalni poti</p>	<p>Zelo toksično pri koncentracijah, ki bi se preskusile v očesu.</p>	<p>Kemikalija bi bila za preskušanje preveč toksična. Preskušanje ni potrebno.</p>
↓		
<p><i>Take informacije niso na voljo ali snov ni zelo toksična</i></p>		
↓		
<p>5. S preskusi oceniti potencial za draženje kože glede na strategijo preskušanja iz poglavja B.4 te priloge, če je to potrebno tudi za regulativne namene</p>	<p>Jedek ali zelo dražilen odziv</p>	<p>Domnevati, da je snov jedka za oči. Nadaljnje preskušanje ni potrebno.</p>
↓		
<p><i>Kemikalija ni jedka ali zelo dražilna za kožo</i></p>		
↓		
<p>6. Izvesti potrjene in sprejete preskuse <i>in vitro</i> ali <i>ex vivo</i> na očeh</p>	<p>Jedek ali zelo dražilen odziv</p>	<p>Domnevati, da je kemikalija jedka ali zelo dražilna za oči, če se lahko izvedeni preskusi uporabi za opredelitev jedkih/zelo dražilnih snovi in je kemikalija zajeta v področju uporabe preskusa. Nadaljnje preskušanje ni potrebno.</p>
	<p>Dražilen odziv</p>	<p>Domnevati, da je kemikalija dražilna za oči, če se lahko izvedeni preskusi uporabijo za pravilno opredelitev jedkih, zelo dražilnih in dražilnih snovi ter je kemikalija zajeta v področju uporabe preskusov. Nadaljnje preskušanje ni potrebno.</p>
	<p>Nedražilen odziv</p>	<p>Domnevati, da kemikalija ni dražilna za oči, če se lahko izvedeni preskusi uporabijo za pravilno opredelitev snovi, ki niso dražilne, za njihovo pravilno razlikovanje od kemikalij, ki so dražilne, zelo dražilne ali jedke za oči, ter je kemikalija zajeta v področju uporabe preskusa. Nadaljnje preskušanje ni potrebno.</p>
↓		
<p><i>Potrjeni in sprejeti preskusi <i>in vitro</i> ali <i>ex vivo</i> na očeh se ne morejo uporabiti za opredelitev</i></p>		
↓		
<p>7. Izvedba začetnega poskusa <i>in vivo</i> na očesu kunca z uporabo ene živali</p>	<p>Huda poškodba oči</p>	<p>Upoštevati, da je snov jedka za oči. Nadaljnje preskušanje ni potrebno.</p>
↓		
<p><i>Ni resne poškodbe ali ni odziva</i></p>		
↓		

	Dejavnost	Ugotovitev	Sklepne ugotovitve
8.	Izvesti potrditveni poskus na eni ali dveh dodatnih živalih.	Jedko ali dražilno	Upoštevati, da je snov jedka ali dražilna za oči. Nadaljnje preskušanje ni potrebno.
		Ni jedko ali dražilno	Upoštevati, da snov ni jedka ali dražilna za oči. Nadaljnje preskušanje ni potrebno.

VIRI

- (1) OECD (1996). program preskusnih smernic OECD: Končno poročilo z delavnice OECD z naslovom „Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods“. Organizirana je bila od 22. do 24. januarja 1996 v Solni na Švedskem (<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, kakor je bil potrjen na 28. skupnem zasedanju Odbora za kemikalije in Delovne skupine za kemikalije, november 1998 (<http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (3) Worth, A. P. in Fentem, J. H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, str. 161–177.
- (4) Poglavje B.4 te priloge: Akutna toksičnost: dermalna dražilnost/jedkost.
- (5) Young, J. R., How, M. J., Walker, A. P. in 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, str. 19–26.
- (6) Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Edsail, D. J., Holzhutter, H. G. in 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, str. 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, str. 227–231.
- (8) Dodatek k poglavju B.4 te priloge: Zaporedna strategija preskušanja za dermalno dražilnost in jedkost.
- (9) Poglavje B.40 te priloge: Jedkost za kožo *in vitro*: preskus transkutane električne upornosti (TER).
- (10) Poglavje B.40bis te priloge: Jedkost za kožo *in vitro*: preskus z modelom človeške kože.
- (11) OECD (2006). Preskus št. 435: *In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, oddelek 4, OECD Pariz.
- (12) Poglavje B.47 te priloge: Preskusna metoda za določanje motnjave in prepustnosti roženice goveda za opredelitev i) kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči, in ii) kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči.
- (13) Poglavje B.48 te priloge: Preskusna metoda na izoliranih očeh piščancev za opredelitev i) kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči, in ii) kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči.“

(3) Poglavlje B.10 dela B se nadomesti z naslednjim:

„B.10 *In vitro* preskus kromosomskih aberacij pri sesalcih

UVOD

Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD 473 (2016). Je del sklopa preskusnih metod o genetski toksikologiji. Pripravljen je dokument OECD, ki zagotavlja jedrnatne informacije o preskušanju v zvezi z genetsko toksikologijo in pregled nedavnih sprememb teh preskusnih smernic (1).

Namen *in vitro* preskusa kromosomskih aberacij je opredeliti kemikalije, ki povzročajo strukturne kromosomske aberacije v kultiviranih celicah sesalcev (2) (3) (4). Ločimo dva tipa strukturnih aberacij, in sicer: kromosomski in kromatidni tip. Pri preskusih *in vitro* bi se lahko pojavila poliploidija (vključno z endoreduplikacijo). Čeprav lahko aneugene snovi povzročijo poliploidijo, ta sama ne pomeni aneugenege potenciala in lahko samo nakazuje motnjo celičnega cikla ali citotoksičnost (5). Ta preskus ni zasnovan za merjenje aneuploidije. Za odkrivanje aneuploidije je priporočljiv preskus mikronukleusov *in vitro* (6).

Pri *in vitro* preskusu kromosomskih aberacij se lahko uporabijo kulture trajnih celičnih linij ali primarne celične kulture človeškega ali glodalskega izvora. Uporabljene celice je treba izbrati glede na zmožnost rasti v kulturi, stabilnost kariotipa (vključno s kromosomskim številom) in pogostnost spontanah kromosomskih aberacij (7). Na podlagi razpoložljivih podatkov za zdaj ni mogoče navesti trdnih priporočil, vendar je iz njih razvidno, da je treba pri ocenjevanju kemične nevarnosti upoštevati status beljakovine p53, gensko stabilnost (stabilnost kariotipa), sposobnost popraviljanja DNK in izvor (glodalski/človeški) celic, izbranih za preskušanje. Uporabnikom te preskusne metode se torej priporoča, naj upoštevajo vpliv te in drugih lastnosti celic na vpliv celične linije pri odkrivanju indukcije kromosomskih aberacij, saj se znanje na tem področju razvija.

Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

Pri preskusih, izvedenih *in vitro*, je običajno treba uporabiti zunanji vir presnovne aktivacije, razen če so celice v zvezi s preskusno kemikalijo sposobne presnavljanja. Zunanji sistem presnovne aktivacije ne posnema pogojev *in vivo* v celoti. Paziti je treba, da se izogibamo pogojem, ki bi lahko vodili do lažno pozitivnih rezultatov, tj. kromosomskih poškodb, ki jih ne bi povzročilo neposredno medsebojno delovanje preskusnih kemikalij in kromosomov; med take pogoje so vključene spremembe vrednosti pH ali osmolarnosti (8) (9) (10), medsebojno delovanje sestavin gojišča (11) (12) ali previsoke ravni citotoksičnosti (13) (14) (15) (16).

Ta preskus se uporablja za odkrivanje kromosomskih aberacij, ki so lahko posledica klastogenih dogodkov. Analizo indukcije kromosomskih aberacij je treba izvesti z uporabo celic v metafazi. Zato je bistveno, da v celicah tretiranih in netretiranih kultur poteka mitotična delitev. Pri proizvedenih nanomaterialih so morda potrebne posebne prilagoditve te preskusne metode, ki pa pri tej metodi niso opisane.

Pred uporabo te preskusne metode za preskušanje zmesi in pridobivanje podatkov za predvideni regulativni namen bi bilo treba proučiti, ali bo zagotovila sprejemljive rezultate za navedeni namen in, če jih bo, zakaj. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni.

NAČELO PRESKUSA

Človeške celične kulture ali celične kulture drugih sesalcev so preskusni kemikaliji izpostavljene z zunanjim virom presnovne aktivacije ali brez njega, razen če se uporabijo celice, ki imajo ustrezno sposobnost presnavljanja (glej odstavek 13). Po tem ko so celične kulture izpostavljene preskusni kemikaliji, se v ustreznih, vnaprej določenih intervalih tretirajo s kemikalijo, ki zavira metafazo (npr. kolcemidom ali kolhicinom), nato se odvzamejo in obarvajo, celice v metafazi pa se mikroskopsko analizirajo, da se ugotovi prisotnost aberacij kromatidnega in kromosomskega tipa.

OPIS METODE

Priprave*Celice*

Uporabijo se lahko različne celične linije (npr. celice jajčnikov kitajskega hrčka (CHO), pljuča kitajskega hrčka V79, pljuča kitajskega hrčka (CHL)/IU, TK6) ali primarne celične kulture, vključno z limfociti periferne krvi človeka ali drugih sesalcev (7). Izbiro celičnih linij je treba znanstveno utemeljiti. Pri uporabi primarnih celic je treba zaradi dobrobiti živali razmisliti o uporabi človeških primarnih celic, če je to izvedljivo, ter jih vzorčiti v skladu s človeškimi etičnimi načeli in predpisi. Limfocite periferne krvi človeka je treba pridobiti od mladih oseb (starih med približno 18 in 35 let), ki ne kadijo, nimajo znanih bolezni ali niso bili nedavno izpostavljeni takim stopnjam genotoksičnih snovi (npr. kemikalijam, ionizirajočemu sevanju), zaradi katerih bi se povečala pojavnost kromosomskih aberacij v ozadju. Tako se zagotovi, da je pojavnost kromosomskih aberacij v ozadju nizka in konsistentna. Osnovna pojavnost kromosomskih aberacij se povečuje s starostjo in ta trend je izrazitejši pri ženskah kot pri moških (17) (18). Če se za uporabo zberejo celice več kot enega darovalca, je treba navesti število darovalcev. Prikazati je treba, da so se celice delile od začetka tretiranja s preskusno kemikalijo do njihovega vzorčenja. Celične kulture se vzdržujejo v eksponentni fazi rasti celic (celične linije) ali se stimulira njihova delitev (primarne kulture limfocitov), da se izpostavijo celice v različnih fazah celičnega cikla, saj morda ni znano, kako so posamezne faze celičnega cikla občutljive na preskusne kemikalije. Primarne celice, katerih delitev je treba stimulirati z mitogeni, med izpostavljenostjo preskusni kemikaliji v splošnem niso več sinhronizirane (npr. človeški limfociti po 48-urni stimulaciji z mitogeni). Uporaba sinhronih celic med tretiranjem ni priporočljiva, vendar je lahko na podlagi utemeljitve sprejemljiva.

Gojišča in pogoji kultiviranja

Za vzdrževanje kultur je treba uporabiti ustrezno gojišče in pogoje inkubacije (posode za gojenje, vlažno ozračje s 5 % CO₂, če je ustrezno, temperatura inkubacije 37 °C). Redno je treba preverjati, ali je modalno kromosomsko število v celičnih linijah stabilno in ali te linije niso okužene z mikoplazmo (7) (19); celice se ne smejo uporabljati, če so okužene ali če se je spremenilo modalno kromosomsko število. Določiti je treba običajno trajanje celičnega cikla celičnih linij ali primarnih kultur, uporabljenih v preskuševalnem laboratoriju, ki mora biti skladno z objavljenimi lastnostmi celic (20).

Priprava kultur

Celične linije: celice se namnožijo iz osnovnih kultur, nasadijo v gojišče tako na gosto, da celice v suspenzijah ali monosloju še naprej eksponentno rastejo do odvzema celic (npr. pri celicah, ki rastejo v monosloju, se je treba izogibati konfluenci).

Limfociti: celotna kri, obdelana z antikoagulantom (npr. heparinom), ali ločeni limfociti se dodajo v gojišče (človeški limfociti npr. za 48 ur), ki vsebuje mitogen [za človeške limfocite npr. fitohemaglutinin], da se spodbudi delitev celic pred izpostavitvijo preskusni kemikaliji.

Presnovna aktivacija

Pri uporabi celic, ki nimajo ustrezne notranje sposobnosti presnavljanja, je treba uporabiti zunanje presnovne sisteme. Najpogosteje uporabljeni sistem, ki je priporočen kot privzet, razen če ni drugače utemeljeno, je s kofaktorjem dopolnjena postmitohondrijska frakcija (S9), pripravljena iz jeter glodalcev (običajno podgan), ki so bila obdelana s sredstvi za encimsko indukcijo, kot je Aroclor 1254 (21) (22) (23), ali z mešanico fenobarbitala in β -naftoflavona (24) (25) (26) (27) (28) (29). Ta mešanica ni v nasprotju s Stockholmsko konvencijo o obstojnih organskih onesnaževalih (30) ter se je v primerjavi s sredstvom Aroclor 1254 izkazala kot enako učinkovita za induciranje oksidaz z mešano funkcijo (24) (25) (26) (28). Frakcija S9 se v končnem preskusnem gojišču običajno uporablja v koncentracijah, ki se gibljejo v razponu od 1 do 2 vol. %, lahko pa se poveča na 10 vol. %. Med tretiranjem se je treba izogibati kemičnim izdelkom, ki zmanjšujejo mitotični indeks, zlasti snovem, ki tvorijo kalcijev kompleks (31). Na izbiro vrste in koncentracije zunanjsega sistema presnovne aktivacije ali sredstva za indukcijo presnove lahko vpliva razred kemikalij, ki se preskušajo.

Priprava preskusne kemikalije

Trdne preskusne kemikalije je treba pred tretiranjem celic pripraviti v ustreznih topilih in, če je ustrezno, razredčiti (glej odstavek 23). Tekoče preskusne kemikalije se lahko dodajo neposredno v preskusni sistem in/ali razredčijo pred tretiranjem preskusnega sistema. Plinaste ali hlapne preskusne kemikalije je treba preskusiti z ustrežno prilagojenimi standardnimi protokoli, kot je tretiranje v zatesnjenih posodah za gojenje (32) (33) (34). Preskusne kemikalije je treba pripraviti tik pred tretiranjem, razen če podatki o stabilnosti kažejo, da je shranjevanje sprejemljivo.

Preskusni pogoji

Topila

Izbrati je treba tako topilo, ki optimizira topnost preskusne kemikalije in ne vpliva negativno na izvedbo preskusa, npr. ne spremeni rast celic, ne vpliva na celovitost preskusne kemikalije, ne reagira s posodami za gojenje, ne ovira sistema presnovne aktivacije. Priporočljivo je, da se, kadar koli je to mogoče, najprej razmisli o uporabi vodnega topila (ali gojišča). Zelo uveljavljeni topili sta na primer voda ali dimetil sulfoksid. Organska topila v končnem obdelovalnem gojišču v splošnem ne smejo presegati 1 vol. %, vodna topila (fiziološka raztopina ali voda) pa ne 10 vol. %. Če se uporabljajo neuveljavljena topila (npr. etanol ali aceton), je treba njihovo uporabo podpreti s podatki, ki dokazujejo njihovo združljivost s preskusnimi kemikalijami in preskusnim sistemom ter odsotnost genotoksičnosti pri uporabljeni koncentraciji. Če takšnih podpornih podatkov ni, je treba vključiti netretirane kontrole (glej Dodatek 1), ki dokazujejo, da izbrano topilo ne povzroča škodljivih ali klastogenih učinkov.

Merjenje celične proliferacije in citotoksičnosti ter izbira koncentracij za tretiranje

Pri določanju najvišje koncentracije preskusne kemikalije se je treba izogibati koncentracijam, pri katerih se lahko pojavijo lažni pozitivni odzivi, kot so tisti, ki povzročajo preveliko citotoksičnost (glej odstavke 22), obarjanje v gojiščih (glej odstavek 23) ali znatne spremembe vrednosti pH ali osmolarnosti (glej odstavek 5). Če preskusna kemikalija ob dodajanju povzroči znatno spremembo vrednosti pH v gojišču, se lahko vrednost pH prilagodi z dodajanjem pufru v končno obdelovalno gojišče, da se izogne lažno pozitivnim rezultatom in vzdržujejo ustrezni pogoji kultiviranja.

Z meritvami celične proliferacije se zagotovi, da med preskusom poteka mitoza v zadostnem številu tretiranih celic in da se tretiranja izvedejo pri ustreznih ravneh citotoksičnosti (glej odstavka 18 in 22). Citotoksičnost je treba v glavnem preskusu določiti s presnovno aktivacijo ali brez nje, pri čemer je treba uporabiti ustrezni kazalnik celične smrti in rasti. Čeprav je lahko koristno, da se zaradi boljšega določanja koncentracij, ki jih je treba uporabiti v glavnem preskusu, citotoksičnost oceni v začetnem preskusu, ta preskus ni obvezen. Če se izvede, ne sme nadomestiti merjenja citotoksičnosti v glavnem preskusu.

Za oceno citotoksičnosti v citogenetskih preskusih sta ustrezni metodi relativna podvojitve populacije ali relativno povečanje števila celic (13) (15) (35) (36) (55) (glej Dodatek 2 za formule). V primeru dolgotrajnega tretiranja in časov vzorčenja po začetku tretiranja, ki so daljši od 1,5 dolžine normalnega celičnega cikla (tj. daljši od skupaj 3 celičnih ciklov), se lahko pri relativni podvojitvi populacije vrednost citotoksičnosti podceni (37). V tem primeru je boljše merilo relativno povečanje števila celic ali je v pomoč ocena citotoksičnosti po 1,5 dolžine normalnega celičnega cikla, pri čemer se uporabi relativna podvojitve populacije.

Glede limfocitov v primarnih kulturah je mitotični indeks, čeprav je merilo citotoksičnih/citostatskih učinkov, odvisen od časa meritve po tretiranju, uporabljenega mitogena in morebitne motnje celičnega cikla. Vendar je mitotični indeks sprejemljiv, ker so druge meritve citotoksičnosti lahko težavne in nepraktične ter jih morda ni mogoče uporabiti za ciljno populacijo limfocitov, ki rastejo zaradi stimulacije s fitohemaglutininom.

Čeprav sta relativno povečanje števila celic in relativna podvojitve populacije priporočena parametra citotoksičnosti za celične linije, mitotični indeks pa za primarno kulturo limfocitov, lahko drugi kazalniki (npr. celična neokrnjenost, nekroza, apoptoza, celični cikel) zagotovijo koristne dodatne podatke.

Oceniti je treba vsaj tri preskusne koncentracije (v kar niso vključeni topilo in pozitivne kontrole), ki izpolnjujejo merila za sprejemljivost (ustrezna citotoksičnost, število celic itd.). Ne glede na vrsto celic (celične linije ali primarne kulture limfocitov) se lahko pri vsaki preskušeni koncentraciji tretira ponovitev kulture ali le ena sama kultura. Čeprav je priporočljiva uporaba podvojenih kultur, je sprejemljiva tudi ena sama kultura, če je skupno število celic v eni kulturi ali ponovitvah kulture enako. Uporaba ene kulture je zlasti pomembna, če se ocenjujejo več kot 3 koncentracije (glej odstavek 31). Za analizo podatkov se lahko zberejo rezultati, pridobljeni pri neodvisnih ponovitvah kulture za zadevno koncentracijo (38). Za preskusne kemikalije, ki kažejo malo ali nič citotoksičnosti, bodo ustrezni približno 2- do 3-kratni intervali med koncentracijami. V primeru citotoksičnosti morajo izbrane preskusne koncentracije zajemati območje iz navedene nastale citotoksičnosti, kot je opisano v odstavku 22, ter vključevati koncentracije, pri katerih je citotoksičnost zmerna oziroma majhna ali je ni. Pri številnih preskusnih kemikalijah so vidne strme krivulje odziva na koncentracijo, zato je treba za pridobitev podatkov za nizko in zmerno citotoksičnost ali podrobno proučevanje razmerja med odzivom in odmerkom uporabiti večje število koncentracij, ki so tesno skupaj, in/ali več kot tri koncentracije (ena kultura ali ponovitve kultur), zlasti kadar je treba poskus ponoviti (glej odstavek 47).

Če največja koncentracija temelji na citotoksičnosti, si je treba pri najvišji koncentraciji prizadevati, da citotoksičnost ne preseže razpona $55 \pm 5 \%$, pri čemer se uporabljajo priporočeni parametri citotoksičnosti (tj. zmanjšanje relativnega povečanja števila celic in relativne podvojitve populacije za celične linije ter zmanjšanje mitotičnega indeksa za primarne kulture limfocitov na razpon $45 \pm 5 \%$ sočasne negativne kontrole). Pozitivne rezultate, ki se nahajajo le na višjem koncu tega razpona citotoksičnosti, ki znaša $55 \pm 5 \%$, je treba razlagati previdno (13).

Pri slabo topnih preskusnih kemikalijah, ki pri koncentracijah, nižjih od najnižje netopne koncentracije, niso citotoksične, mora najvišja analizirana koncentracija ob koncu tretiranja s preskusno kemikalijo povzročiti nastanek motnosti ali oborine, ki je vidna s prostim očesom ali pod invertnim mikroskopom. Tudi če se citotoksičnost pojavi nad najnižjo netopno koncentracijo, je priporočljivo, da se preskusi le pri eni koncentraciji, ki povzroči nastanek motnosti ali vidne oborine, saj lahko oborina povzroči lažne učinke. Pri koncentraciji, ki povzroči nastanek oborine, je treba paziti, da oborina ne vpliva na izvedbo preskusa (npr. barvanje ali štetje). Koristno je lahko, če se pred preskusom določi topnost v gojišču.

Če oborina ni vidna ali ni opažene mejne citotoksičnosti, mora biti najvišja preskusna koncentracija 10 mM, 2 mg/ml ali 2 µl/ml, pri čemer se upošteva najnižja od teh koncentracij (39) (40) (41). Če preskusna kemikalija nima določene sestave, kot so npr. snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali (UVCB) (42), okoljski ekstrakt itd., je v primeru odsotnosti ustrezne citotoksičnosti morda treba povečati najvišjo koncentracijo (npr. 5 mg/ml), da bi se povečala koncentracija vsake posamezne sestavine. Vendar je treba opozoriti, da se lahko pri zdravlilih za uporabo v humani medicini te zahteve razlikujejo (43).

Kontrole

V vsak odvzem celic je treba vključiti sočasne negativne kontrole (glej odstavek 15), sestavljene le iz topila v obdelovalnem gojišču, ki je obdelano enako kot kulture za tretiranje.

Sočasne pozitivne kontrole so potrebne, da se dokaže zmožnost laboratorija, da odkrije klastogene pod pogoji uporabljenega preskusnega protokola, in učinkovitost zunanjega sistema presnovne aktivacije, če je ustrezno. Primeri pozitivnih kontrol so navedeni v preglednici 1. Za pozitivno kontrolo se lahko uporabijo tudi druge kemikalije, če je to utemeljeno. Ker *in vitro* preskusi genotoksičnosti za celice sesalcev niso dovolj standardizirani, je lahko uporaba pozitivnih kontrol omejena na klastogen, pri katerem je potrebna presnovna aktivacija. Če se izvaja sočasno z neaktiviranim preskusom, pri katerem se uporablja enak čas tretiranja, se pri tem enem odzivu pozitivne kontrole pokaže tako delovanje sistema presnovne aktivacije kot tudi odzivnost preskusnega sistema. Vendar je treba pri dolgotrajnem tretiranju (brez S9) uporabiti lastno pozitivno kontrolo, saj se trajanje tretiranja razlikuje od preskusa, pri katerem se uporablja presnovna aktivacija. Vsako pozitivno kontrolo je treba uporabiti pri eni ali več koncentracijah, pri katerih se pričakuje obnovljivo in zaznavno povečanje glede na ozadje, da se dokaže občutljivost preskusnega sistema (kar pomeni, da so učinki jasni, vendar pri odčitavanju ne razkrijejo takoj identitete označenih mikroskopskih preparatov), odziva pa ne sme ogroziti citotoksičnost, ki bi preseгла meje, določene za to preskusno metodo.

Preglednica 1

Referenčne kemikalije, ki se priporočajo za ocenjevanje usposobljenosti laboratorija in izbor pozitivne kontrole

Kategorija	Kemikalija	Št. CAS
1. Klastogeni, aktivni brez presnovne aktivacije		
	metil metansulfonat	66-27-3
	mitomicin C	50-07-7
	4-nitrokvinolin-N-oksidi	56-57-5
	citozin arabinozid	147-94-4
2. Klastogeni, pri katerih je potrebna presnovna aktivacija		
	benzo(a)piren	50-32-8
	ciklofosfamid	50-18-0

POSTOPEK

Tretiranje s preskusno kemikalijo

Množiče se celice se tretirajo s preskusno kemikalijo v prisotnosti in odsotnosti sistema presnovne aktivacije.

Čas odvzema celic iz kulture

Za temeljito oceno, ki bi bila potrebna za sklep o negativnem rezultatu, je treba izvesti vse tri naslednje preskusne pogoje ter pri tem uporabiti kratkotrajno tretiranje s presnovno aktivacijo in brez nje ter dolgotrajno tretiranje brez presnovne aktivacije (glej odstavke 43, 44 in 45):

- celice je treba za 3 do 6 ur izpostaviti preskusni kemikaliji brez presnovne aktivacije in vzorčiti ob času, ki ustreza približno 1,5 dolžine normalnega celičnega cikla po začetku tretiranja (18);
- celice je treba za 3 do 6 ur izpostaviti preskusni kemikaliji s presnovno aktivacijo in vzorčiti ob času, ki ustreza približno 1,5 dolžine normalnega celičnega cikla po začetku tretiranja (18);
- celice morajo biti nenehno izpostavljene brez presnovne aktivacije, dokler se ne vzorčijo ob času, ki ustreza približno 1,5 dolžine normalnega celičnega cikla. Določene kemikalije (npr. nukleozidni analogi) se lažje odkrijejo, če so časi tretiranja/vzorčenja daljši od 1,5 dolžine normalnega celičnega cikla (24).

Če so pri katerem koli od navedenih preskusnih pogojev rezultati pozitivni, morda ni treba raziskovati nobenih drugih režimov tretiranja.

Priprava kromosomov

Celične kulture se obdelajo s kolcemidom ali kolhicinom, in sicer običajno eno do tri ure pred odvzemom celic. Celice se odvzamejo in obdelajo za pripravo kromosomov iz vsake kulture posebej. Priprava kromosomov vključuje hipotonično obdelavo celic, fiksiranje in barvanje. V monosloju so lahko po zaključku obdelave, ki traja od 3 do 6 ur, prisotne mitotične celice (so okrogle in se ločujejo od površine). Ker se te mitotične celice zlahka ločijo, se lahko ob odstranitvi gojišča s preskusno kemikalijo izgubijo. Če obstaja dokaz o znatnem povečanju števila mitotičnih celic v primerjavi s kontrolnimi vzorci, ki kažejo verjetno mitotično zaviranje, je treba celice zbrati s centrifugiranjem in jih dodati nazaj h kulturam, da ne bi izgubili celic, v katerih poteka mitoza in pri katerih ob odvzemu obstaja tveganje kromosomske aberacije.

Analiza

Vse preparate, vključno s pozitivnimi in negativnimi kontrolami, je treba pred mikroskopsko analizo kromosomskih aberacij neodvisno označiti. Ker fiksiranje pogosto povzroči pretrganje dela celic v metafazi, ki imajo izgubljene kromosome, mora biti število centromer v štetih celicah pri vseh vrstah celic enako modalnemu številu ± 2 .

Na vsako koncentracijo in vsako kontrolo je treba v štetje vključiti vsaj 300 dobro vidnih metafaz, da se lahko sklepa, da je preskusna kemikalija jasno negativna (glej odstavek 45). Če se uporabljajo ponovitve kulture, mora biti teh 300 celic enakomerno porazdeljenih med ponovitvami. V primeru uporabe ene kulture na koncentracijo (glej odstavek 21) je treba v tej kulturi v štetje vključiti vsaj 300 dobro vidnih metafaz. Prednost štetja 300 celic je v tem, da poveča statistično moč preskusa in da se redko opazijo ničelne vrednosti (po pričakovanjih le 5 %) (44). Število štetih metafaz se lahko zmanjša, če se opazi veliko število celic s kromosomskimi aberacijami in se sklepa, da je preskusna kemikalija jasno pozitivna.

Štetje je treba celice s strukturnimi kromosomskimi aberacijami, vključno z vrzeli in brez njih. Prelomi in vrzeli so opredeljeni v Dodatku 1 v skladu s (45) (46). Kromatidne in kromosomske aberacije je treba zabeležiti posebej in jih razvrstiti v podvrste (prelomi, izmenjave). S postopki, ki se uporabljajo v laboratoriju, je treba zagotoviti, da analizo kromosomskih aberacij izvajajo osebe, ki so zelo usposobljene za štetje, in da se po potrebi izvede medsebojni strokovni pregled.

Čeprav je preskus namenjen odkrivanju strukturnih kromosomskih aberacij, je pomembno, da se poliploidija in endoreduplikacija zabeležita, ko se opazita. (Glej odstavek 2.)

Usposobljenost laboratorija

Preden se začne laboratorij uporabljati za rutinsko preskušanje, mora izvesti sklop preskusov z referenčnimi pozitivnimi kemikalijami, ki delujejo z različnimi mehanizmi in različnimi negativnimi kontrolami (z uporabo različnih topil/vehiklov), s čimer dokaže, da ima zadostne izkušnje s preskusom. Ti odzivi pozitivnih in negativnih kontrol morajo biti skladni z viri. To ne velja za laboratorije, ki imajo izkušnje, tj. ki imajo na voljo zbirko podatkov iz preteklih preskusov, kot je opredeljena v odstavku 37.

Izbor kemikalij za pozitivno kontrolo (glej preglednico 1 v odstavku 26) je treba preiskati s kratkotrajnim ali dolgotrajnim tretiranjem brez presnovne aktivacije ter kratkotrajnim tretiranjem ob presnovni aktivaciji, da se dokaže usposobljenost za odkrivanje klastogenih snovi in določi učinkovitost sistema presnovne aktivacije. Izbrati je treba območje koncentracij izbranih kemijskih snovi, kar omogoča ponovljiva in s koncentracijo povezana povečanja glede na ozadje, da se pokaže občutljivost in dinamično območje preskusnega sistema.

Podatki o kontroli iz preteklih preskusov

Laboratorij mora določiti:

- območje in porazdelitev pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov ter
- območje in porazdelitev negativnih kontrol (netretirane, topilo) iz preteklih preskusov.

Ko se podatki za porazdelitev negativnih kontrol iz preteklih preskusov pridobivajo prvič, morajo biti sočasne negativne kontrole skladne z objavljenimi podatki o kontrolah, če obstajajo. Ko se k porazdelitvi kontrol dodaja več podatkov o preskusu, sočasne negativne kontrole po možnosti ne bi smele preseči 95-odstotne kontrolne meje za navedeno porazdelitev (44) (47). Zbirka podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov mora sprva temeljiti na vsaj 10 preskusih, po možnosti pa mora biti sestavljena iz vsaj 20 preskusov, izvedenih v primerljivih preskusnih pogojih. Laboratoriji morajo uporabljati metode nadzora kakovosti, kot so kontrolne karte (npr. c-karte ali „X-črta“ karte (48)), da opredelijo, kako variabilni so njihovi podatki o pozitivnih in negativnih kontrolah, in pokažejo, da je metodologija v njihovem laboratoriju „pod nadzorom“ (44). Nadaljnja priporočila o načinu oblikovanja in uporabe podatkov iz preteklih preskusov (npr. merila za vključitev podatkov med podatke iz preteklih preskusov in njihovo izključitev iz teh podatkov ter merila za sprejemljivost za zadevni poskus) so navedena v virih (47).

Vsako spremembo v protokolu preskusa je treba proučiti glede na skladnost z obstoječimi zbirkami podatkov laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov. Če se pojavijo večje neskladnosti, je treba ustvariti novo zbirko podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov.

V podatke o negativnih kontrolah je treba vključiti pojav celic s kromosomskimi aberacijami iz ene kulture ali vsote ponovitev kulture, kot je opisano v odstavku 21. Sočasne negativne kontrole po možnosti ne smejo preseči 95-odstotne kontrolne meje porazdelitve iz zbirke podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (44) (47). Kadar podatki o sočasni negativni kontroli presežejo 95-odstotno kontrolno mejo, jih je sprejemljivo vključiti v porazdelitev kontrol iz preteklih preskusov, če ti podatki niso izjemni osamelci ter če obstaja dokaz, da je preskusni sistem „pod nadzorom“ (glej odstavek 37), in dokaz o odsotnosti tehničnih ali človeških napak.

PODATKI IN POROČANJE

Predstavitev rezultatov

Oceniti je treba odstotek celic s strukturnimi kromosomskimi aberacijami. Ločeno je treba navesti kromatidne in kromosomske aberacije, razvrščene glede na podvrste (prelomi, izmenjave), skupaj z njihovim številom in pogostostmi za poskusne in kontrolne kulture. Vrzeli se zabeležijo in o njih se poroča ločeno, vendar se ne vključijo v skupno število pogostnosti aberacij. Ko se opazi poliploidija in/ali endoreduplicirane celice, se poroča o njihovem odstotku.

Zabeležiti je treba sočasne meritve citotoksičnosti za vse tretirane, negativne in pozitivne kontrolne kulture v glavnih poskusih, ki se nanašajo na aberacije.

Navedejo se podatki za posamezne kulture. Poleg tega se vsi podatki povzamejo v obliki preglednice.

Merila za sprejemljivost

Sprejemljivost preskusa temelji na naslednjih merilih:

- Šteje se, da je sočasna negativna kontrola sprejemljiva za vključitev v zbirko podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov, kot je opisano v odstavku 39.
- Sočasne pozitivne kontrole (glej odstavek 26) morajo povzročiti odzive, skladne z odzivi iz zbirke podatkov o pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov, in statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo.
- Izpolnjena morajo biti merila za celično proliferacijo v kontroli s topilom (odstavka 17 in 18).
- Preskušeni so bili vsi trije preskusni pogoji, razen če so pri enem nastali pozitivni rezultati (glej odstavek 28).
- Analizirati je mogoče ustrezno število celic in koncentracij (odstavka 31 in 21).
- Merila za izbor najvišje koncentracije so skladna z merili, opisanimi v odstavkih 22, 23 in 24.

Vrednotenje in razlaga rezultatov

Pod pogojem, da so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno pozitivno, če se v katerem koli od proučevanih preskusnih pogojev (glej odstavek 28):

- a) pri vsaj eni od preskusnih koncentracij pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;
- b) je povečanje povezano z odmerkom, kadar se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom;
- c) je kateri koli od rezultatov zunaj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi, glej odstavek 39).

Ko so izpolnjena vsa ta merila, se nato šteje, da lahko preskusna kemikalija povzroči nastanek kromosomskih aberacij v kultiviranih celicah sesalcev v tem preskusnem sistemu. Priporočila glede najustreznejših statističnih metod so navedena v virih (49) (50) (51).

Pod pogojem, da so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno negativno, če se v katerem koli od proučevanih preskusnih pogojev (glej odstavek 28):

- a) pri nobeni od preskusnih koncentracij ne pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;

- b) ne pojavi povečanje, povezano z odmerkom, kadar se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom;
- c) vsi rezultati nahajajo znotraj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi; glej odstavek 39).

Nato se šteje, da preskusna kemikalija ne more povzročiti nastanka kromosomskih aberacij v kultiviranih celicah sesalcev v tem preskusnem sistemu.

Preverjanje jasno pozitivnega ali jasno negativnega odziva ni potrebno.

Če odziv ni niti jasno negativen niti jasno pozitiven, kot je opisano zgoraj, ali za podporo pri ugotavljanju biološke pomembnosti rezultatov, je treba podatke oceniti s strokovno presojo in/ali nadaljnjimi preiskavami. Štetje dodatnih celic (po potrebi) ali izvedba ponovitve poskusa je lahko koristna, po možnosti z uporabo spremenjenih preskusnih pogojev (npr. razmik med koncentracijami, drugi pogoji za presnovno aktivacijo (tj. koncentracija ali izvor S9)).

Zbirka podatkov v redkih primerih celo po izvedbi nadaljnjih preiskav onemogoča sprejetje sklepa o pozitivnih ali negativnih rezultatih, zato se zaključí, da je odziv na preskusno kemikalijo dvoumen.

Povečanje števila poliploidnih celic kaže na to, da ima preskusna kemikalija potencial za zaviranje mitotičnih procesov in povzročanje numeričnih kromosomskih aberacij (52). Povečanje števila celic z endoredupliciranimi kromosomi lahko pomeni, da lahko preskusne kemikalije zavirajo potek celičnega cikla (53) (54) (glej odstavek 2). Pojav poliploidnih celic in celic z endoredupliciranimi kromosomi je zato treba zabeležiti ločeno.

Poročilo o preskusu

V poročilo o preskusu se vključijo naslednji podatki:

Preskusna kemikalija:

- vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;
- stabilnost preskusne kemikalije, če je znana;
- topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu/nosilcu, če sta znani;
- meritve vrednosti pH, osmolarnosti in oborine v gojišču, ki mu je bila dodana preskusna kemikalija, če je ustrezno.

Snov iz ene sestavine:

- fizični videz, topnost v vodi in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti;
- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

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

Topilo:

- utemeljitev izbire topila;
- navesti je treba tudi odstotek topila v končnem gojišču.

Celice:

- vrsta in izvor celic;
- lastnosti kariotipa in ustreznost uporabljene vrste celic;
- za celične linije – odsotnost mikoplazme;
- za celične linije – informacije o trajanju celičnega cikla, podvojitvenem času ali indeksu proliferacije;
- spol donorjev krvi, starost in vse pomembne informacije o donorju, uporabljeni krvi v celoti ali ločenih limfocitih, mitogenih;
- za celične linije – število pasaž, če je na voljo;
- za celične linije – metode vzdrževanja celičnih kultur;
- za celične linije – modalno število kromosomov.

Preskusni pogoji:

- identiteta kemikalije, ki zavira metafazo, njena koncentracija in čas izpostavljenosti celic;
- koncentracija preskusne kemikalije, izražena kot končna koncentracija v gojišču (npr. v μg ali mg/ml ali mM gojišča);
- razlogi za izbiro koncentracij in števila kultur, vključno z npr. podatki o citotoksičnosti in mejah topnosti;
- sestava gojišča, koncentracija CO_2 , če je na voljo, stopnja vlažnosti;
- koncentracija (in/ali volumen) topila in preskusne kemikalije, ki se dodata v gojišče;
- temperatura inkubacije;
- čas inkubacije;
- trajanje tretiranja;
- odvzem celic po tretiranju;
- gostota celic ob nasaditvi, če je ustrezno;
- vrsta in sestava sistema presnovne aktivacije (vir S9, način priprave zmesi S9, koncentracija ali volumen zmesi S9 in S9 v končnem gojišču, nadzor kakovosti S9);
- kemikalije pozitivne in negativne kontrole, končne koncentracije za vsak pogoj tretiranja;
- metode priprave preparatov in uporabljene tehnike barvanja;
- merila za sprejemljivost poskusov;
- merila za štetje aberacij;
- število analiziranih metafaz;
- metode merjenja citotoksičnosti;
- vsi dodatni podatki, pomembni za citotoksičnost in uporabljeno metodo;
- merila za obravnavanje študij kot pozitivnih, negativnih ali dvoumnih;
- uporabljene metode za določitev vrednosti pH, osmolarnosti in obarjanja.

Rezultati:

- število tretiranih celic in število odvzetih celic za vsako kulturo, kadar se uporabljajo celične linije;
- meritve citotoksičnosti, npr. relativna podvojitve populacije, relativno povečanje števila celic in mitotični indeks, morebitna druga opažanja;
- informacije o trajanju celičnega cikla, času podvojitve ali indeksu proliferacije v primeru celičnih linij;
- znaki obarjanja in čas odkritja;
- opredelitev aberacij, vključno z vrzeli;
- število štetih celic, število celic s kromosomskimi aberacijami in vrsta kromosomskih aberacij, ki se navedejo ločeno za vsako tretirano in kontrolno kulturo, vključno z vrzeli in brez njih;
- spremembe v ploidnosti (poliploidne celice in celice z endoredupliciranimi kromosomi, navedene ločeno), če so opažene;
- razmerje med koncentracijo in odzivom, kadar je mogoče;
- podatki o sočasnih negativnih (s topilom) in pozitivnih kontrolah (koncentracije in topila);
- podatki o negativnih (s topilom) in pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov, skupaj z razponi, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni ter 95-odstotnimi kontrolnimi mejami za porazdelitev, pa tudi število podatkov;
- statistične analize, p-vrednosti, če obstajajo.

Razprava o rezultatih**Sklepne ugotovitve****VIRI**

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, št. 234, OECD, Pariz.
- (2) Evans, H. J. (1976). „Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens“, in *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, zv. 4, Hollaender, A. (ed.), Plenum Press, New York in London, str. 1–29.
- (3) Ishidate, M. Jr. in Sofuni, T. (1985). „The *in vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture“ in *Progress in Mutation Research*, zv. 5, Ashby, J. idr. (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam – New York – Oxford, str. 427–432.
- (4) Galloway, S. M. idr. (1987). Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 10/dod. 10, str. 1–175.
- (5) Muehlbauer, P. A. idr. (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*, zv. 49/4, str. 318–327.
- (6) Poglavje B.49 te priloge: *Preskus mikronukleusov in vitro pri celicah sesalcev*.
- (7) ILSI paper (osnutek), Lorge, E., Moore, M., Clements, J., O Donovan, M., Darroudi, F., Honma, M., Czich, A., van Benthem, J., Galloway, S., Thybaud, V., Gollapudi, B., Aardema, M., Kim, J. in Kirkland, D. J. Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing.
- (8) Scott, D. idr. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, zv. 257/2, str. 147–204.

- (9) Morita, T. idr. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, zv. 268/2, str. 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*, zv. 8/6, str. 789–886.
- (11) Long, L. H. idr. (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*, zv. 634/1–2, str. 177–183.
- (12) Nesslany, F. idr. (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrotriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 49/6, str. 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*, zv. 35/3, str. 191–201.
- (14) Kirkland, D. idr. (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*, zv. 584/1–2, str. 1–256.
- (15) Greenwood, S. idr. (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*, zv. 43/1, str. 36–44.
- (16) Hilliard, C. A. idr. (1998). Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 31/4, str. 316–326.
- (17) Hedner, K. idr. (1982). Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex, *Human Genetics*, zv. 62, str. 305–309.
- (18) Ramsey, M. J. idr. (1995). The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutation Research*, zv. 338, str. 95–106.
- (19) Coecke, S. idr. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, zv. 33/3, str. 261–287.
- (20) Henderson, L. idr. (1997). Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, *Mutagenesis*, zv. 12/3, str. 163–167.
- (21) Ames, B. N., McCann, J. in Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, zv. 31/6, str. 347–363.
- (22) Maron, D. M. in Ames, B. N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, zv. 113/3–4, str. 173–215.
- (23) Natarajan, A. T. idr. (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*, zv. 37/1, str. 83–90.
- (24) Matsuoka, A., Hayashi, M. in Ishidate Jr., M. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *in vitro*, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, zv. 66/3, str. 277–290.
- (25) Ong, T.-m. idr. (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*, zv. 4/1, str. 55–65.

- (26) Elliot, B. M. idr. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, zv. 7/3, str. 175–177.
- (27) Matsushima, T. idr. (1976). „A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems“ in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F. J. idr. (eds.), Elsevier, North-Holland, str 85–88.
- (28) Galloway, S. M. idr. (1994). Report from Working Group on *in vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, zv. 312/3, str. 241–261.
- (29) Johnson, T. E., Umbenhauer, D. R. in Galloway, S. M. (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 28/1, str. 51–59.
- (30) UNEP (2001). Stockholmska konvencija o obstojnih organskih onesnaževalih, Program Združenih narodov za okolje (UNEP). Na voljo na: <http://www.pops.int/>.
- (31) Tucker, J. D. in Christensen, M. L. (1987). Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes, *Mutation Research*, zv. 190/3, str. 225–8.
- (32) Krahn, D. F., Barsky F. C. in McCooley, K. T. (1982). „CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids“, in *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, Tice, R. R., Costa, D. L. in Schaich, K. M. (eds.), Plenum, New York, str. 91–103.
- (33) Zamora, P. O. idr. (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*, zv. 5/6, str. 795–801.
- (34) Asakura, M. idr. (2008). An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, *Mutation Research*, zv. 652/2, str. 122–130.
- (35) Lorge, E. idr. (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*, zv. 655/1–2, str. 1–3.
- (36) Galloway, S. idr. (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*, zv. 723/2, str. 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*, zv. 724/1–2, str. 86–87.
- (38) Richardson, C. idr. (1989). *Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays. V: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, str. 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 (Smernice za preskušanje 473, 476 in 487) ENV/JM/TG(2014)17. Na voljo na zahtevo.
- (40) Morita, T., Honma, M. in Morikawa, K. (2012). Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, št. 741/1–2, str. 32–56.
- (41) Brookmire, L., Chen, J. J. in Levy, D. D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the In Vitro Chromosome Aberrations Assay, *Environmental and Molecular Muagenesis*, zv. 54/1, str. 36–43.

- (42) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (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. Na voljo na: <https://federalregister.gov/a/2012-13774>.
- (44) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, št. 198, OECD Publishing, Pariz.
- (45) ISCN (2013). *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Schaffer, L. G., MacGowan-Gordon, J. in Schmid, M. (eds.), Karger Publishers Inc., Connecticut.
- (46) Scott, D. idr. (1990). „Metaphase chromosome aberration assays *in vitro*“, in *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*, Kirkland, D. J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, str. 62–86.
- (47) Hayashi, M. idr. (2011). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research*, zv. 723/2, str. 87–90.
- (48) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*, druga izdaja, John Wiley and Sons, New York.
- (49) Fleiss, J. L., Levin, B. in Paik, M. C. (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3. izdaja., John Wiley & Sons, New York.
- (50) Galloway, S. M. idr. (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 10/dod. 10, str. 1–175.
- (51) Richardson, C. idr. (1989). „Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays“, in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D. J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, str. 141–154.
- (52) Warr, T. J., E. M. Parry in 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*, zv. 287/1, str. 29–46.
- (53) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Research*, zv. 119/3, str. 403–413.
- (54) Huang, Y., Change, C. in Trosko, J. E. (1983). Aphidicolin – induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Research*, zv. 43/3, str. 1362–1364.
- (55) Soper, K. A. in S. M. Galloway (1994). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research*, zv. 312, str. 139–149.
-

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Aneuploidija: vsako odstopanje od normalnega diploidnega (ali haploidnega) števila kromosomov za en ali več kot en kromosom, vendar ne za celotni set kromosomov (poliploidija).

Apoptoza: programirana celična smrt, za katero je značilna vrsta korakov, ki vodijo v razgradnjo celic na delce, obdane z membrano, ki se nato odstranijo s fagocitozo ali osipanjem.

Celična proliferacija: povečanje števila celic kot posledica mitotične delitve celic.

Kemikalija: snov ali zmes.

Kromatidni prelom: prekinitev ene kromatide, pri čemer je jasno vidna nepravilnost ene od kromatid.

Kromatidna vrzel: neobarvano območje (akromatska lezija) posamezne kromatide, pri čemer je nepravilnost kromatide minimalna.

Aberacija kromatidnega tipa: strukturna poškodba kromosoma, izražena kot prelom posamezne kromatide ali prelom in združitev med kromatidama.

Aberacija kromosomskega tipa: strukturna poškodba kromosoma, izražena kot prelom ali prelom in združitev obeh kromatid na istem mestu.

Klastogen: vsaka kemikalija, ki povzroči strukturne kromosomske aberacije v populacijah celic ali evkariotskih organizmih.

Koncentracije: se nanašajo na končne koncentracije preskusne kemikalije v gojišču.

Citotoksičnost: za poskuse, zajete v to preskusno metodo, pri katerih se uporabljajo celične linije, je citotoksičnost opredeljena kot zmanjšanje relativne podvojitve populacije (RPD) ali relativnega povečanja števila celic (RICC) pri tretiranih celicah v primerjavi z negativnimi kontrolami (glej odstavke 17 in Dodatek 2). Za poskuse, zajete v to preskusno metodo, pri katerih se uporabljajo primarne kulture limfocitov, je citotoksičnost opredeljena kot zmanjšanje mitotičnega indeksa pri tretiranih celicah v primerjavi z negativnimi kontrolami (glej odstavke 18 in Dodatek 2).

Endoreduplikacija: proces, pri katerem v jedru po podvajanju DNK v fazi S ne začne potekati mitoza, temveč takoj nastopi druga faza S. Rezultat tega je, da nastanejo kromosomi s 4, 8, 16, ... kromatidami.

Genotoksičen: splošni pojem, ki zajema vse vrste poškodb DNK ali kromosomov, vključno s prelomi, delecijami, adukti, nukleotidnimi spremembami in povezavami, prerazporeditvami, mutacijami genov, kromosomskimi aberacijami in aneuploidijo. Vsi genotoksični učinki ne vplivajo na nastanek mutacij ali trajno poškodbo kromosomov.

Mitotični indeks (MI): razmerje med številom celic v metafazi in skupnim številom celic v opazovani populaciji celic; kazalnik stopnje proliferacije te populacije.

Mitoza: delitev celičnega jedra, ki je običajno razdeljena na profazo, prometafazo, metafazo, anafazo in telofazo.

Mutageno: povzroča dedno spremembo zaporedij baznih parov DNK v genih ali strukturi kromosomov (kromosomske aberacije).

Numerična aberacija: sprememba števila kromosomov, ki se razlikuje od običajnega števila, ki je značilno za uporabljene celice.

Poliploidija: numerične kromosomske aberacije v celicah ali organizmih, ki ne vplivajo na posamezen kromosom ali kromosome (aneuploidija), temveč na celoten set kromosomov.

Status beljakovine p53: beljakovina p53 je vključena v reguliranje celičnega cikla, apoptozo in popravljanje DNK. Celice brez funkcionalne beljakovine p53, ki ne morejo zaustaviti celičnega cikla ali odstraniti poškodovanih celic z apoptozo ali drugimi mehanizmi (npr. indukcijo popravljanja DNK), povezanimi s funkcijami beljakovine p53, s katerimi se ta odzove na poškodbo DNK, so teoretično bolj nagnjene h genskim mutacijam ali kromosomskim aberacijam.

Relativno povečanje števila celic (RICC): povečanje števila celic v kulturah, izpostavljenih kemikalijam, v primerjavi s povečanjem v netretiranih kulturah, pri čemer je razmerje izraženo kot odstotek.

Relativna podvojitev populacije (RPD): povečanje števila podvojitvev populacije v kulturah, izpostavljenih kemikalijam, v primerjavi s povečanjem v netretiranih kulturah, pri čemer je razmerje izraženo kot odstotek.

Frakcija S9, pripravljena iz jeter: supernatant iz homogenata jeter po centrifugiranju pri 9 000 g, tj. izvleček surovih jeter.

Mešanica S9: mešanica S9, pripravljene iz jeter, in kofaktorjev, potrebnih za dejavnosti presnovnih encimov.

Kontrola s topilom: plošni pojem za opredelitev kontrolnih kultur, ki prejmejo samo topilo, uporabljeno za raztopitev preskusne kemikalije.

Strukturna aberacija: sprememba v strukturi kromosoma, ki je vidna pri mikroskopskem pregledu metafazne stopnje celične delitve, v obliki delecij in fragmentov, transpozicij ali interkromosomskih translokacij.

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

Netretirane kontrole: kulture, ki se ne tretirajo (tj. niti s preskusno kemikalijo niti s topilom), temveč se sočasno tretirajo enako kot kulture, v katere se doda preskusna kemikalija.

Dodatek 2

FORMULE ZA OCENJEVANJE CITOTOKSIČNOSTI

Mitotični indeks (MI):

$$\text{MI}(\%) = \frac{\text{število mitotičnih celic}}{\text{skupno število štetih celic}} \times 100$$

Priporočljiva sta **relativno povečanje števila celic (RICC)** ali **relativna podvojitev populacije (RPD)**, saj se pri obeh metodah upošteva delež celične populacije, ki se je delil.

$$\text{RICC}(\%) = \frac{(\text{povečanje števila celic v tretiranih kulturah(končno - začetno)})}{(\text{povečanje števila celic v kontrolnih kulturah(končno - začetno)})} \times 100$$

$$\text{RPD}(\%) = \frac{(\text{št.podvojitev populacije v tretiranih kulturah})}{(\text{št.podvojitev populacije v kontrolnih kulturah})} \times 100$$

pri čemer je:

$$\text{podvojitev populacije} = [\log (\text{število celic po tretiranju} \div \text{prvotno število celic})] \div \log 2$$

Na primer RICC ali RPD s 53 % pomeni 47-odstotno citotoksičnost/citostazo, 55-odstotna citotoksičnost/citostaza, izmerjena z MI, pa pomeni, da dejanski MI znaša 45 % vrednosti kontrole.

V vsakem primeru je treba izmeriti število celic pred tretiranjem ter število celic v tretiranih kulturah in negativnih kontrolnih kulturah.

Čeprav se je v preteklosti kot parameter citotoksičnosti uporabljalo relativno število celic (RCC) (tj. število celic v tretiranih kulturah/število celic v kontrolnih kulturah), to ni več priporočljivo, saj lahko podceni vrednost citotoksičnosti.

V negativnih kontrolnih kulturah mora biti podvojitev populacije združljiva z zahtevo po vzorčenju celic po tretiranju v času, ki ustreza približno 1,5 dolžine normalnega celičnega cikla, mitotični indeks pa mora biti dovolj visok, da v zadostnem številu celic poteka mitotična in se zanesljivo izračuna 50-odstotno zmanjšanje.“

(4) Poglavje B.11 dela B se nadomesti z naslednjim:

„B.11 Preskus kromosomskih aberacij v kostnem mozgu sesalcev

UVOD

Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD 475 (2016). Je del sklopa preskusnih metod o genetski toksikologiji. Pripravljen je dokument OECD, ki zagotavlja jedrnatne informacije o preskušanju v zvezi z genetsko toksikologijo in pregled nedavnih sprememb teh preskusnih smernic (1).

Preskus kromosomskih aberacij *in vivo* v kostnem mozgu sesalcev je posebej primeren za ocenjevanje genotoksičnosti, saj so pri tem aktivni dejavniki metabolizma *in vivo*, farmakokinetike in popravljanja DNK, ki prispevajo k odzivom, čeprav se lahko od vrste do vrste razlikujejo. Preskus *in vivo* je uporaben tudi za nadaljnjo preiskavo genotoksičnosti, odkrite s sistemom *in vitro*.

Preskus kromosomskih aberacij *in vivo* pri sesalcih se uporablja za odkrivanje strukturnih kromosomskih aberacij, ki jih povzroči preskusna kemikalija v celicah kostnega mozga živali, običajno glodalcev (2) (3) (4) (5). Ločimo dva tipa strukturnih kromosomskih aberacij, in sicer: kromosomski in kromatidni tip. Večina genotoksičnih, kemijsko induciranih aberacij je kromatidnih, lahko pa se pojavijo tudi aberacije kromosomskega tipa. Kromosomske poškodbe in podobni pojavi so vzrok številnih genskih bolezni pri človeku in obstajajo tehtni dokazi, da so te lezije in podobni pojavi, ki povzročajo spremembe v onkogenih in genih zaviralcih rasti tumorjev, povezani z rakom pri človeku in v poskusnih sistemih. Pri *in vivo* preskusih kromosomske aberacije lahko pride do poliploidije (vključno z endoreduplikacijo). Poliploidija sama po sebi še ne pomeni anevgenega potenciala, pač pa lahko samo nakazuje motnjo celičnega cikla ali citotoksičnost. Ta preskus ni zasnovan za merjenje aneuploidije. Preskus mikronukleusov v eritrocitih sesalcev *in vivo* (poglavje B.12 te priloge) ali preskus mikronukleusov *in vitro* pri celicah sesalcev (poglavje B.49 te priloge) sta preskus *in vivo* oziroma *in vitro*, ki se priporočata za odkrivanje aneuploidije.

Opredelitve ključnih pojmov so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI

V tem preskusu se običajno uporabljajo glodalci, vendar so lahko v nekaterih primerih primerne tudi druge vrste, če je to znanstveno upravičeno. Ciljno tkivo pri tem preskusu je kostni mozeg, saj je zelo vaskularizirano in vsebuje populacijo celic s hitrim potekom cikla, ki se z lahkoto izolirajo in obdelajo. V poročilu je treba znanstveno utemeljiti uporabo drugih vrst glodalcev, ki niso podgane in miši. Če se ne uporabljajo glodalci, temveč druge vrste, je priporočljivo, da se merjenje kromosomskih aberacij v kostnem mozgu vključi v drug ustrezen preskus toksičnosti.

Če obstajajo dokazi, da preskusne kemikalije ali njihovi metaboliti ne bodo dosegli ciljnega tkiva, ta preskus morda ni primeren.

Pred uporabo te preskusne metode za preskušanje zmesi in pridobivanje podatkov za predvideni regulativni namen bi bilo treba proučiti, ali bo zagotovila sprejemljive rezultate za navedeni namen in, če jih bo, zakaj. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni.

NAČELO PRESKUSNE METODE

Živali se preskusni kemikaliji izpostavijo z ustreznim načinom izpostavljenosti in se humano evtanazirajo ob primernem času po tretiranju. Pred evtanazijo se živali tretirajo z zaviralcem metafaze (npr. kolhicinom ali kolcemidom). Nato se pripravijo in obarvajo preparati kromosomov iz celic kostnega mozga ter se analizirajo kromosomske aberacije v celicah v metafazi.

PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI LABORATORIJA

Preverjanje usposobljenosti

Preden se začne laboratorij uporabljati za rutinsko preskušanje, mora dokazati, da je sposoben ponoviti pričakovane rezultate iz objavljenih podatkov (npr. (6)) za pogostost kromosomskih aberacij z vsaj dvema kemikalijama za pozitivno kontrolo (vključno z blagimi odzivi, ki jih povzročijo majhni odmerki v pozitivnih kontrolah), kot so tiste iz preglednice 1, in z združljivimi kontrolami z vehiklom/topilom (glej odstavek 22); s tem laboratorij tudi dokaže, da ima zadostne izkušnje z izvajanjem poskusov. Pri teh poskusih je treba uporabiti odmerke, pri katerih se omogočajo ponovljiva in z odmerkom povezana povečanja ter se pokažeta občutljivost in dinamično območje preskusnega sistema v zadevnem tkivu (kostni mozeg) in uporabi metoda štetja, ki jo je treba uporabljati v laboratoriju. To ne velja za laboratorije, ki imajo izkušnje, tj. ki imajo na voljo zbirko podatkov iz preteklih preskusov, kot je opredeljeno v odstavkih 10 do 14.

Podatki o kontrolah iz preteklih preskusov

Med preverjanjem usposobljenosti mora laboratorij določiti:

- območje in porazdelitev pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov ter
- območje in porazdelitev negativnih kontrol iz preteklih preskusov.

Ko se podatki o porazdelitvi negativnih kontrol iz preteklih preskusov pridobivajo prvič, morajo biti sočasne negativne kontrole skladne z objavljenimi podatki o kontrolah, če ti obstajajo. Ko se k porazdelitvi kontrol iz preteklih preskusov dodaja več podatkov o preskusu, sočasne negativne kontrole po možnosti ne bi smele preseči 95-odstotne kontrolne meje za navedeno porazdelitev. Zbirka podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov mora biti statistično zanesljiva, s čimer se zagotovi, da je laboratorij sposoben oceniti porazdelitev svojih podatkov o negativnih kontrolah. Iz virov je razvidno, da je potrebnih vsaj 10 preskusov, po možnosti pa mora biti zbirka sestavljena iz vsaj 20 preskusov, izvedenih v primerljivih preskusnih pogojih. Laboratoriji morajo uporabljati metode nadzora kakovosti, kot so kontrolne karte (npr. c-karte ali „X-črta“ karte (7)), da opredelijo, kako variabilni so njihovi podatki, in pokažejo, da je metodologija v njihovem laboratoriju „pod nadzorom“. Nadaljnja priporočila o načinu oblikovanja in uporabe podatkov iz preteklih preskusov (npr. merila za vključitev podatkov med podatke iz preteklih preskusov in njihovo izključitev iz teh podatkov ter merila za sprejemljivost za zadevni poskus) so navedena v virih (8).

Kadar laboratorij med preverjanjem usposobljenosti (opisanim v odstavku 9) ne izvede zadostnega števila preskusov za določitev statistično zanesljive porazdelitve negativnih kontrol (glej odstavek 11), je sprejemljivo, da se lahko porazdelitev razvije med prvimi rutinskimi preskusi. Pri tem pristopu je treba upoštevati priporočila, navedena v virih (8), rezultati negativnih kontrol, pridobljeni pri teh poskusi, pa morajo ostati skladni z objavljenimi podatki o negativnih kontrolah.

Vsako spremembo v protokolu poskusa je treba proučiti glede na vpliv, ki ga ima na to, da pridobljeni podatki ostanejo skladni z obstoječo zbirko podatkov laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov. Novo zbirko podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov je treba ustvariti le v primeru večjih neskladnosti, kadar se s strokovno presojo oceni, da se razlikuje od prejšnje porazdelitve (glej odstavek 11). Ko se zbirka podatkov ustvarja na novo, za izvedbo dejanskega preskusa ni potrebna celotna zbirka podatkov o negativnih kontrolah, če lahko laboratorij dokaže, da vrednosti njegovih sočasnih negativnih kontrol ostajajo skladne s prejšnjo zbirko podatkov ali z ustreznimi objavljenimi podatki.

V podatke o negativnih kontrolah je treba vključiti pojav strukturnih kromosomskih aberacij (razen vrzeli) za vsako žival. Sočasne negativne kontrole po možnosti ne smejo preseči 95-odstotne kontrolne meje porazdelitve iz zbirke podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov. Kadar podatki o sočasni negativni kontroli presežejo 95-odstotno kontrolno mejo, jih je sprejemljivo vključiti v porazdelitev kontrole iz preteklih preskusov, če ti podatki niso izjemni osamelci ter če obstaja dokaz, da je preskusni sistem „pod nadzorom“ (glej odstavek 11), in dokaz o odsotnosti tehničnih ali človeških napak.

OPIS METODE

Priprave

Izbira živalske vrste

Uporabiti je treba splošno uporabljane laboratorijske seve mladih zdravih odraslih živali. Običajno se uporabljajo podgane, primerne pa so lahko tudi miši. Uporabi se lahko katera koli druga ustrezna vrsta sesalcev, če je to v poročilu znanstveno utemeljeno.

Pogoji nastanitve in hranjenja živali

Pri glodalcih mora biti temperatura v prostoru s poskusnimi živalmi 22 °C (\pm 3 °C). Čeprav mora biti relativna vlažnost vsaj 40-odstotna in po možnosti ne sme presegati 70 %, razen med čiščenjem prostora, si je treba prizadevati za 50–60-odstotno vlažnost. Osvetlitev mora biti umetna, pri čemer je zaporedje 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja običajna laboratorijska hrana z neomejeno količino pitne vode. Na izbiro hrane lahko vpliva potreba po zagotovitvi ustrezne mešanice preskusne kemikalije, kadar se daje na ta način. Glodalce je treba nastaniti v majhnih skupinah (ne več kot pet na kletko), tako da so razporejeni glede na spol in tretirano skupino, če ni pričakovati agresivnega vedenja, in sicer po možnosti v kletke s trdimi tlemi z ustrezno okoljsko obogatitvijo. Živali so lahko nastanjene posamično le, če je to znanstveno utemeljeno.

Priprava živali

Običajno se uporabljajo zdrave mlade živali (kar pri glodalcih pomeni, da so ob začetku tretiranja stare po možnosti od 6 do 10 tednov, čeprav so sprejemljive tudi nekoliko starejše živali), ki se naključno razporedijo v kontrolno in tretirano skupino. Posamezne živali se označijo z edinstvenimi oznakami s humano, čim manj invazivno metodo (npr. z namestitvijo obročkov ali trakov, z vsaditvijo mikročipa ali biometrično identifikacijo, ne pa z zarezovanjem ušesa ali prsta) ter se vsaj pet dni prilagajajo laboratorijskim pogojem. Kletke je treba razporediti tako, da so morebitni učinki zaradi njihovega položaja čim manjši. Izogibati se je treba navzkrižni kontaminaciji s pozitivno kontrolo in preskusno kemikalijo. Ob začetku študije mora biti razlika med težami živali čim manjša in ne sme presegati \pm 20 % srednje vrednosti teže za vsak spol.

Priprava odmerkov

Trdne preskusne kemikalije je treba raztopiti ali suspendirati v ustreznih topilih ali vehiklih ali primešati hrani ali pitni vodi, preden se odmerijo živalim. Tekoče preskusne kemikalije se lahko odmerijo neposredno ali pa se pred odmerjanjem razredčijo. Pri izpostavljenosti z vdihavanjem se lahko preskusne kemikalije dajejo v obliki plina, pare ali trdnega/tekočega aerosola, in sicer odvisno od njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti. Uporabiti je treba sveže pripravljene preskusne kemikalije, razen če je iz podatkov o stabilnosti razvidno, da je shranjevanje sprejemljivo, in so v njih opredeljeni ustrezni pogoji shranjevanja.

Topilo/vehikel

Topilo/vehikel ne sme imeti toksičnih učinkov pri uporabljenih odmerkih in ne sme zbudati suma, da lahko kemično reagira s preskusnimi kemikalijami. Če se uporabijo druga, manj znana topila/vehikli, je treba njihovo uporabo podpreti z referenčnimi podatki, ki dokazujejo njihovo združljivost. Priporočljivo je, da se, kadar koli je to mogoče, najprej razmisli o uporabi vodnega topila/vehikla. Primeri pogosto uporabljenih, združljivih topil/vehiklov so voda, fiziološka raztopina, raztopina metilceluloze, raztopina natrijeve soli karboksimetil celuloze, oljčno olje ali koruzno olje. Če ni podatkov iz preteklih preskusov ali objavljenih podatkov, iz katerih bi bilo razvidno, da izbrano neobičajno topilo/vehikel ne povzroča strukturnih aberacij ali drugih škodljivih učinkov, je treba izvesti začetno študijo, da se dokaže sprejemljivost kontrol s topilom/vehiklom.

Kontrole

Pozitivne kontrole

V vsak preskus je treba običajno vključiti skupino živali, tretiranih s kemikalijo za pozitivno kontrolo. To se lahko odpravi, ko preskusni laboratorij dokaže svojo usposobljenost za izvajanje preskusov in določi območje pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov. Če sočasna pozitivna kontrolna skupina ni vključena, je treba v vsak poskus vključiti kontrole za štetje (fiksirani in nebarvani mikroskopski preparati). Ti se lahko pridobijo tako, da se pri študiji v štetje vključijo ustrezni referenčni vzorci, pridobljeni in shranjeni v okviru ločenega poskusa s pozitivnimi kontrolami, ki se redno izvaja (npr. vsakih 6 do 18 mesecev) v laboratoriju, kjer se preskus izvaja; na primer med preverjanjem usposobljenosti in po tem redno, če je to potrebno.

Kemikalije za pozitivno kontrolo morajo zanesljivo povzročiti zaznavno povečanje pogostosti celic s spontanimi strukturnimi kromosomskimi aberacijami. Odmerke za pozitivno kontrolo je treba izbrati tako, da so učinki jasni, vendar osebi, ki ugotovitve beleži, ne razkrijejo takoj identitete označenih mikroskopskih preparatov. Sprejemljivo je, da se odmerki v pozitivno kontrolo dajejo na način, ki ni enak kot pri preskusni kemikaliji, in da se pri tem uporabi drugačen časovni raspored tretiranja ter se vzorčenje opravi le enkrat. Poleg tega se lahko, če je ustrezno, za pozitivno kontrolo uporabijo kemikalije, ki spadajo v isto skupino nevarnosti kot preskusna kemikalija. Primeri kemikalij za pozitivno kontrolo so navedeni v preglednici 1.

Preglednica 1

Primeri kemikalij za pozitivno kontrolo

Kemikalija	Št. CAS
etil metansulfonat	62-50-0
metil metansulfonat	66-27-3
etilnitrozourea	759-73-9
mitomicin C	50-07-7
ciklofosamid (monohidrat)	50-18-0 (6055-19-2)
trietilenmelamin	51-18-3

Negativne kontrole

V vsak čas vzorčenja je treba vključiti negativno kontrolno skupino živali, ki jo je treba sicer obravnavati enako kot tretirane skupine, vendar se je ne sme tretirati s preskusno kemikalijo. Če se pri dajanju preskusne kemikalije uporablja topilo/vehikel, ga mora prejeti tudi kontrolna skupina. Toda če sta iz podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov pri vsakem času vzorčenja za preskusni laboratorij razvidni konsistentna variabilnost med posameznimi živalmi in pogostost celic s strukturnimi aberacijami, potem za negativno kontrolo zadostuje le eno samo vzorčenje. Če se za negativne kontrole uporablja eno samo vzorčenje, mora biti to prvi čas vzorčenja, uporabljen v študiji.

POSTOPEK

Število in spol živali

Na splošno je odziv mikronukleusov pri živalih moškega in ženskega spola podoben (9) in pričakovati je, da bo to veljalo tudi za strukturne kromosomske aberacije; zato se lahko študije izvajajo na živalih enega ali drugega spola. Če se pri podatkih pokažejo pomembne razlike med moškim in ženskim spolom (npr. razlike v sistemske toksičnosti, metabolizmu, biološki razpoložljivosti, toksičnosti za kostni mozeg itd., vključno s študijo za ugotavljanje območja), je treba spodbujati uporabo obeh spolov. V takem primeru je študijo primerno izvajati na živalih obeh spolov, npr. kot del toksikološke študije s ponavljajočim odmerkom. V primeru uporabe obeh spolov je primerno uporabiti zasnovano preskusa z več dejavniki. Podrobnosti o tem, kako analizirati podatke z uporabo te zasnove, so navedene v Dodatku 2.

Ob začetku študije je treba določiti skupine, v katerih je vsaj 5 živali enega spola ali vsakega od spolov, če se uporabljata oba, ki jih je mogoče analizirati, na skupino. Kadar bi bila lahko izpostavljenost ljudi kemikalijam omejena na en spol, na primer pri nekaterih farmacevtskih izdelkih, je treba preskus opraviti na živalih ustreznega spola. Praviloma je za študijo kostnega mozga pri dveh časih vzorčenja s tremi skupinami, ki prejemajo odmerke, ter sočasno negativno in pozitivno kontrolo (pri čemer je vsaka skupina sestavljena iz vsaj petih živali enega spola) običajno potrebnih 45 živali.

Velikost odmerkov

Če se izvede predhodna študija za določanje območja, ker ustrezni podatki, ki bi bili v pomoč pri izbiri odmerkov, niso na voljo, jo je treba izvesti v istem laboratoriju ter pri tem uporabiti iste vrste, sev, spol in režim tretiranja kot v glavni študiji (10). S študijo je treba določiti največji tolerančni odmerek (MTD), ki je opredeljen kot največji odmerek, ki ga je mogoče prenesti, ne da bi se pri tem pokazala toksičnost, ki bi v povezavi z obdobjem trajanja študije slednjo omejevala (na primer s povzročitvijo upočasnitve pridobivanja telesne teže ali citotoksičnosti za hematopoetski sistem, ne pa smrti ali znakov bolečine ali trpljenja, zaradi katerih je potrebna humana evtanazija (11)).

Največji odmerek se lahko opredeli tudi kot odmerek, ki povzroči nastanek nekaterih znakov toksičnosti za kostni mozeg.

Kemikalije, ki kažejo nasičenost toksikokinetičnih lastnosti ali povzročajo procese razstrupljanja, zaradi katerih se lahko po dolgotrajnem tretiranju zmanjša izpostavljenost, so lahko izjeme pri merilih za določanje odmerkov in jih je treba oceniti za vsak primer posebej.

Da se pridobijo informacije o odzivu na odmerek, je treba v popolno študijo vključiti skupino negativne kontrole in vsaj tri velikosti odmerkov, ki so običajno ločeni s faktorjem 2, vendar ne več kot 4. Če preskusna kemikalija v študiji za ugotavljanje območja ali na podlagi obstoječih podatkov ne povzroča toksičnosti, mora biti najvišji odmerek pri enkratnem dajanju enak 2 000 mg/kg telesne teže. Če pa preskusna kemikalija povzroča toksičnost, mora biti največji tolerančni odmerek najvišji dani odmerek, v uporabljene velikosti odmerkov pa je treba po možnosti zajeti razpon od največjega odmerka do odmerka, ki povzroča malo ali nič toksičnosti. Kadar se toksičnost za ciljno tkivo (kostni mozeg) opazi pri vseh preskušanih velikostih odmerkov, je priporočljiva dodatna študija pri netoksičnih odmerkih. Pri študijah, namenjenih celovitejši opredelitvi kvantitativnih informacij o razmerju med odmerkom in odzivom, so morda potrebne dodatne skupine, ki prejemajo odmerke. Za določene vrste preskusnih kemikalij (npr. zdravila za uporabo v humani medicini), za katere veljajo posebne zahteve, se lahko te meje razlikujejo.

Mejni preskus

Če poskusi za ugotavljanje območja odmerka ali obstoječi podatki iz povezanih živalskih sevov kažejo, da režim tretiranja z vsaj mejnim odmerkom (opisan v nadaljevanju) ne povzroči vidnih toksičnih učinkov (tudi brez upočasnitve proliferacije kostnega mozga ali drugih dokazov o citotoksičnosti za ciljno tkivo), ter če genotoksičnost na podlagi *in vitro* študij genotoksičnosti ali podatkov o strukturno sorodnih kemikalijah ni pričakovana, ni potrebna popolna študija z uporabo treh velikosti odmerkov, če se dokaže, da preskusne kemikalije dosežejo ciljno tkivo (kostni mozeg). V takih primerih morda zadostuje že ena velikost odmerka pri mejnem odmerku. Pri obdobju dajanja, ki presega 14 dni, je mejni odmerek 1 000 mg/kg telesne teže na dan. Pri obdobju odmerjanja, ki je enako 14 dnevom ali manj, je mejni odmerek 2 000 mg/kg telesne teže na dan.

Dajanje odmerkov

Pri načrtovanju preskusa je treba upoštevati predvideni način izpostavljenosti pri ljudeh. Zato se lahko ob ustrezni utemeljitvi izberejo načini izpostavljenosti, kot so s prehrano, pitno vodo, topično podkožno, intravenozno, oralno (z gavažo), z vdihavanjem, intratrahealno ali z vsadkom. V vsakem primeru je treba način izpostavljenosti izbrati tako, da se zagotovi ustrezna izpostavljenost ciljnih tkiv. Dajanje z intraperitonealno injekcijo v splošnem ni priporočljivo, saj to ni predvideni način izpostavljenosti pri ljudeh, in se lahko uporabi samo na podlagi posebne znanstvene utemeljitve. Če je preskusna kemikalija primešana hrani ali pitni vodi, zlasti v primeru enega samega odmerka, je treba paziti, da med zaužitjem hrane in vode ter vzorčenjem preteče dovolj časa, da se lahko odkrijejo učinki (glej odstavka 33 in 34). Največja količina tekočine, ki se lahko da naenkrat z gavažo ali injekcijo, je odvisna od velikosti poskusne živali. Količina običajno ne sme presegati 1 ml na 100 g telesne teže, razen pri vodnih raztopinah, pri katerih se lahko uporabi največ 2 ml na 100 g telesne teže. Uporabo večjih količin je treba utemeljiti. Razen pri dražilnih ali jedkih preskusnih kemikalijah, ki pri višjih koncentracijah običajno povzročajo močnejše učinke, je treba variabilnost preskusne količine s prilagajanjem koncentracije obdržati na čim nižji ravni, da se zagotovi konstanten volumen glede na telesno težo pri vseh odmerkih.

Časovni raspored tretiranja

Preskusne kemikalije se običajno dajo v enem odmerku, lahko pa tudi v razdeljenem odmerku (kar pomeni dva ali več odmerkov v istem dnevu na največ 2 do 3 ure), s čimer se olajša dajanje velike količine kemikalije. V teh okoliščinah ali v primeru dajanja preskusne kemikalije z vdihavanjem je treba čas vzorčenja načrtovati glede na čas zadnjega odmerka ali konca izpostavljenosti.

Za ta preskus je na voljo malo podatkov o ustreznosti protokola s ponavljajočimi se odmerki. Vendar je treba v okoliščinah, v katerih je ta preskus zaželeno vključiti v preskus s ponavljajočimi se odmerki, paziti, da se izognemo izgubi kromosomsko poškodovanih mitotičnih celic, ki se lahko pojavi pri toksičnih odmerkih. Taka vključitev je sprejemljiva, kadar je najvišji odmerek enak ali večji od mejnega odmerka (glej odstavek 29) in se skupini, ki prejema odmerke, med celotnim obdobjem tretiranja daje mejni odmerek. Preskus mikronukleusov (preskusna metoda B.12) je treba šteti kot priporočeni *in vivo* preskus kromosomskih aberacij, kadar je zaželeno, da se vključi v druge študije.

Vzorci kostnega mozga je treba odvzeti dvakrat ob različnih časih po prejemu posameznih odmerkov. Pri glodalcih je prvi čas vzorčenja enak času, ki potreben za dokončanje 1,5 dolžine normalnega celičnega cikla (pri čemer je slednji običajno 12 do 18 ur po obdobju tretiranja). Čas, potreben za sprejem in metabolizem preskusnih kemikalij ter njihov učinek na dinamiko celičnega cikla, lahko vpliva na optimalni čas za odkritje kromosomskih aberacij, zato je priporočljivo, da se vzorci ponovno odvzamejo 24 ur po prvem času vzorčenja. Pri prvem času vzorčenja je treba tretirati vse skupine, ki prejemajo odmerke, in vzeti vzorce za analizo; pri poznejših časih vzorčenja pa je treba dati le najvišje odmerke. Če se na podlagi znanstvene utemeljitve uporabljajo režimi odmerjanja, ki trajajo več kot en dan, je treba na splošno uporabljati en čas vzorčenja ob približno 1,5 dolžine normalnega celičnega cikla po zadnjem tretiranju.

Živalim se po tretiranju in pred vzorčenjem intraperitonealno vbrizga ustrezen odmerek zaviralca metafaze (npr. kolcemid ali kolhicin), nato pa se ob ustreznem intervalu odvzamejo vzorci. Pri miših je ta interval približno 3 do 5 ur, pri podganah pa 2 do 5 ur pred vzorčenjem. Celice se odvzamejo iz kostnega mozga, nabreknejo, fiksirajo in obarvajo ter analizirajo, da se odkrijejo kromosomske aberacije (12).

Opazovanja

Vsaj enkrat na dan je treba opraviti splošna klinična opazovanja preskusnih živali in zabeležiti klinične znake, po možnosti vsak dan ob istem času in ob upoštevanju obdobja največje intenzivnosti pričakovanih učinkov po vnosu odmerka. Vse živali je treba med obdobjem odmerjanja vsaj dvakrat na dan opazovati za odkrivanje obolevnosti in smrtnosti. Vse živali je treba stehtati ob začetku študije, vsaj enkrat na teden med študijami s ponavljajočimi se odmerki in ob evtanaziji. V študijah, ki trajajo en teden ali več, je treba vsaj enkrat na teden izmeriti porabo hrane. Če se preskusna kemikalija daje s pitno vodo, je treba izmeriti porabo vode ob vsaki menjavi vode in vsaj tedensko. Živali, ki kažejo neletalne znake čezmerne toksičnosti, je treba humano evtanazirati pred koncem preskusnega obdobja (11).

Izpostavljenost ciljnega tkiva

Ob ustreznih časih je treba odvzeti vzorec krvi, da se lahko preišče raven preskusnih kemikalij v plazmi, s čimer se dokaže, da je prišlo do izpostavljenosti kostnega mozga, če je to utemeljeno in če ne obstajajo drugi podatki o izpostavljenosti (glej odstavek 44).

Preparati kostnega mozga in kromosomov

Takoj po humani evtanaziji se pridobijo celice kostnega mozga iz stegnenic ali golenic živali in se nato izpostavijo hipotonični raztopini in fiksirajo. Celice v metafazi so nato nanesejo na objektna stekelca in obarvajo z uporabo uveljavljenih metod (glej (3) in (12)).

Analiza

Vse mikroskopske preparate, vključno s tistimi s pozitivnimi in negativnimi kontrolami, je treba pred analizo neodvisno označiti in naključno razdeliti, tako da oseba, ki beleži ugotovitve, ne pozna pogojev tretiranja.

Kot merilo citotoksičnosti je treba določiti mitotični indeks v vsaj 1 000 celicah na žival za vse tretirane živali (vključno s pozitivnimi kontrolami), netretirane živali negativne kontrole ali živali negativne kontrole z nosilcem/vehiklom.

Pri vsaki živali je treba analizirati vsaj 200 metafaz za strukturne kromosomske aberacije, vključno z vrzeli in brez njih (6). Če je v zbirki podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov v preskusnem laboratoriju srednja vrednost pogostosti strukturnih kromosomskih aberacij v ozadju < 1 %, je treba razmisliti o šteju dodatnih celic. Kromatidne in kromosomske aberacije je treba zabeležiti posebej in razvrstiti v podvrste (prelomi, izmenjave). S postopki, ki se uporabljajo v laboratoriju, je treba zagotoviti, da analizo kromosomskih aberacij izvajajo osebe, ki so zelo usposobljene za štetje, in da se po potrebi izvede medsebojni strokovni pregled. Ob priznavanju, da postopki pripravljanja preparatov pogosto povzročijo pretrganje dela metafaz in posledično izgubo kromosomov, število centromer v štetih celicah torej ne sme biti manjše od $2n \pm 2$, pri čemer je n haploidno število kromosomov za zadevno vrsto.

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

Podatke za posamezne živali je treba prikazati v obliki preglednic. Za vsako žival je treba oceniti mitotični indeks, število štetih metafaznih celic, število aberacij na celico v metafazi in odstotek celic s strukturnimi kromosomskimi aberacijami. Različne vrste strukturnih kromosomskih aberacij je treba navesti skupaj z njihovimi števili in pogostostjo za tretirane in kontrolne skupine. Vrzeli ter poliploidne celice in celice z endoredupliciranimi kromosomi je treba zabeležiti ločeno. O pogostosti vrzeli se poroča, vendar se tega običajno ne vključi v analizo celotne pogostosti strukturnih aberacij. Če ni dokaza o razliki v odzivu med spoloma, se lahko pri statistični analizi podatki za oba spola združijo. Sporočiti je treba tudi podatke o toksičnosti za živali in klinične znake.

Merila za sprejemljivost

Sprejemljivost preskusa je določena z naslednjimi merili:

- a) podatki o sočasni negativni kontroli se štejejo kot sprejemljivi za vključitev v zbirko podatkov laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov (glej odstavke 11 do 14);
- b) sočasne pozitivne kontrole ali kontrole za štetje morajo povzročiti odzive, skladne z odzivi iz zbirke podatkov o pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov, in statistično značilno povečanje v primerjavi z negativno kontrolo (glej odstavka 20 in 21);
- c) analizirano je ustrezno število odmerkov in celic;
- d) merila za izbor najvišjega odmerka so skladna z merili, opisanimi v odstavkih 25 do 28.

Vrednotenje in razlaga rezultatov

Pod pogojem, da so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno pozitivno, če:

- a) se vsaj pri eni od tretiranih skupin pokaže statistično značilno povečanje pogostosti celic s strukturnimi kromosomskimi aberacijami (razen vrzeli) v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;
- b) je to povečanje povezano z odmerkom pri vsaj enem času vzorčenja, kadar se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom;
- c) je kateri koli od teh rezultatov zunaj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi).

Če se pri določenem času vzorčenja prouči le najvišji odmerek, se preskusna kemikalija šteje kot jasno pozitivna, če obstaja statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo in so rezultati zunaj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi). Priporočila glede najustrežnejših statističnih metod so navedena v virih (13). Pri analizi razmerja med odmerkom in odzivom je treba analizirati vsaj tri tretirane skupine, ki prejemajo odmerke. V statističnih preskusih se kot poskusna enota uporabi žival. Pozitivni rezultati preskusa kromosomskih aberacij kažejo, da preskusna kemikalija povzroči nastanek strukturnih kromosomskih aberacij v kostnem mozgu preskušane vrste.

Pod pogojem, da so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno negativno, če se v katerem koli od proučevanih preskusnih pogojev:

- a) pri nobeni tretirani skupini ne pokaže statistično značilno povečanje pogostosti celic s strukturnimi kromosomskimi aberacijami (razen vrzeli) v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;

- b) pri katerem koli času vzorčenja ne pojavi z odmerkom povezano povečanje, če se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom;
- c) so vsi rezultati znotraj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi) ter
- d) se je pojavila izpostavljenost kostnega mozga preskusnim kemikalijam.

Priporočila glede najustreznejših statističnih metod so navedena v virih (13). Dokazi o izpostavljenosti kostnega mozga preskusni kemikaliji lahko vključujejo zmanjšanje mitotičnega indeksa ali meritve ravni preskusnih kemikalij v plazmi ali krvi. Pri intravenoznem dajanju dokaz o izpostavljenosti ni potreben. Druga možnost za dokaz izpostavljenosti kostnega mozga je uporaba podatkov ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion – absorpcija, porazdelitev, metabolizem in izločanje), pridobljenih v neodvisni študiji, ki je bila opravljena z enakim načinom izpostavljenosti in istimi vrstami. Negativni rezultati pomenijo, da preskusna kemikalija pri preskusnih pogojih ne povzroča strukturnih kromosomskih aberacij v kostnem mozgu preskušane vrste.

Preverjanje jasno pozitivnega ali jasno negativnega odziva ni potrebno.

V primerih, ko odziv ni jasno negativen ali pozitiven, in za pomoč pri opredelitvi biološke pomembnosti rezultatov (npr. šibko ali mejno povečanje), je treba podatke oceniti s strokovno presojo in/ali nadaljnjimi preiskavami zaključenih obstoječih poskusov. V nekaterih primerih je koristno, če se analizira več celic ali poskus ponovi s spremenjenimi preskusnimi pogoji.

Podatki v redkih primerih celo po izvedbi nadaljnjih preiskav ne omogočajo sklepa o tem, ali preskusna kemikalija povzroča pozitivne ali negativne rezultate, zato se zaključí, da je odziv dvoumen.

Pogostost poliploidnih in endoredupliciranih metafaz med skupnim številom metafaz je treba zabeležiti posebej. Povečanje števila poliploidnih/endoredupliciranih celic kaže na to, da ima preskusna kemikalija potencial za zaviranje mitotičnih procesov ali poteka celičnega cikla (glej odstavek 3).

Poročilo o preskusu

V poročilo o preskusu se vključijo naslednji podatki:

Povzetek

Preskusna kemikalija:

- vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;
- stabilnost preskusne kemikalije, če je znana.

Snov iz ene sestavine:

- fizični videz, topnost v vodi in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti;
- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

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

Priprava preskusne kemikalije:

- utemeljitev izbire vehikla;
- topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu/vehiklu, če je znana;
- priprava pripravkov hrane in pitne vode ali pripravkov za vdihavanje;
- analitsko določanje sestave (npr. stabilnost, homogenost, nominalne koncentracije), če so na voljo.

Preskusne živali:

- uporabljena vrsta/sev in utemeljitev izbire;
- število, starost in spol živali;
- izvor, nastanitvene razmere, prehrana itd.;
- metoda edinstvene identifikacije živali;
- pri kratkotrajnih študijah: teža posameznih živali ob začetku in koncu preskusa; pri študijah, ki trajajo dlje kot en teden: teža posameznih živali med študijo in poraba hrane. Vključiti je treba razpon, srednjo vrednost in standardni odklon telesne teže za vsako skupino.

Preskusni pogoji:

- pozitivne in negativne kontrole (z vehiklom/topilom);
- podatki iz študije za ugotavljanje območja, če je bila izvedena;
- utemeljitev izbire velikosti odmerkov;
- podrobnosti o pripravi preskusne kemikalije;
- podrobnosti o dajanju preskusne kemikalije;
- utemeljitev načina in trajanja dajanja kemikalije;
- metode za preverjanje, ali je preskusna kemikalija dosegla krvni obtok ali kostni mozeg;
- dejanski odmerek (v mg/kg telesne teže na dan), izračunan glede na koncentracijo preskusne kemikalije (v ppm) v hrani/pitni vodi in poraba hrane/pitne vode, če je ustrezno;
- podrobnosti o kakovosti hrane in vode;
- metoda za evtanazijo;
- metoda za analgezijo (če se uporablja);
- podroben opis ter utemeljitev časovnega razporeda tretiranja in vzorčenj izbir;
- metode za pripravo preparatov;
- metode za merjenje toksičnosti;
- identiteta kemikalije, ki zavira metafazo, njena koncentracija, odmerek in čas dajanja pred vzorčenjem;
- postopki za izolacijo in hrambo vzorcev;
- merila za štetje aberacij;

- število analiziranih celic v metafazi na žival in število analiziranih celic za določitev mitotičnega indeksa;
- merila za sprejemljivost študije;
- merila za obravnavanje študij kot pozitivnih, negativnih ali nedokončnih.

Rezultati:

- stanje živali pred preskusnim obdobjem in med njim, vključno z znaki toksičnosti;
- mitotični indeks, naveden za vsako žival posebej;
- vrsta in število aberacij ter celic z aberacijami, navedene za vsako žival posebej;
- skupno število aberacij na skupino s srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni;
- število celic z aberacijami na skupino s srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni;
- spremembe v ploidnosti, če so opažene, vključno s pogostostjo poliploidnih in/ali endoredupliciranih celic;
- razmerje med odmerkom in odzivom, če je mogoče;
- uporabljena statistična analiza in metoda;
- podatki, ki dokazujejo, da je prišlo do izpostavljenosti kostnega mozga;
- podatki o sočasnih negativnih kontrolah in pozitivnih kontrolah z območji, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni;
- podatki o negativnih in pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov z območji, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni in 95-odstotne kontrolne meje za porazdelitev ter obravnavano časovno obdobje in število opazovanj;
- izpolnjena merila za pozitivni ali negativni odziv.

Razprava o rezultatih

Sklepna ugotovitev

Viri

VIRI

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, št. 234, OECD, Pariz.
- (2) Adler, I. D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals, in *Mutagenicity Testing: A Practical Approach*. Venittand, S. in Parry, J. M. (eds.), IRL Press, Washington, DC, str. 275–306.
- (3) Preston, R. J. idr. (1987). Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, *Mutation Research*, zv. 189/2, str. 157–165.
- (4) Richold, M. idr. (1990). In Vivo Cytogenetics Assays, v *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised*. Kirkland, D. J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, str. 115–141.
- (5) Tice, R. R. idr. (1994). Report from the working group on the *in vivo* mammalian bone marrow chromosomal aberration test, *Mutation Research*, zv. 312/3, str. 305–312.

- (6) Adler, I. D. idr. (1998). Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, zv. 417/1, str. 19–30.
 - (7) Ryan, T. P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement, druga izdaja, John Wiley and Sons, New York.
 - (8) Hayashi, M. idr. (2011). Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, zv. 723/2, str. 87–90.
 - (9) Hayashi, M. idr. (1994). *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, zv. 312/3, str. 293–304.
 - (10) Fielder, R. J. idr. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, zv. 7/5, str. 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, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, št.°19, OECD Publishing, Pariz.
 - (12) Pacchierotti, F. in Stocchi, V. (2013). Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, Methods in Molecular Biology, št. 1044, str. 147–163.
 - (13) Lovell, D. P. idr. (1989). Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays, in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D. J. (ur.), Cambridge University Press, Cambridge, str. 184–232.
-

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Aneuploidija: je vsako odstopanje od normalnega diploidnega (ali haploidnega) števila kromosomov za en ali več kot en kromosom, vendar ne za večkratnik celotnega števila kromosomov (prim.: poliploidija).

Centromera: del kromosoma, s katerim se med delitvijo celic povežejo niti delitvenega vretena, kar omogoči urejeno gibanje hčerinskih kromosomov proti poloma hčerinskih celic.

Kemikalija: snov ali zmes.

Aberacija kromatidnega tipa: strukturna poškodba kromosoma, izražena kot prelom posameznih kromatid ali prelom in združitev med kromatidama.

Aberacija kromosomskega tipa: strukturna poškodba kromosoma, izražena kot prelom ali prelom in združitev obeh kromatid na istem mestu.

Endoreduplikacija: proces, pri katerem v jedru po podvajanju DNK v fazi S ne začne potekati mitoz, temveč takoj nastopi druga faza S. Rezultat tega so kromosomi s 4, 8, 16 ... kromatidami.

Vrzel: akromatska lezija, ki je manjša od širine ene kromatide, z zelo majhno nepravilnostjo kromatid.

Mitotični indeks: razmerje med številom celic v mitozu in skupnim številom celic v populaciji, ki je merilo statusa proliferacije navedene celične populacije.

Numerična aberacija: sprememba števila kromosomov, ki se razlikuje od normalnega števila, ki je značilno za uporabljene živali (aneuploidija).

Poliploidija: numerična kromosomska aberacija, ki vključuje spremembo števila celotnega seta kromosomov v primerjavi s spremembo števila v delu seta kromosomov (prim.: aneuploidija).

Strukturna kromosomska aberacija: sprememba v strukturi kromosoma, ki se lahko odkrije pri mikroskopskem pregledu metafaze celične delitve in je vidna v obliki delecij in fragmentov, transpozicij ali interkromosomskih translokacij.

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

Dodatek 2

ZASNOVA PRESKUSA Z VEČ DEJAVNIKI ZA OPREDELITEV RAZLIK MED SPOLOMA PRI PRESKUSU KROMOSOMSKIH ABERACIJ IN VIVO**Zasnova preskusa z več dejavniki in analiza v njenem okviru**

Pri tej zasnovi se preskusi vsaj 5 živali moškega in vsaj 5 živali ženskega spola pri vsaki koncentraciji, tako da se uporabi vsaj 40 živali (20 moškega in 20 ženskega spola ter ustrezne pozitivne kontrole).

Ta zasnova, ki je ena enostavnejših zasnov preskusa z več dejavniki, je enakovredna dvosmerni analizi variance, pri čemer sta glavna učinka spol in koncentracija. Podatki se lahko analizirajo z različnimi standardnimi statističnimi programskimi paketi, kot so SPSS, SAS, STATA, Genstat, ter z uporabo programskega jezika R.

Z analizo se variabilnost v naboru podatkov popolnoma razvrsti v variabilnost med spoloma, variabilnost med koncentracijami in variabilnost, povezano z medsebojnim vplivom med spoloma in koncentracijami. Vsak pogoj se preskusi glede na oceno variabilnosti med živalmi iz ponovljenih preskusov v skupinah živali istega spola pri isti koncentraciji. Celotne podrobnosti osnovne metodologije so na voljo v številnih standardnih statističnih učbenikih (glej vire) in pomoči uporabnikom, ki jo zagotavljajo statistični paketi.

Analiza se začne s pregledom pogojev medsebojnega vpliva „spol x koncentracija“ v preglednici z analizo variance (¹). Če ni precejšnjega medsebojnega vpliva, zagotavljajo skupne vrednosti za spola ali koncentracije veljavne statistične preskuse med koncentracijami, ki temeljijo na združenem vplivu variabilnosti znotraj skupine v preglednici z analizo variance.

Analiza se nadaljuje s popolno razvrstitvijo ocene med variabilnostjo koncentracij v kontraste, s čimer se zagotovi preskus za linearne in kvadratne kontraste odzivov med različnimi koncentracijami. Če „spol x koncentracija“ kaže znaten medsebojni vpliv, se lahko ta vpliv popolnoma razvrsti v medsebojne vplive „linearni kontrast x spol“ in „kvadratni kontrast x spol“. S temi vplivi se zagotavljajo preskusi tega, ali so odzivi na koncentracije za oba spola vzporedni ali pa so odzivi med spoloma različni.

Ocena združene variabilnosti znotraj skupine se lahko uporabi za pare preskusov v zvezi z razlikami med srednjimi vrednostmi. Te primerjave se lahko naredijo med srednjimi vrednostmi za oba spola in med srednjimi vrednostmi za različne koncentracije, kot na primer za primerjave s stopnjami v negativnih kontrolah. V primerih z znatnim medsebojnim vplivom se lahko primerjajo srednje vrednosti različnih koncentracij pri istem spolu ali srednje vrednosti obeh spolov pri isti koncentraciji.

Viri

Obstajajo številni statistični učbeniki, v katerih se razpravlja o teoriji, zasnovi, metodologiji, analizi in razlagi zasnove preskusov z več dejavniki, ki se gibljejo od najenostavnejših analiz z dvema dejavnikoma do bolj zapletenih oblik, uporabljenih v metodologiji zasnove poskusov. Naslednji seznam ni izčrpen. V nekaterih knjigah so obdelani primeri primerljivih zasnov, ki imajo v nekaterih primerih kodo za izvajanje analize z uporabo različnih programskih paketov.

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

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

Doncaster, C. P. in 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) Statistiki, ki uporabljajo pristop modeliranja, kot so splošni linearni modeli, lahko analizo začnejo na drugačen, a primerljiv način, vendar ne bodo nujno izpeljali običajne preglednice z analizo variance, ki sega v čas algoritemskih pristopov k izračunavanju statističnih podatkov, razvitih v predračunalniški dobi.

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 in Hamada, M. S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.“

(5) Poglavje B.12 dela B se nadomesti z naslednjim:

„B.12 Preskus mikronukleusov v eritrocitih sesalcev

UVOD

Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD 474 (2016). Je del sklopa preskusnih metod o genetski toksikologiji. Pripravljen je dokument OECD, ki zagotavlja jedrnatne informacije o preskušanju v zvezi z genetsko toksikologijo in pregled nedavnih sprememb teh preskusnih smernic (1).

Preskus mikronukleusov *in vivo* pri sesalcih je posebej primeren za ocenjevanje genotoksičnosti, saj so pri tem aktivni dejavniki metabolizma *in vivo*, farmakokinetike in procesi popravljanja DNK, ki prispevajo k odzivom, čeprav se lahko med posameznimi vrstami razlikujejo. Preskus *in vivo* je uporaben tudi za nadaljnjo preiskavo genotoksičnosti, odkrite s sistemom *in vitro*.

Preskus mikronukleusov *in vivo* pri sesalcih se uporablja za odkrivanje škode, ki jo preskusna kemikalija povzroči na kromosomih ali mitotičnem aparatu eritroblastov. Pri preskusu se ocenjuje nastajanje mikronukleusov v eritrocitih, vzorčenih v kostnem mozgu ali celicah periferne krvi živali, običajno glodalcev.

Namen preskusa mikronukleusov je opredeliti kemikalije, ki povzročajo citogenetske poškodbe, zaradi katerih nastanejo mikronukleusi, ki vsebujejo zaostale fragmente kromosomov ali cele kromosome.

Kadar se eritroblast kostnega mozga razvije v nezrel eritrocit (ki se včasih imenuje tudi polikromatski eritrocit ali retikulocit), se jedro izvrže; vsak nastali mikronukleus lahko ostane v citoplazmi. V teh celicah je lažje videti ali odkriti mikronukleuse, saj nimajo jedra. Povečanje pogostosti nezrelih eritrocitov z mikronukleusi pri tretiranih živalih je znak nastanka strukturnih ali numeričnih kromosomskih aberacij.

Novo nastali eritrociti z mikronukleusi se opredelijo in količinsko določijo z barvanjem, čemur sledi bodisi vizualno štetje z mikroskopom bodisi z avtomatizirano analizo. Štetje zadostnega števila nezrelih eritrocitov v periferni krvi ali kostnem mozgu odraslih živali se precej olajša z uporabo avtomatizirane platforme za štetje. Take platforme so sprejemljive alternative ročnemu ocenjevanju (2). Iz primerjalnih študij je razvidno, da lahko take metode, pri katerih so uporabljeni ustrezni kalibracijski standardi, zagotovijo boljšo ponovljivost in občutljivost v enem in več laboratorijih kot ročno štetje pod mikroskopom (3) (4). Avtomatizirani sistemi, s katerimi se lahko izmeri pogostost eritrocitov z mikronukleusi, vključujejo, niso pa omejeni na pretočne citometre (5), platforme za analizo slike (6) (7) in laserske vrstične citometre (8).

Čeprav se to običajno ne izvaja kot del preskusa, se lahko fragmenti kromosomov od celih kromosomov razlikujejo po številnih merilih. Mednje je vključena opredelitev prisotnosti ali odsotnosti kinetohora ali centromerne DNK, kar je oboje lastnost nepoškodovanih kromosomov. Če kinetohor ali centromerna DNK nista prisotna, to pomeni, da mikronukleusi vsebujejo samo fragmente kromosomov, če pa eden od njiju je, to označuje izgubo kromosomov.

Opredelitve ključnih pojmov so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI

Ciljno tkivo za genetske poškodbe v tem preskusu je kostni mozeg mladih odraslih glodalcev, saj v tem tkivu nastajajo eritrociti. Sprejemljive so tudi meritve mikronukleusov v nezrelih eritrocitih periferne krvi pri drugih sesalcih, za katere je bila dokazana ustrezna občutljivost za odkrivanje kemikalij, ki v teh celicah povzročajo strukturne in numerične kromosomske aberacije (z nastajanjem mikronukleusov v nezrelih eritrocitih), in podana znanstvena utemeljitev. Glavna končna točka je pogostost nezrelih eritrocitov z mikronukleusi. Kot končna točka pri vrstah brez močne vranične selekcije proti celicam z mikronukleusi in v primeru, ko se živali tretirajo nepretrgano v obdobju, ki presega življenjsko dobo eritrocita v uporabljenih vrstah (npr. 4 tedne ali več za miš), se lahko uporabi tudi pogostost zrelih eritrocitov periferne krvi, ki vsebujejo mikronukleuse.

Če obstajajo dokazi, da preskusne kemikalije ali njihovi metaboliti ne bodo dosegli ciljnega tkiva, ta preskus morda ni primeren.

Pred uporabo te preskusne metode za preskušanje zmesi in pridobivanje podatkov za predvideni regulativni namen bi bilo treba proučiti, ali bo zagotovila sprejemljive rezultate za navedeni namen in, če jih bo, zakaj. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni.

NAČELO PRESKUSNE METODE

Živali se primerno izpostavijo preskusni kemikaliji. Če se uporabi kostni mozeg, se živali ob primernem času po tretiranju humano evtanazirajo, nato se ekstrahira kostni mozeg ter naredijo in obarvajo preparati (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Če se uporabi periferna kri, se ta odvzame ob primernem času po tretiranju, nato se pripravijo in obarvajo preparati (12) (16) (17) (18). Pri akutnem dajanju odmerka je pomembno izbrati kostni mozeg ali čas odvzema krvi, pri katerem se lahko odkrije nastanek s tretiranjem povezanih nezrelih eritrocitov z mikronukleusi. V primeru vzorčenja periferne krvi mora preteči dovolj časa, da se ti dogodki pojavijo tudi v krvnem obtoku. Preparati se analizirajo, da se določi prisotnost mikronukleusov, in sicer z vizualizacijo z mikroskopom, analizo slike, pretočnim citometrom ali laserskim vrstičnim citometrom.

PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI LABORATORIJA

Preverjanje usposobljenosti

Preden se začne laboratorij uporabljati za rutinsko preskušanje, mora dokazati, da je sposoben ponoviti pričakovane rezultate iz objavljenih podatkov (17) (19) (20) (21) (22) za pogostost mikronukleusov z vsaj dvema kemikalijama pozitivne kontrole (vključno z blagimi odzivi, ki jih povzročijo majhni odmerki v pozitivnih kontrolah), kot so tiste iz preglednice, 1 in z združljivimi kontrolami z vehiklom/topilom (glej odstavek 26); s tem laboratorij tudi dokaže, da ima zadostne izkušnje z izvajanjem preskusa. Pri teh poskusih je treba uporabiti odmerke, pri katerih se omogočajo ponovljiva in z odmerkom povezana povečanja ter se pokažeta občutljivost in dinamično območje preskusnega sistema v zadevnem tkivu (kostni mozeg ali periferna kri) in uporabi metoda štetja, ki jo je treba uporabljati v laboratoriju. To ne velja za laboratorije, ki imajo izkušnje, tj. ki imajo na voljo zbirko podatkov iz preteklih preskusov, kot je opredeljeno v odstavkih 14 do 18.

Podatki o kontrolah iz preteklih preskusov

Med preverjanjem usposobljenosti mora laboratorij določiti:

- območje in porazdelitev pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov ter
- območje in porazdelitev negativnih kontrol iz preteklih preskusov.

Ko se podatki o porazdelitvi negativnih kontrol iz preteklih preskusov pridobivajo prvič, morajo biti sočasne negativne kontrole skladne z objavljenimi podatki o kontrolah, če ti obstajajo. Ko se k porazdelitvi kontrol iz preteklih preskusov dodaja več podatkov o preskusu, sočasne negativne kontrole po možnosti ne bi smele preseči 95-odstotne kontrolne meje za navedeno porazdelitev. Zbirka podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov mora biti statistično zanesljiva, s čimer se zagotovi, da je laboratorij sposoben oceniti porazdelitev svojih podatkov o negativnih kontrolah. Iz virov je razvidno, da je potrebnih vsaj 10 preskusov, po možnosti pa mora biti zbirka sestavljena iz vsaj 20 preskusov, izvedenih v primerljivih preskusnih pogojih. Laboratoriji morajo uporabljati metode nadzora kakovosti, kot so kontrolne karte (npr. c-karte ali „X-črta“ karte (23)), da opredelijo, kako variabilni so njihovi podatki, in pokažejo, da je metodologija v njihovem laboratoriju „pod nadzorom“. Nadaljnja priporočila o načinu oblikovanja in uporabe podatkov iz preteklih preskusov (tj. merila za vključitev podatkov med podatke iz preteklih preskusov in njihovo izključitev iz teh podatkov ter merila za sprejemljivost za zadevni poskus) so navedena v virih (24).

Kadar laboratorij med preverjanjem usposobljenosti (opisanim v odstavku 13) ne izvede zadostnega števila preskusov za določitev statistično zanesljive porazdelitve negativnih kontrol (glej odstavek 15), je sprejemljivo, da se lahko porazdelitev razvije med prvimi rutinskimi preskusi. Pri tem pristopu je treba upoštevati priporočila, navedena v virih (24), rezultati negativnih kontrol, pridobljeni pri teh poskusih, pa morajo ostati skladni z objavljenimi podatki o negativnih kontrolah.

Vsako spremembo v protokolu poskusa je treba proučiti glede na vpliv, ki ga ima na to, da pridobljeni podatki ostanejo skladni z obstoječo zbirko podatkov laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov. Novo zbirko podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov je treba ustvariti le v primeru večjih neskladnosti, kadar se s strokovno presojo oceni, da se razlikuje od prejšnje porazdelitve (glej odstavek 15). Ko se zbirka podatkov ustvarja na novo, za izvedbo dejanskega preskusa ni potrebna celotna zbirka podatkov o negativnih kontrolah, če lahko laboratorij dokaže, da vrednosti njegovih sočasnih negativnih kontrol ostajajo skladne s prejšnjo zbirko podatkov ali z ustreznimi objavljenimi podatki.

V podatke o negativnih kontrolah je treba vključiti pojav nezrelih eritrocitov z mikronukleusi za vsako žival. Sočasne negativne kontrole po možnosti ne smejo preseči 95-odstotne kontrolne meje porazdelitve iz zbirke podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov. Kadar podatki o sočasni negativni kontroli presežejo 95-odstotno kontrolno mejo, jih je sprejemljivo vključiti v porazdelitev kontrole iz preteklih preskusov, če ti podatki niso izjemni osamelci ter če obstaja dokaz, da je preskusni sistem „pod nadzorom“ (glej odstavek 15), in dokaz o odsotnosti tehničnih ali človeških napak.

OPIS METODE

Priprave

Izbira živalske vrste

Uporabiti je treba splošno uporabljane laboratorijske seve mladih zdravih odraslih živali. Uporabijo se lahko miši, podgane ali druge ustrezne vrste sesalcev. Če se uporablja periferna kri, je treba zagotoviti, da odstranjevanje vraničnih celic z mikronukleusi iz krvnega obtoka ne vpliva na odkrivanje nastalih mikronukleusov pri izbranih vrstah. To je bilo jasno prikazano za periferno kri pri miših in podganah (2). V poročilu je treba znanstveno utemeljiti uporabo drugih vrst glodalcev, ki niso podgane in miši. Če se ne uporabljajo glodalci, temveč druge vrste, je priporočljivo, da se merjenje nastalih mikronukleusov vključi v drug ustrezen preskus toksičnosti.

Pogoji nastanitve in hranjenja živali

Pri glodalcih mora biti temperatura v prostoru s poskusnimi živalmi 22 °C ($\pm 3\text{ °C}$). Čeprav mora biti relativna vlažnost vsaj 40-odstotna in po možnosti ne sme presegati 70 %, razen med čiščenjem prostora, si je treba prizadevati za 50–60-odstotno vlažnost. Osvetlitev mora biti umetna, pri čemer je zaporedje 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja običajna laboratorijska hrana z neomejeno količino pitne vode. Na izbiro hrane lahko vpliva potreba po zagotovitvi ustrezne mešanice preskusne kemikalije, kadar se daje na ta način. Glodalce je treba nastaniti v majhnih skupinah (ne več kot pet na kletko), tako da so razporejeni glede na spol in tretirano skupino, če ni pričakovati agresivnega vedenja, in sicer po možnosti v kletke s trdimi tlemi z ustrezno okoljsko obogatitvijo. Živali so lahko nastanjene posamično le, če je to znanstveno utemeljeno.

Priprava živali

Običajno se uporabljajo zdrave mlade živali (kar pri glodalcih pomeni, da so ob začetku tretiranja stare po možnosti od 6 do 10 tednov, čeprav so sprejemljive tudi nekoliko starejše živali), ki se naključno razporedijo v kontrolno in tretirano skupino. Posamezne živali se označijo z edinstvenimi oznakami s humano, čim manj invazivno metodo (npr. z namestitvijo obročkov ali trakov, z vsaditvijo mikročipa ali biometrično identifikacijo, ne pa z zarezovanjem ušesa ali prsta) ter se vsaj pet dni prilagajajo laboratorijskim pogojem. Kletke je treba razporediti tako, da so morebitni učinki zaradi njihovega položaja čim manjši. Izogibati se je treba navzkrižni kontaminaciji s pozitivno kontrolo in preskusno kemikalijo. Ob začetku študije mora biti razlika med težami živali čim manjša in ne sme presegati $\pm 20\%$ srednje vrednosti teže za vsak spol.

Priprava odmerkov

Trdne preskusne kemikalije je treba raztopiti ali suspendirati v ustreznih topilih ali vehiklih ali primešati hrani ali pitni vodi, preden se odmerijo živalim. Tekoče preskusne kemikalije se lahko odmerijo neposredno ali pa se pred odmerjanjem razredčijo. Pri izpostavljenosti z vdihavanjem se lahko preskusne kemikalije dajejo v obliki plina, pare ali trdnega/tekočega aerosola, in sicer odvisno od njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti. Uporabiti je treba sveže pripravljene preskusne kemikalije, razen če je iz podatkov o stabilnosti razvidno, da je shranjevanje sprejemljivo, in so v njih opredeljeni ustrezni pogoji shranjevanja.

Preskusni pogoji

Topilo/vehikel

Topilo/vehikel ne sme imeti toksičnih učinkov pri uporabljenih odmerkih in ne sme biti sposoben kemično reagirati s preskusnimi kemikalijami. Če se uporabijo druga, manj znana topila/vehikli, je treba njihovo uporabo podpreti z referenčnimi podatki, ki dokazujejo njihovo združljivost. Priporočljivo je, da se, kadar koli je to mogoče, najprej razmisli o uporabi vodnega topila/vehikla. Primeri pogosto uporabljenih, združljivih topil/vehiklov so voda, fiziološka raztopina, raztopina metilceluloze, raztopina natrijeve soli karboksimetil celuloze, oljčno olje ali koruzno olje. Če ni podatkov iz preteklih preskusov ali objavljenih podatkov, iz katerih bi bilo razvidno, da izbrano neobičajno topilo/vehikel ne povzroča nastanka mikronukleusov ali drugih škodljivih učinkov, je treba izvesti začetno študijo, da se dokaže sprejemljivost kontrol s topilom/vehiklom.

Kontrole

Pozitivne kontrole

V vsak preskus je treba običajno vključiti skupino živali, tretiranih s kemikalijo za pozitivno kontrolo. To se lahko odpravi, ko preskusni laboratorij dokaže svojo usposobljenost za izvajanje preskusov in določi območje pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov. Če sočasna pozitivna kontrolna skupina ni vključena, je treba v vsak poskus vključiti kontrole za štetje (fiksirane in nebarvane mikroskopske preparate ali vzorce celične suspenzije, kar je ustrezno za metodo štetja). Ti se lahko pridobijo tako, da se pri študiji v štetje vključijo ustrezni referenčni vzorci, pridobljeni in shranjeni v okviru ločenega poskusa s pozitivnimi kontrolami, ki se redno izvaja (npr. vsakih 6 do 18 mesecev); na primer med preverjanjem usposobljenosti in po tem redno, če je to potrebno.

Kemikalije za pozitivno kontrolo morajo zanesljivo povzročiti zaznavno spontano povečanje pogostosti mikronukleusov. Pri ročnem štetju z mikroskopijo je treba odmerke pozitivnih kontrol izbrati tako, da so učinki jasni, vendar osebi, ki ugotovitve beleži, ne razkrijejo takoj identitete označenih mikroskopskih preparatov. Sprejemljivo je, da se odmerki v pozitivno kontrolo dajejo na način, ki ni enak kot pri preskusni kemikaliji, in da se pri tem uporabi drugačen časovni raspored tretiranja ter se vzorčenje opravi le enkrat. Poleg tega se lahko, če je ustrezno, za pozitivno kontrolo uporabijo kemikalije, ki spadajo v isto skupino nevarnosti kot preskusna kemikalija. Primeri kemikalij za pozitivno kontrolo so navedeni v preglednici 1.

Preglednica 1

Primeri kemikalij za pozitivno kontrolo

Kemikalije in št. CAS
etil metansulfonat [št. CAS: 62-50-0]
metil metansulfonat [št. CAS: 66-27-3]
etilnitrozourea [št. CAS: 759-73-9]
mitomicin C [št. CAS: 50-07-7]
ciklofosamid (monohidrat) [št. CAS: 50-18-0 (št. CAS: 6055-19-2)]
trietilenmelamin [št. CAS: 51-18-3]
kolhicin [št. CAS: 64-86-8] ali vinblastin [št. CAS: 865-21-4] – kot anevgena

Negativne kontrole

V vsak čas vzorčenja je treba vključiti negativno kontrolno skupino živali, ki jo je treba sicer obravnavati enako kot tretirane skupine, vendar se je ne sme tretirati s preskusno kemikalijo. Če se pri dajanju preskusne kemikalije uporablja topilo/vehikel, ga mora prejeti tudi kontrolna skupina. Toda če sta iz podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov pri vsakem času vzorčenja za preskusni laboratorij razvidni konsistentna variabilnost med posameznimi živalmi in pogostost celic z mikronukleusi, potem za negativno kontrolo zadostuje le eno samo vzorčenje. Če se za negativne kontrole uporablja eno samo vzorčenje, mora biti to prvi čas vzorčenja, uporabljen v študiji.

Če se uporablja periferna kri, je namesto sočasne negativne kontrole sprejemljiv vzorec, vzet pred tretiranjem, kadar so podatki, ki iz tega izhajajo, skladni z zbirko podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov za preskusni laboratorij. Za podgane se je pokazalo, da ima vzorčenje majhnih količin (npr. pod 100 µl na dan) pred tretiranjem minimalen učinek na pogostost mikronukleusov v ozadju (25).

POSTOPEK

Število in spol živali

Na splošno je odziv mikronukleusov pri živalih moškega in ženskega spola podoben, zato se lahko študije izvajajo na živalih enega ali drugega spola (26). Če se pri podatkih pokažejo pomembne razlike med moškim in ženskim spolom (npr. razlike v sistemske toksičnosti, metabolizmu, biološki razpoložljivosti, toksičnosti za kostni mozeg itd., vključno na primer v študiji za ugotavljanje območja), je treba spodbujati uporabo obeh spolov. V takem primeru je študijo primerno izvajati na živalih obeh spolov, npr. kot del toksikološke študije s ponavljajočim odmerkom. V primeru uporabe obeh spolov je primerno uporabiti zasnovo preskusa z več dejavniki. Podrobnosti o tem, kako analizirati podatke z uporabo te zasnove, so navedene v Dodatku 2.

Ob začetku študije je treba določiti skupine, v katerih je vsaj 5 živali enega spola ali vsakega od spolov, če se uporabljata oba, ki jih je mogoče analizirati, na skupino. Kadar bi bila lahko izpostavljenost ljudi kemikalijam omejena na en spol, na primer pri nekaterih farmacevtskih izdelkih, je treba preskus opraviti na živalih ustreznega spola. Praviloma je za študijo kostnega mozga, izvedeno v skladu s parametri iz odstavka 37 s tremi skupinami, ki prejemajo odmerke, ter sočasno negativno in pozitivno kontrolo (pri čemer je vsaka skupina sestavljena iz vsaj petih živali enega spola), potrebnih od 25 do 35 živali.

Velikost odmerkov

Če se izvede predhodna študija za določanje območja, ker ustrezni podatki, ki bi bili v pomoč pri izbiri odmerkov, niso na voljo, jo je treba izvesti v istem laboratoriju ter pri tem uporabiti iste vrste, sev, spol in režim tretiranja kot v glavni študiji (27). S študijo je treba določiti največji tolerančni odmerek (MTD), ki je opredeljen kot največji odmerek, ki ga je mogoče prenesti, ne da bi se pri tem pokazala toksičnost, ki bi v povezavi z obdobjem trajanja študije slednjo omejevala (na primer s povzročitvijo upočasnitve pridobivanja telesne teže ali citotoksičnosti za hematopoetski sistem, ne pa smrti ali znakov bolečine ali trpljenja, zaradi katerih je potrebna humana evtanazija (28)).

Največji odmerek se lahko opredeli tudi kot odmerek, ki povzroči toksičnost za kostni mozeg (npr. zmanjšanje deleža nezrelih eritrocitov med vsemi eritrociti v kostnem mozgu ali periferni krvi za več kot 50 %, vendar ne za manj kot 20 % kontrolne vrednosti). Vendar se pri analiziranju CD71-pozitivnih celic v perifernem krvnem obtoku (npr. s pretočno citometrijo) ta zelo mlada frakcija nezrelih eritrocitov hitreje odziva na toksične učinke kot večja RNK-pozitivna kohorta nezrelih eritrocitov. Zato je lahko pri proučevanju frakcije CD71-pozitivnih nezrelih eritrocitov z zasnovami akutne izpostavljenosti vidna višja očitna toksičnost v primerjavi s tistimi, pri katerih se nezreli eritrociti opredelijo na podlagi vsebnosti RNK. Kadar tretiranje pri poskusih traja pet dni ali manj, se zato lahko najvišja velikost odmerka preskusnih kemikalij, ki povzroča toksičnost, opredeli kot odmerek, ki povzroča statistično značilno zmanjšanje deleža CD71-pozitivnih nezrelih eritrocitov med vsemi eritrociti, vendar ne na manj kot 5 % vrednosti v kontroli (29).

Kemikalije, ki kažejo nasičenost toksikokinetičnih lastnosti ali povzročajo procese razstrupljanja, zaradi katerih se lahko po dolgotrajnem tretiranju zmanjša izpostavljenost, so lahko izjeme pri merilih za določanje odmerkov in jih je treba oceniti za vsak primer posebej.

Da se pridobijo informacije o odzivu na odmerek, je treba v popolno študijo vključiti skupino negativne kontrole in vsaj tri velikosti odmerkov, ki so običajno ločeni s faktorjem 2, vendar ne več kot 4. Če preskusna kemikalija v študiji za ugotavljanje območja ali na podlagi obstoječih podatkov ne povzroča toksičnosti, je največji odmerek za 14- ali večdnevno obdobje dajanja kemikalije 1 000 mg/kg telesne teže na dan, za manj kot 14-dnevno obdobje dajanja kemikalije pa 2 000 mg/kg telesne teže na dan. Če pa preskusna kemikalija povzroča toksičnost, mora biti največji tolerančni odmerek najvišji dani odmerek, v uporabljene velikosti odmerkov pa je treba po možnosti zajeti razpon od največjega odmerka do odmerka, ki povzroča malo ali nič toksičnosti. Kadar se toksičnost za ciljno tkivo (kostni mozeg) opazi pri vseh preskušanih velikostih odmerkov, je priporočljiva dodatna študija pri netoksičnih odmerkih. Pri študijah, namenjenih celovitejši opredelitvi kvantitativnih informacij o razmerju med odmerkom in odzivom, so morda potrebne dodatne skupine, ki prejemajo odmerke. Za določene vrste preskusnih kemikalij (npr. zdravila za uporabo v humani medicini), za katere veljajo posebne zahteve, se lahko te meje razlikujejo.

Mejni preskus

Če poskusi za ugotavljanje območja odmerka ali obstoječi podatki iz povezanih živalskih sevov kažejo, da režim tretiranja z vsaj mejnim odmerkom (opisan v nadaljevanju) ne povzroči vidnih toksičnih učinkov (tudi brez upočasnitve proliferacije kostnega mozga ali drugih dokazov o citotoksičnosti za ciljno tkivo), ter če genotoksičnost na podlagi *in vitro* študij genotoksičnosti ali podatkov o strukturno sorodnih kemikalijah ni pričakovana, ni potrebna popolna študija z uporabo treh velikosti odmerkov, če se dokaže, da preskusne kemikalije dosežejo ciljno tkivo (kostni mozeg). V takih primerih morda zadostuje že ena velikost odmerka pri mejnem odmerku. Kadar se kemikalija daje 14 dni ali več, je mejni odmerek 1 000 mg/kg telesne teže na dan. Pri obdobju odmerjanja, krajšem od 14 dni, je mejni odmerek 2 000 mg/kg telesne teže na dan.

Dajanje odmerkov

Pri načrtovanju preskusa je treba upoštevati predvideni način izpostavljenosti pri ljudeh. Zato se lahko ob ustrezni utemeljitvi izberejo načini izpostavljenosti, kot so s prehrano, pitno vodo, topično podkožno, intravenozno, oralno (z gavažo), z vdihavanjem, intratrahealno ali z vsadkom. V vsakem primeru je treba način izpostavljenosti izbrati tako, da se zagotovi ustrezna izpostavljenost ciljnih tkiv. Dajanje z intraperitonealno injekcijo v splošnem ni priporočljivo, saj to ni predvideni način izpostavljenosti pri ljudeh, in se lahko uporabi samo na podlagi posebne znanstvene utemeljitve. Če je preskusna kemikalija primešana hrani ali pitni vodi, zlasti v primeru enega samega odmerka, je treba paziti, da med zaužitjem hrane in vode ter vzorčenjem preteče dovolj časa, da se lahko odkrijejo učinki (glej odstavek 37). Največja količina tekočine, ki se lahko da naenkrat z gavažo ali injekcijo, je odvisna od velikosti poskusne živali. Količina običajno ne sme presegati 1 ml na 100 g telesne teže, razen pri vodnih raztopinah, pri katerih se lahko uporabi največ 2 ml na 100 g telesne teže. Uporabo večjih količin je treba utemeljiti. Razen pri dražilnih ali jedkih preskusnih kemikalijah, ki pri višjih koncentracijah običajno povzročajo močnejše učinke, je treba variabilnost preskusne količine s prilagajanjem koncentracije obdržati na čim nižji ravni, da se zagotovi konstanten volumen glede na telesno težo pri vseh odmerkih.

Časovni razpored tretiranja

Po možnosti se izvedeta 2 tretiranja ali več s preskusno kemikalijo, ki se daje v 24-urnih intervalih, zlasti kadar je ta preskus vključen v druge študije toksičnosti. Druga možnost je dajanje posamičnih odmerkov, če je to znanstveno utemeljeno (npr. če je za preskusne kemikalije znano, da zavirajo celični cikel). Preskusne kemikalije se lahko dajejo tudi v razdeljenem odmerku, kar pomeni dva ali več odmerkov v istem dnevu na največ 2 do 3 ure, s čimer se olajša dajanje velike količine kemikalije. V teh okoliščinah ali v primeru dajanja preskusne kemikalije z vdihavanjem je treba čas vzorčenja načrtovati glede na čas zadnjega odmerka ali konca izpostavljenosti.

Preskus na miših ali podganah se lahko izvede na enega od naslednjih treh načinov:

- a. Živali se s preskusno kemikalijo tretirajo enkrat. Vzorci kostnega mozga se odvzamejo najmanj dvakrat (iz neodvisnih skupin živali), in sicer vsaj 24 ur in najpozneje 48 ur po tretiranju, z ustreznimi intervali med vzorci, razen če je znano, da ima kemikalija izjemno dolg razpolovni čas. Vzorčenje, izvedeno prej kot 24 ur po tretiranju, je treba utemeljiti. Vzorci periferne krvi se odvzamejo vsaj dvakrat (iz iste skupine živali), in sicer vsaj 36 ur in najpozneje 72 ur po tretiranju, z ustreznimi intervali med vzorčenji. Pri prvem času vzorčenja je treba tretirati vse skupine, ki prejemajo odmerke, in vzeti vzorce za analizo; pri poznejših časih vzorčenja pa je treba dati le najvišje odmerke. Če se pri enem času vzorčenja odkrije pozitiven odziv, dodatno vzorčenje ni potrebno, razen če so potrebne kvantitativne informacije o razmerju med odmerkom in odzivom. Opisani odvzem celic je posledica kinetike pojava in izginjanja mikronukleusov v teh dveh tkivnih prostorih.
- b. Pri dveh dnevni odmerkah (kar pomeni dva odmerka na 24 ur) je treba vzorce kostnega mozga odvzeti enkrat med 18 in 24 ur po zadnjem tretiranju, vzorce periferne krvi pa enkrat med 36 in 48 ur po zadnjem tretiranju (30). Opisani odvzem celic je posledica kinetike pojava in izginjanja mikronukleusov v teh dveh tkivnih prostorih.
- c. Pri treh ali več dnevni odmerkah (kar pomeni tri ali več odmerkov na približno 24 ur) je treba vzorce kostnega mozga odvzeti najpozneje 24 ur po zadnjem tretiranju, vzorce periferne krvi pa najpozneje 40 ur po zadnjem tretiranju (31). V to možnost tretiranja je vključena kombinacija kometnega preskusa (kar pomeni vzorčenje 2 do 6 ur po zadnjem tretiranju) s preskusom mikronukleusov in vključitev preskusa mikronukleusov v študijo toksičnosti s ponavljajočimi se odmerki. Iz zbranih podatkov je bilo razvidno, da je v teh širših časovnih okvirih pri 3 ali več odmerkah kemikalije opaziti nastajanje mikronukleusov (15).

Uporabljajo se lahko tudi drugi režimi odmerjanja in vzorčenja, če so ustrezni in znanstveno utemeljeni, da se olajša povezovanje z drugimi študijami toksičnosti.

Opazovanja

Vsaj enkrat na dan je treba opraviti splošna klinična opazovanja preskusnih živali in zabeležiti klinične znake, po možnosti vsak dan ob istem času in ob upoštevanju obdobja največje intenzivnosti pričakovanih učinkov po vnosu odmerka. Vse živali je treba med obdobjem odmerjanja vsaj dvakrat na dan opazovati za odkrivanje obolevnosti in smrtnosti. Vse živali je treba stehati ob začetku študije, vsaj enkrat na teden med študijami s ponavljajočimi se odmerki in ob evtanaziji. V študijah, ki trajajo en teden ali več, je treba vsaj enkrat na teden izmeriti porabo hrane. Če se preskusna kemikalija daje s pitno vodo, je treba izmeriti porabo vode ob vsaki menjavi vode in vsaj tedensko. Živali, ki kažejo neletalne znake čezmerne toksičnosti, je treba humano evtanazirati pred koncem preskusnega obdobja (28). Pod določenimi pogoji se lahko spremlja telesna temperatura živali, saj sta v nastajanje napačnih rezultatov vključeni hiper- in hipotermija, ki ju povzroči tretiranje (32) (33) (34).

Izpostavljenost ciljnega tkiva

Ob ustreznih časih je treba odvzeti vzorec krvi, da se lahko preišče raven preskusnih kemikalij v plazmi, s čimer se dokaže, da je prišlo do izpostavljenosti kostnega mozga, če je to utemeljeno in če ne obstajajo drugi podatki o izpostavljenosti (glej odstavek 48).

Priprava kostnega mozga/krvi

Takoj po humani evtanaziji se celice kostnega mozga običajno pridobijo iz stegnenic ali golenic živali. Celice se običajno odstranijo, preparirajo in obarvajo z uporabo uveljavljenih metod. Majhne količine periferne krvi se lahko v skladu z ustreznimi standardi dobrobiti živali pridobijo z metodo, ki omogoča preživetje poskusne živali, kot je s puščanjem krvi iz repne vene ali druge primerne žile, ali pa s punkcijo srca ali vzorčenjem iz velike žile pri evtanaziji živali. Pri kostnem mozgu ali eritrocitih iz periferne krvi se lahko celice glede na metodo analize takoj supravitalno obarvajo (16) (17) (18) ali pa se pripravijo razmazi, ki se nato obarvajo za mikroskopijo ali fiksirajo in ustrezno obarvajo za analizo s pretočnim citometrom. Uporaba DNK-specifičnega barvila [npr. akridin oranž (35) ali Hoechst 33258 plus pyronin-Y (36)] lahko prepreči nastajanje nekaterih artefaktov, povezanih z uporabo barvila, ki ni DNK-specifično. Kljub tej prednosti pa se lahko uporabijo običajna barvila (npr. Giemsa za mikroskopsko analizo). Lahko se uporabijo tudi dodatni sistemi [npr. celulozne kolone za odstranitev celic z jedri (37) (38)], če je bilo dokazano, da so ti sistemi združljivi s pripravo vzorcev v laboratoriju.

Če se uporabljajo te metode, se lahko za opredelitev narave mikronukleusov (kromosom/fragment kromosoma) uporabijo antikinetohorna protitelesa (39), fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH) s pancentromernimi DNK-sondami (40) ali označevanje začetnih oligonukleotidov *in situ* s premazi, specifičnimi za centromere, skupaj z ustreznim nasprotnim barvanjem DNK (41), zato da se določi, ali mehanizem nastajanja mikronukleusov povzroča klastogena in/ali anevgena dejavnost. Za razlikovanje med anevgeni in klastogeni se lahko uporabijo druge metode, če so se izkazale za učinkovite.

Analiza (ročna in avtomatizirana)

Vse mikroskopske preparate ali vzorce, vključno s tistimi s pozitivnimi in negativnimi kontrolami, je treba pred analizo neodvisno označiti in naključno razdeliti, tako da oseba, ki beleži ugotovitve, ne pozna pogojev tretiranja; če se uporablja avtomatiziran sistem štetja, ki se ne opira na vizualne preglede in nanj izvajalec ne more vplivati, tako označevanje ni potrebno. Za vsako žival se določi delež nezrelih eritrocitov med vsemi (nezrelimi + zreli) eritrociti, tako da se prešteje skupno vsaj 500 eritrocitov pri kostnem mozgu in 2 000 eritrocitov pri periferni krvi (42). V določanje pojavnosti nezrelih eritrocitov z mikronukleusi je treba vključiti vsaj 4 000 nezrelih eritrocitov na žival (43). Če je v zbirki podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov v preskusnem laboratoriju srednja vrednost pogostosti nezrelih eritrocitov z mikronukleusi v ozadju < 0,1 %, je treba razmisliti o štetju dodatnih celic. Pri analiziranju vzorcev delež nezrelih eritrocitov med vsemi eritrociti v tretiranih živalih pri štetju z mikroskopijo ne sme biti nižji od 20 % deleža v kontroli z vehiklom/topilom, pri štetju CD71-pozitivnih nezrelih eritrocitov s citometričnimi metodami pa nižji od približno 5 % deleža v kontroli z vehiklom/topilom (glej odstavek 31) (29). Če je na primer pri preskusu kostnega mozga pri štetju z mikroskopijo kontrolni delež nezrelih eritrocitov v kostnem mozgu 50 %, je zgornja meja toksičnosti enaka 10 % nezrelih eritrocitov.

Ker vranica podgane zadrži in uniči eritrocite z mikronukleusi, je za vzdrževanje visoke občutljivosti poskusa pri analiziranju periferne krvi podgane analizo nezrelih eritrocitov z mikronukleusi bolje omejiti na najmlajšo frakcijo. Pri metodah za avtomatizirano analizo je mogoče te najbolj nezrele eritrocite opredeliti na podlagi njihove visoke vsebnosti RNK ali visoke ravni receptorjev transferina (CD71-pozitivni), izraženih na njihovi površini (31). Vendar je neposredna primerjava različnih metod obarvanja pokazala, da je zadovoljive rezultate mogoče dobiti z različnimi metodami, vključno z običajnim barvanjem z barvilom akridin oranž (3) (4).

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

Podatke za posamezne živali je treba prikazati v obliki preglednic. Za vsako analizirano žival posebej je treba navesti število štetih nezrelih eritrocitov, število nezrelih eritrocitov z mikronukleusi in število nezrelih eritrocitov med vsemi eritrociti. Kadar se miši tretirajo neprekinjeno 4 tedne ali več, je treba navesti tudi podatke o številu in deležu zrelih eritrocitov z mikronukleusi, če so zbrani. Sporočiti je treba tudi podatke o toksičnosti za živali in klinične znake.

Merila za sprejemljivost

Sprejemljivost preskusa je določena z naslednjimi merili:

- a. podatki o sočasni negativni kontroli se štejejo kot sprejemljivi za vključitev v zbirko podatkov laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov (glej odstavke 15 do 18);
- b. sočasne pozitivne kontrole ali kontrole za štetje morajo povzročiti odzive, skladne z odzivi iz zbirke podatkov o pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov, in statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo (glej odstavka 24 in 25);
- c. analizirano je ustrezno število odmerkov in celic;
- d. merila za izbor najvišjega odmerka so skladna z merili, opisanimi v odstavkih 30 do 33.

Vrednotenje in razlaga rezultatov

Pod pogojem, da so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno pozitivno, če:

- a. se pri vsaj eni od tretiranih skupin pokaže statistično značilno povečanje pogostosti nezrelih eritrocitov z mikronukleusi v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;
- b. je to povečanje povezano z odmerkom pri vsaj enem času vzorčenja, kadar se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom;
- c. je kateri koli od teh rezultatov zunaj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi).

Če se pri določenem času vzorčenja prouči le najvišji odmerek, se preskusna kemikalija šteje kot jasno pozitivna, če obstaja statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo in so rezultati zunaj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi). Priporočila glede najustrežnejših statističnih metod so navedena v virih (44) (45) (46) (47). Pri analizi razmerja med odmerkom in odzivom je treba analizirati vsaj tri tretirane skupine, ki prejemajo odmerke. V statističnih preskusih se kot poskusna enota uporabi žival. Pozitivni rezultati pri preskusu mikronukleusov kažejo, da preskusna kemikalija povzroča nastanek mikronukleusov, ki so posledica poškodb kromosomov ali mitotičnega aparata v eritroblastih preskušane vrste. Če je preskus izveden za odkrivanje centromer v mikronukleusih, je preskusna kemikalija, ki povzroča nastanek mikronukleusov s centromerami (centromerne DNK ali kinetohora, ki so znak izgube celih kromosomov), dokaz, da je preskusna kemikalija aneugen.

Pod pogojem, da so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno negativno, če se v katerem koli od proučevanih preskusnih pogojev:

- a. pri nobeni tretirani skupini ne pokaže statistično značilno povečanje pogostosti nezrelih eritrocitov z mikronukleusi v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;

- b. pri katerem koli času vzorčenja ne pojavi z odmerkom povezano povečanje, če se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom;
- c. so vsi rezultati znotraj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi) ter
- d. se je pojavila izpostavljenost kostnega mozga preskusnim kemikalijam.

Priporočila glede najustrežnejših statističnih metod so navedena v virih (44) (45) (46) (47). Dokazi o izpostavljenosti kostnega mozga preskusni kemikaliji lahko vključujejo zmanjšanje razmerja nezrelih eritrocitov ali meritve ravni preskusne kemikalije v plazmi ali krvi. Pri intravenoznem dajanju dokaz o izpostavljenosti ni potreben. Druga možnost za dokaz izpostavljenosti kostnega mozga je uporaba podatkov ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion – absorpcija, porazdelitev, metabolizem in izločanje), pridobljenih v neodvisni študiji, ki je bila opravljena z enakim načinom izpostavljenosti in istimi vrstami. Negativni rezultati pomenijo, da preskusna kemikalija pri preskusnih pogojih ne povzroča nastanka mikronukleusov v nezrelih eritrocitih preskušane vrste.

Preverjanje jasno pozitivnega ali jasno negativnega odziva ni potrebno.

V primerih, ko odziv ni jasno negativen ali pozitiven, in za pomoč pri opredelitvi biološke pomembnosti rezultatov (npr. šibko ali mejno povečanje), je treba podatke oceniti s strokovno presojo in/ali nadaljnjimi preiskavami zaključenih obstoječih poskusov. V nekaterih primerih je koristno, če se analizira več celic ali poskus ponovi s spremenjenimi preskusnimi pogoji.

Podatki v redkih primerih celo po izvedbi nadaljnjih preiskav ne omogočajo sklepa o tem, ali preskusna kemikalija povzroča pozitivne ali negativne rezultate, zato se zaključí, da je odziv dvoumen.

Poročilo o preskusu

V poročilo o preskusu se vključijo naslednji podatki:

Povzetek

Preskusna kemikalija:

- vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;
- stabilnost preskusne kemikalije, če je znana.

Snov iz ene sestavine:

- fizični videz, topnost v vodi in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti;
- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

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

Priprava preskusne kemikalije:

- utemeljitev izbire vehikla;
- topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu/vehiklu, če je znana;

- priprava pripravkov hrane in pitne vode ali pripravkov za vdihavanje;
- analitsko določanje sestave (npr. stabilnost, homogenost, nominalne koncentracije), če je na voljo.

Preskusne živali:

- uporabljena vrsta/sev in utemeljitev izbire;
- število, starost in spol živali;
- izvor, nastanitvene razmere, prehrana itd.;
- metoda edinstvene identifikacije živali;
- pri kratkotrajnih študijah: teža posameznih živali ob začetku in koncu preskusa; pri študijah, ki trajajo dlje kot en teden: teža posameznih živali med študijo in poraba hrane. Vključiti je treba razpon, srednjo vrednost in standardni odklon telesne teže za vsako skupino.

Preskusni pogoji:

- podatki o pozitivnih in negativnih kontrolah (z vehiklom/topilom);
- podatki iz študije za ugotavljanje območja, če je bila izvedena;
- utemeljitev izbire velikosti odmerkov;
- podrobnosti o pripravi preskusne kemikalije;
- podrobnosti o dajanju preskusne kemikalije;
- utemeljitev načina in trajanja dajanja kemikalije;
- metode za preverjanje, ali je preskusna kemikalija dosegla krvni obtok ali ciljno tkivo;
- dejanski odmerek (v mg/kg telesne teže na dan), izračunan glede na koncentracijo preskusne kemikalije (v ppm) v hrani/pitni vodi in poraba hrane/pitne vode, če je ustrezno;
- podrobnosti o kakovosti hrane in vode;
- metoda za evtanazijo;
- metoda za analgezijo (če se uporablja);
- podroben opis časovnega razporeda tretiranj in vzorčenj ter utemeljitev izbir;
- metode za pripravo preparatov;
- postopki za izolacijo in hrambo vzorcev;
- metode za merjenje toksičnosti;
- merila za štetje nezrelih eritrocitov z mikronukleusi;
- število analiziranih celic na žival pri določanju pogostosti nezrelih eritrocitov z mikronukleusi in za določanje deleža nezrelih eritrocitov glede na zrele;
- merila za sprejemljivost študije;
- metode, kot so uporaba antikinetohornih protiteles ali centromernih DNK-sond, da se ugotovi, ali mikronukleusi vsebujejo cele kromosome ali njihove fragmente, če je ustrezno.

Rezultati:

- stanje živali pred preskusnim obdobjem in med njim, vključno z znaki toksičnosti;
- delež nezrelih eritrocitov med vsemi eritrociti;
- število nezrelih eritrocitov z mikronukleusi, navedeno za vsako žival posebej;
- srednja vrednost ± standardni odklon nezrelih eritrocitov z mikronukleusi na skupino;
- razmerje med odmerkom in odzivom, če je mogoče;
- uporabljene statistične analize in metode;
- podatki o sočasnih negativnih in pozitivnih kontrolah z območji, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni;
- podatki o negativnih in pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov z območji, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni in 95-odstotne kontrolne meje za porazdelitev ter obravnavano časovno obdobje in število opazovanj;
- podatki, ki dokazujejo, da je prišlo do izpostavljenosti kostnega mozga;
- podatki, s katerimi se ugotovi, ali mikronukleusi vsebujejo cele kromosome ali njihove fragmente, če je ustrezno;
- izpolnjena merila za pozitivni ali negativni odziv.

*Razprava o rezultatih**Sklepna ugotovitev**Viri*

VIRI

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, št. 234, OECD, Pariz.
- (2) Hayashi, M. idr. (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*, zv. 627/1, str. 10–30.
- (3) MacGregor, J. T. idr. (2006). Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat, *Toxicology Sciences*, zv. 94/1, str. 92–107.
- (4) Dertinger, S. D. idr. (2006). Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring, *Toxicological Sciences*, zv. 94/1, str. 83–91.
- (5) Dertinger, S. D. idr. (2011). Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing *in vivo* cytogenetic damage, *Mutagenesis*, zv. 26/1, str. 139–145.
- (6) Parton, J. W., Hoffman, W. P. in Garriott, M. L. (1996). Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system, *Mutation Research*, zv. 370/1, str. 65–73.
- (7) Asano, N. idr. (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*, zv. 404/1–2, str. 149–154.

- (8) Styles, J. A. idr. (2001). Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, *Cytometry*, zv. 44/2, str. 153–155.
- (9) Heddle, J. A. (1973). A rapid *in vivo* test for chromosomal damage, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, zv. 18/2, str. 187–190.
- (10) Schmid, W. (1975). The micronucleus test, *Mutation Research*, zv. 31/1, str. 9–15.
- (11) Heddle, J. A. idr. (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, zv. 123/1, str. 61–118.
- (12) Mavournin, K. H. idr. (1990). The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, zv. 239/1, str. 29–80.
- (13) MacGregor, J. T. idr. (1983). Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, *Developments in Toxicology Environmental Science*, zv. 11, str. 555–558.
- (14) MacGregor, J. T. idr. (1987). Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, zv. 189/2, str. 103–112.
- (15) MacGregor, J. T. idr. (1990). The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, *Fundamental and Applied Toxicology*, zv. 14/3, str. 513–522.
- (16) Hayashi, M. idr. (1990). The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, zv. 245/4, str. 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*, zv. 278/2–3, str. 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*, zv. 10/3, str. 153–159.
- (19) Salamone, M. F. in Mavournin, K. H. (1994). Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 23/4, str. 239–273.
- (20) Krishna, G., Urda, G. in Paulissen, J. (2000). Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, zv. 453/1, str. 45–50.
- (21) Hayes, J. idr. (2009). The rat bone marrow micronucleus test—study design and statistical power, *Mutagenesis*, zv. 24/5, str. 419–424.
- (22) Wakata, A. idr. (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*, zv. 32/1, str. 84–100.
- (23) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*, druga izdaja, John Wiley and Sons, New York.

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

-
- (41) Russo, A. (2002). PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage, *American Journal of Medical Genetics*, zv. 107/2, str. 99–104.
- (42) Gollapudi, B. B. in McFadden, L.G. (1995). Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Research*, zv. 347/2, str. 97–99.
- (43) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, št. 198, OECD Publishing, Pariz.
- (44) Richold, M. idr. (1990). In Vivo Cytogenetics Assays, v Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Kirkland, D. J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, str. 115–141.
- (45) Lovell, D. P. idr. (1989). Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays, in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, str. 184–232.
- (46) Hayashi, M. idr. (1994). Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, *Environmental Health Perspectives*, zv. 102/Dop. 1, str. 49–52.
- (47) Kim, B. S., Cho, M. in Kim, H. J. (2000). Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, zv. 469/2, str. 233–241.
-

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Centromera: del kromosoma, s katerim se med delitvijo celic povežejo niti delitvenega vretena, kar omogoči urejeno gibanje hčerinskih kromosomov proti poloma hčerinskih celic.

Kemikalija: snov ali zmes.

Eritroblast: zgodnja stopnja razvoja eritrocita, takoj pred nezrelim eritrocitom, v kateri celica še vedno vsebuje jedro.

Kinetohor: beljakovinska struktura, ki nastane na centromeri evkariotskih celic in povezuje kromosom mikrotubulnimi polimeri iz mitotskega vretena med mitozo in mejozo ter deluje med delitvijo celic, da loči sestrške kromatide.

Mikronukleusi: majhna jedra, ki se nahajajo poleg glavnega jedra celic in so od njega ločena ter nastanejo med telofazo mitoze (mejoze) iz zaostalih fragmentov kromosomov ali celih kromosomov.

Normokromatski ali zrel eritrocit: popolnoma zrel eritrocit, ki je izgubil ostanek RNK, ki ostane po enukleaciji (izločitvi jedra), in/ali ostale kratkožive celične označevalce, ki značilno izginejo po enukleaciji po končni delitvi eritroblasta.

Polikromatski ali nezrel eritrocit: novonastali eritrocit na vmesni stopnji razvoja, ki se zaradi prisotnosti ostanka RNK v novonastalih celicah obarva z modrimi in rdečimi sestavinami pri klasični tehniki barvanja krvnih razmazov, kot je barvanje po Wright-Giemsu. Take novonastale celice so približno enake kot retikulociti, ki postanejo vidni z uporabo supravitalnega obarvanja, zaradi katerega se ostanek RNK nakopiči v retikulumu. Za določanje novonastalih rdečih krvničk se pogosto uporabljajo druge metode, vključno z monokromatskim barvanjem RNK s fluorescentnimi barvili ali označevanjem s kratkoživimi površinskimi označevalci, kot je CD71 s fluorescentnimi protitelesi. Polikromatski eritrociti, retikulociti in CD71-pozitivni eritrociti so nezreli eritrociti, čeprav ima vsak od njih nekoliko drugačno razdelitev po starosti celice.

Retikulocit: novonastali eritrocit, obarvan s supravitalnim barvilom, zaradi katerega se ostanek celične RNK nakopiči v značilnem retikulumu. Retikulociti in polikromatski eritrociti imajo podobno razdelitev po starosti celice.

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

Dodatek 2

ZASNOVA PRESKUSA Z VEČ DEJAVNIKI ZA OPREDELITEV RAZLIK MED SPOLOMA PRI PRESKUSU KROMOSOMSKIH ABERACIJ IN VIVO**Zasnova preskusa z več dejavniki in analiza v njenem okviru**

Pri tej zasnovi se preskusi vsaj 5 živali moškega in vsaj 5 živali ženskega spola pri vsaki koncentraciji, tako da se uporabi vsaj 40 živali (20 moškega in 20 ženskega spola ter ustrezne pozitivne kontrole).

Ta zasnova, ki je ena enostavnejših zasnov preskusa z več dejavniki, je enakovredna dvosmerni analizi variance, pri čemer sta glavna učinka spol in koncentracija. Podatki se lahko analizirajo z različnimi standardnimi statističnimi programskimi paketi, kot so SPSS, SAS, STATA, Genstat, ter z uporabo programskega jezika R.

Z analizo se variabilnost v naboru podatkov popolnoma razvrsti v variabilnost med spoloma, variabilnost med koncentracijami in variabilnost, povezano z medsebojnim vplivom med spoloma in koncentracijami. Vsak pogoj se preskusi glede na oceno variabilnosti med živalmi iz ponovljenih preskusov v skupinah živali istega spola pri isti koncentraciji. Celotne podrobnosti osnovne metodologije so na voljo v številnih standardnih statističnih učbenikih (glej vire) in pomoči uporabnikom, ki jo zagotavljajo statistični paketi.

Analiza se začne s pregledom pogojev medsebojnega vpliva „spol x koncentracija“ v preglednici z analizo variance ⁽¹⁾. Če ni precejšnjega medsebojnega vpliva, zagotavljajo skupne vrednosti za spola ali koncentracije veljavne statistične preskuse med koncentracijami, ki temeljijo na združenem vplivu variabilnosti znotraj skupine v preglednici z analizo variance.

Analiza se nadaljuje s popolno razvrstitvijo ocene med variabilnostjo koncentracij v kontraste, s čimer se zagotovi preskus za linearne in kvadratne kontraste odzivov med različnimi koncentracijami. Če „spol x koncentracija“ kaže znaten medsebojni vpliv, se lahko ta vpliv popolnoma razvrsti v medsebojne vplive „linearni kontrast x spol“ in „kvadratni kontrast x spol“. S temi vplivi se zagotavljajo preskusi tega, ali so odzivi na koncentracije za oba spola vzporedni ali pa so odzivi med spoloma različni.

Ocena združene variabilnosti znotraj skupine se lahko uporabi za pare preskusov v zvezi z razlikami med srednjimi vrednostmi. Te primerjave se lahko naredijo med srednjimi vrednostmi za oba spola in med srednjimi vrednostmi za različne koncentracije, kot na primer za primerjave s stopnjami v negativnih kontrolah. V primerih z znatnim medsebojnim vplivom se lahko primerjajo srednje vrednosti različnih koncentracij pri istem spolu ali srednje vrednosti obeh spolov pri isti koncentraciji.

Viri

Obstajajo številni statistični učbeniki, v katerih se razpravlja o teoriji, zasnovi, metodologiji, analizi in razlagi zasnov preskusov z več dejavniki, ki se gibljejo od najenostavnejših analiz z dvema dejavnikoma do bolj zapletenih oblik, uporabljenih v metodologiji zasnov preskusov. Naslednji seznam ni izčrpen. V nekaterih knjigah so obdelani primeri primerljivih zasnov, ki imajo v nekaterih primerih kodo za izvajanje analize z uporabo različnih programskih paketov.

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

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

Doncaster, C. P. in 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⁾ Statistiki, ki uporabljajo pristop modeliranja, kot so splošni linearni modeli, lahko analizo začnejo na drugačen, a primerljiv način, vendar ne bodo nujno izpeljali običajne preglednice z analizo variance, ki sega v čas algoritemskih pristopov k izračunavanju statističnih podatkov, razvitih v predračunalniški dobi.

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 in Hamada, M. S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.“

- (6) Poglavje B.15 dela B se črta.
- (7) Poglavje B.16 dela B se črta.
- (8) Poglavje B.18 dela B se črta.
- (9) Poglavje B.19 dela B se črta.
- (10) Poglavje B.20 dela B se črta.
- (11) Poglavje B.24 dela B se črta.
- (12) Poglavje B.47 dela B se nadomesti z naslednjim:

„B.47 Preskusna metoda za določanje motnjave in prepustnosti roženice goveda za opredelitev i) kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči, in ii) kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči

UVOD

Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD (TG) 437 (2013). Preskusno metodo za določanje motnjave in prepustnosti roženice goveda (Bovine Corneal Opacity and Permeability – preskusna metoda BCOP) je v letih 2006 in 2010 ocenil Medagencijski koordinacijski odbor za validacijo alternativnih metod (ICCVAM) v sodelovanju z Evropskim centrom za validacijo alternativnih metod (ECVAM) ter Japonskim centrom za validacijo alternativnih metod (JaCVAM) (1) (2). Pri prvem ocenjevanju je bila preskusna metoda BCOP ocenjena glede na svojo uporabnost za opredelitev kemikalij (snovi in zmesi), ki povzročajo hude poškodbe oči (1). Pri drugem ocenjevanju je bila navedena preskusna metoda ocenjena glede na svojo uporabnost za opredelitev kemikalij (snovi in zmesi), ki niso razvrščene glede na draženje oči ali hude poškodbe oči (2). Validacijska zbirka podatkov preskusne metode BCOP je vsebovala skupaj 113 snovi in 100 zmesi (2) (3). Na podlagi obeh ocenjevanj in njunega medsebojnega strokovnega pregleda je bilo ugotovljeno, da se lahko s preskusno metodo pravilno opredelijo kemikalije (snovi in zmesi), ki povzročajo hude poškodbe oči (kategorija 1), ter tiste, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči, kot je opredeljeno v globalno usklajenem sistemu Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS) (4) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (CLP) ⁽¹⁾, zato je bila za oba namena podprta kot znanstveno veljavna. Huda poškodba oči je povzročitev poškodbe očesnega tkiva ali resne fizične okvare vida po nanosu preskusne kemikalije na sprednjo površino očesa, ki ni v celoti popravljiva v 21 dneh po nanosu. Preskusne kemikalije, ki povzročajo hude poškodbe oči, so razvrščene v kategorijo 1 po sistemu GHS ZN. Kemikalije, ki niso razvrščene glede na draženje oči ali hude poškodbe oči, so opredeljene kot kemikalije, ki ne izpolnjujejo meril za razvrstitev v kategorijo 1 ali 2 (2A ali 2B) po GHS ZN, kar pomeni da se nanje sklicuje kot na kemikalije brez kategorije po GHS ZN. Ta preskusna metoda vključuje priporočeno uporabo in omejitve preskusne metode BCOP, ki temeljijo na njenih ocenah. Najpomembnejše razlike med prvotno različico smernic za preskušanje OECD iz leta 2009 in posodobljeno različico iz leta 2013 se nanašajo, niso pa omejene na: uporabo preskusne metode BCOP za opredelitev kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na sistem GHS ZN (odstavka 2 in 7); pojasnila o uporabnosti preskusne metode BCOP za preskušanje alkoholov, ketonov in trdnih snovi (odstavka 6 in 7) ter snovi in zmesi (odstavek 8); pojasnila o tem, kako je treba preskušati površinsko aktivne snovi in zmesi, ki vsebujejo površinsko aktivne snovi (odstavek 28); najnovejše informacije in pojasnila o pozitivnih kontrolah (odstavka 39 in 40); posodobitev meril za odločanje o preskusni metodi BCOP (odstavek 47); posodobitev meril za sprejemljivost študije (odstavek 48); posodobitev elementov poročila o preskusu (odstavek 49); posodobitev Dodatka 1 o opredelitvah pojmov; vključitev Dodatka 2 o napovedovalni zmogljivosti preskusne metode BCOP v okviru različnih sistemov za razvrščanje; posodobitev Dodatka 3 o seznamu kemikalij za preverjanje usposobljenosti ter posodobitev Dodatka 4 o držalu za roženico pri preskusni metodi BCOP (odstavek 1) ter opacitometru (odstavka 2 in 3).

⁽¹⁾ Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 31.12.2008, str. 1).

Zdaj na splošno velja, da Draizovega preskusa draženja oči *in vivo* v bližnji prihodnosti ne bo mogoče nadomestiti z enim samim preskusom draženja oči *in vitro*, da bi se predvidel celoten razpon dražilnih učinkov za različne kemijske razrede. Draizov preskus draženja oči pa bi morda lahko nadomestile strateške kombinacije več alternativnih preskusnih metod v okviru (večstopenjske) strategije preskušanja (5). Pristop od zgoraj navzdol (5) je treba uporabiti takrat, ko se na podlagi obstoječih informacij pričakuje, da bo imela kemikalija visok potencial draženja, pristop od spodaj navzgor (5) pa takrat, ko se na podlagi obstoječih informacij pričakuje, da kemikalija ne bo povzročila tolikšnega draženja oči, da bi jo bilo treba razvrstiti. Preskusna metoda BCOP je metoda preskušanja *in vitro*, ki se lahko pod določenimi pogoji in s posebnimi omejitvami uporabi za razvrstitev glede na nevarnosti za oči in označevanje kemikalij. Čeprav se preskusna metoda BCOP ne obravnava kot veljaven samostojen nadomestek za preskus draženja oči *in vivo* na kuncih, se vseeno priporoča kot prvi korak preskusne strategije, kot je pristop od zgoraj navzdol, ki ga priporoča Scott idr. (5), za opredelitev kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči, tj. kemikalij, ki jih je treba v kategorijo 1 po GHS ZN razvrstiti brez nadaljnjega preskušanja (4). Ta metoda je priporočljiva tudi za opredelitev kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči, kot je opredeljeno v sistemu GHS ZN (brez kategorije po GHS ZN) (4), v okviru strategije preskušanja, kot je pristop od spodaj navzgor (5). Vendar če se s preskusno metodo BCOP ne predvidi, da kemikalija povzroča hude poškodbe oči ali razvrstitev glede na draženje oči/hude poškodbe oči, bi bilo treba to kemikalijo dodatno preskusiti (*in vitro* in/ali *in vivo*), da se določi končna razvrstitev.

V tej preskusni metodi so opisani postopki za oceno potencialne nevarnosti preskusne kemikalije za oči glede na njeno zmožnost, da v izolirani roženici goveda povzroča motnjava in povečano prepustnost. Toksični učinki na roženico se merijo z: (i) zmanjšanim prenosom svetlobe (motnjava) in (ii) povečanim prehajanjem barvila natrijevega fluoresceina (prepustnost). Oceni motnjave in prepustnosti roženice po izpostavljenosti preskusni kemikaliji se združita, iz tega rezultata pa se nato izpelje stopnja draženja *in vitro* (IVIS), ki se uporablja za razvrstitev preskusne kemikalije v različne stopnje draženja.

Opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

Ta preskusna metoda temelji na protokolu preskusne metode BCOP odbora ICCVAM (6) (7), ki je bil prvotno razvit na podlagi informacij, pridobljenih iz protokola Inštituta za raziskave *in vitro* (IIVS) in protokola INVITTOX št. 124 (8). Slednji se je uporabil za predvalidacijsko študijo, ki je bila izvedena med letoma 1997–1998 in jo je sponzorirala Evropska skupnost. Oba protokola temeljita na preskusni metodi BCOP, o kateri so prvi poročali Gautheron idr. (9).

Preskusna metoda BCOP se lahko uporabi za opredelitev kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči, kot je opredeljeno v sistemu GHS ZN, tj. kemikalij, ki jih je treba razvrstiti v kategorijo 1 po GHS ZN (4). Kadar se uporablja za ta namen, je v primerjavi s podatki preskusa draženja oči *in vivo* na kuncih, razvrščenimi glede na sistem za razvrščanje GHS ZN, njena splošna točnost 79-odstotna (150/191), delež lažno pozitivnih rezultatov je 25-odstoten (32/126), delež lažno negativnih rezultatov pa 14-odstoten (9/65) (3) (glej preglednico 1 v Dodatku 2).

Kadar so iz zbirke podatkov izključene preskusne kemikalije iz določenega kemijskega (npr. alkoholi, ketoni) ali fizikalnega (tj. trdne snovi) razreda, je splošna točnost preskusne metode BCOP glede na sistem za razvrščanje GHS ZN 85-odstotna (111/131), delež lažno pozitivnih rezultatov je 20-odstoten (16/81), delež lažno negativnih rezultatov pa 8-odstoten (4/50) (3). Morebitne pomanjkljivosti preskusne metode BCOP, kadar se uporablja za opredelitev kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči (kategorija 1 po GHS ZN), temeljijo na visokem deležu lažno pozitivnih rezultatov za alkohole in ketone ter visokem deležu lažno negativnih rezultatov za trdne snovi, kot kaže validacijska zbirka podatkov (1) (2) (3). Vendar ker s preskusno metodo BCOP niso precenjene vrednosti vseh alkoholov in ketonov, pač pa so nekatere napovedane pravilno, tj. da spadajo v kategorijo 1 po GHS ZN, se ne šteje, da sta ti dve organski funkcionalni skupini izločeni s področij uporabe preskusne metode. Uporabnik te preskusne metode se mora odločiti, ali so morebitne precenjene vrednosti alkohola ali ketona sprejemljive ali je treba izvesti nadaljnje preskušanje po pristopu, ki temelji na zanesljivosti dokazov. Glede lažno negativnih rezultatov za trdne snovi je treba opozoriti, da lahko trdne snovi pri Draizovem preskusu draženja oči *in vivo* povzročijo spremenljive in ekstremne pogoje izpostavljenosti, zaradi česar je napoved njihovega resničnega potenciala draženja lahko brezpredmetna (10). Opozoriti je treba tudi na to, da noben od lažno negativnih rezultatov, opredeljenih v validacijski zbirki podatkov odbora ICCVAM (2) (3) v okviru opredeljevanja kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči (kategorija 1 po GHS ZN), ni povzročil stopnje IVIS ≤ 3 , kar je merilo, ki se uporablja za opredelitev preskusne kemikalije kot brez kategorije po GHS ZN. Poleg tega lažno negativni rezultati preskusne metode BCOP v tem okviru niso ključni, saj se vse preskusne kemikalije, pri katerih se stopnja IVIS giblje v razponu od 3 do 55, naknadno preskusijo z drugimi ustrezno potrjenimi preskusi *in vitro* ali – kot zadnja možnost – s preskusom na kuncih, in sicer glede na regulativne zahteve, pri čemer se uporabi strategija zaporednega preskušanja s pristopom, ki temelji na zanesljivosti dokazov. Ob upoštevanju dejstva, da je mogoče za nekatere trdne kemikalije s preskusno metodo BCOP pravilno napovedati, da spadajo v kategorijo 1 po GHS ZN, se za to fizikalno stanje ne šteje, da je zunaj področja uporabe preskusne metode. Raziskovalci lahko razmislijo o uporabi te preskusne metode za vse vrste kemikalij, pri čemer je treba stopnjo IVIS > 55 sprejeti kot kazalnik za odziv, ki povzroča hude poškodbe oči, ki bi jih bilo treba razvrstiti v kategorijo 1 po GHS ZN brez nadaljnega preskušanja. Kot je bilo že navedeno, pa je treba pozitivne rezultate, pridobljene z uporabo alkoholov ali ketonov, razlagati previdno zaradi morebitne precenitve vrednosti.

Preskusna metoda BCOP se lahko uporabi tudi za opredelitev kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči v skladu s sistemom za razvrščanje GHS ZN (4). Kadar se uporablja za ta namen, je v primerjavi s podatki preskusa draženja oči *in vivo* na kuncih, razvrščenimi glede na sistem za razvrščanje GHS ZN, njena splošna točnost 69-odstotna (135/196), delež lažno pozitivnih rezultatov je 69-odstoten (61/89), delež lažno negativnih rezultatov pa 0-odstoten (0/107) (3) (glej preglednico 2 v Dodatku 2). Delež dobljenih lažno negativnih rezultatov (kemikalije *in vivo*, razvrščene kot brez kategorije po GHS ZN, ki povzročajo stopnjo IVIS > 3 , glej odstavek 47) je sorazmerno visok, vendar v tem okviru ni ključen, saj se vse preskusne kemikalije, pri katerih se stopnja IVIS giblje v razponu od 3 do 55, naknadno preskusijo z drugimi ustrezno potrjenimi preskusi *in vitro* ali – kot zadnja možnost – s preskusom na kuncih, in sicer glede na regulativne zahteve, pri čemer se uporabi strategija zaporednega preskušanja s pristopom, ki temelji na zanesljivosti dokazov. Pri preskusni metodi BCOP niso vidne nobene posebne pomanjkljivosti za preskušanje alkoholov, ketonov in trdnih snovi, kadar je namenjena opredelitvi kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči (brez kategorije po GHS ZN) (3). Raziskovalci lahko to preskusno metodo uporabijo za vse vrste kemikalij, pri čemer je treba negativni rezultat (stopnja IVIS ≤ 3) sprejeti kot kazalnik za to, da razvrstitev ni potrebna (brez kategorije po GHS ZN). Ker se lahko s preskusno metodo BCOP pravilno opredeli le 31 % kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči, ta preskusna metoda ne sme biti prva izbira za začetek pristopa od spodaj navzgor (5), če so na voljo druge potrjene in sprejete metode *in vitro* s podobno visoko občutljivostjo, a večjo specifičnostjo.

Validacijska zbirka podatkov preskusne metode BCOP je vsebovala skupaj 113 snovi in 100 zmesi (2) (3). Zato se lahko ta metoda uporabi za preskušanje snovi in zmesi.

Preskusna metoda BCOP ni priporočljiva za opredelitev preskusnih kemikalij, ki jih je treba razvrstiti kot dražilne za oči (kategorija 2 ali kategorija 2A po GHS ZN), ali preskusnih kemikalij, ki jih je treba razvrstiti kot zmerno dražilne za oči (kategorija 2B po GHS ZN), saj je precejšnje število kemikalij kategorije 1 po GHS ZN razvrščenih prenizko, in sicer v kategorije 2, 2A ali 2B po GHS ZN, precejšnje število kemikalij brez kategorije po GHS ZN pa je razvrščenih previsoko, in sicer v kategorije 2, 2A ali 2B po GHS ZN (2) (3). Zato je morda potrebno nadaljnje preskušanje z drugo ustrežno metodo.

Pri vseh postopkih na očeh in roženicah goveda je treba upoštevati veljavna pravila in postopke preskusnega laboratorija o ravnanju z živalskim materialom, kamor spadajo med drugim tudi tkiva in tkivne tekočine. Priporočajo se splošni previdnostni ukrepi za laboratorije (11).

Čeprav se pri preskusni metodi BCOP ne proučujejo poškodbe veznice in šarenice, se obravnavajo učinki na roženico, ki so pomembno gonilo pri razvrščanju *in vivo* ob upoštevanju razvrščanja po GHS ZN. Popravljalnost poškodb roženice kot take v preskusni metodi BCOP ni mogoče oceniti. Na podlagi očesnih študij na kuncih je bilo predlagano, da se za opredelitev nekaterih vrst nepopravljivih učnikov lahko uporabi ocena prvotne globine poškodbe roženice (12). Vendar je potrebno nadaljnje znanstveno znanje, da bi razumeli, kako nastanejo nepopravljivi učinki, ki niso povezani z začetno hudo poškodbo. Treba je tudi opozoriti, da s preskusno metodo BCOP ni mogoče oceniti potencialne sistemske toksičnosti, povezane z izpostavljenostjo oči.

Ta preskusna metoda se bo redno posodabljala ob upoštevanju novih informacij in podatkov. Kadar je potrebna popolnejša opredelitev poškodbe roženice, se je lahko uporabna na primer histopatologija. Kot je navedeno v Dokumentu s smernicami OECD št. 160 (13), se uporabnikom priporoča, naj roženice shranijo in pripravijo histopatološke vzorce, ki se lahko uporabijo pri ustvarjanju zbirke podatkov in oblikovanju meril za odločanje, s katerimi se lahko nadalje izboljša točnost te preskusne metode.

Vsak laboratorij, ki to preskusno metodo izvaja prvič, mora uporabiti kemikalije za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 3. Laboratorij lahko te kemikalije uporabi kot dokaz svoje tehnične usposobljenosti za izvajanje preskusne metode BCOP, preden pošlje podatke o tej metodi za regulativno razvrstitev glede na nevarnosti.

NAČELO PRESKUSA

Preskusna metoda BCOP je organotipski model, s katerim se običajna fiziološka in biokemijska funkcija roženice goveda za kratek čas ohrani *in vitro*. Pri tej preskusni metodi se poškodba, ki jo povzroči preskusna kemikalija, oceni tako, da se spremembe motnjave in prepustnosti roženice merijo kvantitativno z opacitometrom oziroma spektrofotometrom vidne svetlobe. Obe meritvi se uporabita za izračun stopnje IVIS, na podlagi katere je kemikalija razporejena v kategorijo razvrstitve glede na nevarnost draženja *in vitro*, da se predvidi zmožnost preskusne kemikalije za draženje oči *in vivo* (glej merila za odločanje, odstavek 48).

Pri preskusni metodi BCOP se uporabljajo izolirane roženice oči sveže zaklanega goveda. Motnjava roženice se meri kvantitativno in ustreza količini svetlobe, ki prodre skozi roženico. Prepustnost se meri kvantitativno in ustreza količini barvila natrijevega fluoresceina, ki prodre skozi celotno debelino roženice in se zazna v mediju v zadnjem delu držala. Preskusne kemikalije se dodajo v sprednji del držala za roženico in se tako nanesejo na epitelno površino roženice. Dodatek 4 vsebuje opis in sliko držala, ki se uporablja za preskusno metodo BCOP. Držala za roženico na trgu ponujajo različna podjetja, laboratoriji pa jih lahko izdelajo tudi sami.

Izvor in starost oči goveda ter izbor živalskih vrst

Govedo, ki se zakolje v klavnicah, je običajno namenjeno za človeško prehrano ali druge komercialne uporabe. Pri preskusni metodi BCOP se kot vir roženic uporabljajo samo zdrave živali, primerne za vstop v prehransko verigo človeka. Ker so goveda glede na pasmo, starost in spol različno težka, ni priporočene teže v trenutku zakola.

Velikost roženice se lahko pri očeh različno starih živali razlikuje. Roženice z vodoravnim premerom $> 30,5$ mm in centralno debelino roženice (CCT) $\geq 1\ 100$ μm ima običajno govedo, starejše od osem let, roženice z navpičnim premerom $< 28,5$ mm in CCT < 900 μm , pa govedo, mlajše od pet let (14). Zato se oči goveda, starejšega od 60 mesecev, običajno ne uporabljajo. Oči goveda, mlajšega od 12 mesecev, se običajno prav tako ne uporabljajo, saj še niso popolnoma razvite, debelina in premer roženice pa sta bistveno manjša kot pri očeh starejšega goveda. Kljub temu se lahko uporabljajo roženice mladih živali (tj. starih od 6 do 12 mesecev), saj ima njihova uporaba nekatere prednosti, kot so večja razpoložljivost, manjši starostni razpon in manjša nevarnost izpostavljenosti goveji spongiformni encefalopatiji za osebe klavnice (15). Ker bi bilo koristno nadaljnje ocenjevanje učinka, ki ga imata velikost in debelina roženice na odzivnost na jedke in zelo dražilne snovi za oči, se uporabnikom priporoča, da poročajo o približni starosti in/ali teži živali, katerih roženice so uporabili v študiji.

Odvzem in prevoz oči v laboratorij

Oči odvzame osebe klavnice. Da bi bilo čim manj mehanskih in drugih vrst poškodb oči, jih je treba odvzeti čim prej po zakolu ter jih takoj po odvzemu in med prevozom hraniti na hladnem. Da oči ne bi bile izpostavljene potencialno dražilnim kemikalijam, osebe klavnice pri spiranju glav živali ne sme uporabljati detergentov.

Oči je treba v dovolj veliki posodi popolnoma potopiti v ohlajeno Hanksovo uravnoteženo raztopino soli (HBSS) in prepeljati v laboratorij tako, da se njihovo stanje čim manj poslabša in/ali da ne pride do bakterijske okužbe. Ker se oči odzamejo med zakolom, lahko pridejo v stik s krvjo in drugimi biološkimi snovmi, vključno z bakterijami in drugimi mikroorganizmi. Zato je treba zagotoviti, da je tveganje kontaminacije čim manjše (npr. tako da je posoda, v kateri so oči, med odvzemu in prevozom na mokrem ledu ter da se v Hanksovo uravnoteženo raztopino soli, ki se uporablja za shranjevanje oči med prevozom, dodajo antibiotiki [npr. 100 IU/ml penicilina in 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomicina]).

Čas med odvzemu oči in uporabo roženic mora biti pri preskusni metodi BCOP čim krajši (običajno se odzamejo in uporabijo isti dan) in ne sme vplivati na zanesljivost rezultatov preskusa. Ti temeljijo na merilih za izbor oči ter odzivih pozitivnih in negativnih kontrol. Vse oči, uporabljene v preskusu, morajo pripadati isti skupini oči, odvzeti na določeni dan.

Merila za izbor oči, uporabljenih v preskusni metodi BCOP

Po prihodu v laboratorij se skrbno pregleda, ali so oči poškodovane, vključno s povečano motnjavo, praskami in neovaskularizacijo. Uporabljajo se lahko samo roženice nepoškodovanih oči.

Kakovost vsake roženice se oceni tudi v poznejši fazi preskusa. Roženice z motnjavo, večjo od sedmih enot ali enakovredne stopnje v primeru uporabe opacitometra in držala za roženice, se po začetnem enournem umerjanju zavrnejo (OPOZORILO: opacitometer je treba umeriti v skladu s standardi za določevanje enot motnjave, glej Dodatek 4).

Vsaka tretirana skupina (preskusna kemikalija, sočasne negativne in pozitivne kontrole) je sestavljena iz najmanj treh oči. Pri preskusni metodi BCOP je treba za negativno kontrolo uporabiti tri roženice. Ker se roženice odstranijo s celotnega zrkla in pritrdijo v držala za roženice, se lahko zaradi artefaktov, ki nastanejo zaradi prijemanja, vrednosti motnjave in prepustnosti v posameznih primerih spremenijo (vključno z negativno kontrolo). Poleg tega se vrednosti motnjave in prepustnosti roženic iz roženic za negativno kontrolo uporabljajo za popravljanje vrednosti motnjave in prepustnosti roženic, tretiranih s preskusno kemikalijo, in za pozitivno kontrolo pri izračunih stopenj IVIS.

POSTOPEK

Priprava oči

Nepoškodovane roženice se secirajo tako, da se ohrani 2 do 3 mm širok rob beločnice, kar olajša nadaljnje ravnanje, pri čemer je treba paziti, da se epitelij in endotelij roženice ne poškodujeta. Izolirane roženice se pritrdijo v posebej za to izdelana držala, sestavljena iz sprednjega in zadnjega dela, na katera je roženica pripeta z epitelno oziroma endotelno stranjo. Oba dela držala se do roba napolnita z ogretim Eaglovim minimalnim osnovnim medijem (EMEM) brez fenol rdečega (in sicer najprej zadnji del držala), pri čemer je treba paziti, da ne nastajajo mehurčki. Naprava se nato vsaj eno uro uravnatežuje pri 32 ± 1 °C, kar omogoči, da se roženice uravnatežijo z medijem in da se doseže čim bolj normalna metabolna dejavnost (približna temperatura na površini roženice *in vivo* je 32 °C).

Po uravnateženju se v oba dela držala doda svež, ogret medij EMEM brez fenol rdečega, za vsako roženico pa se zabeležijo odčitki izhodiščne vrednosti motnjave. Roženice z makroskopskimi poškodbami tkiva (npr. praskami, pigmentacijo, neovaskularizacijo) ali motnjavo, večjo od sedmih enot ali enakovredne stopnje v primeru uporabe opacitometra in držala za roženice, se zavržejo. Vsaj tri roženice se izberejo kot roženice za negativno kontrolo (ali kontrolo s topilom). Preostale roženice se nato razdelijo v tretirano skupino in skupine za pozitivno kontrolo.

Ker ima voda večjo toplotno kapaciteto kot zrak, zagotavlja stabilnejše temperaturne pogoje za inkubacijo. Zato je za ohranjanje držala za roženice in njegove vsebine pri temperaturi 32 ± 1 °C priporočljiva uporaba vodne kopeli. Lahko se uporabljajo tudi inkubatorji za vzdrževanje temperature zraka, če zagotavljajo stabilno temperaturo (tj. s predogrevanjem držal in medijev).

Uporaba preskusne kemikalije

Uporabljata se dva različna protokola tretiranja, in sicer eden za tekočine in površinsko aktivne snovi (trdne snovi ali tekočine), drugi pa za površinsko neaktivne snovi (trdne snovi).

Tekočine se preskušajo nerazredčene. Poltrdne snovi, kreme in voski se običajno preskušajo kot tekočine. Nerazredčene površinsko aktivne snovi se preskusijo pri 10-odstotni masni koncentraciji v 0,9-odstotni raztopini natrijevega klorida, destilirani vodi ali drugem topilu, za katerega je dokazano, da nima škodljivih učinkov na preskusni sistem. Če se uporabljajo druge koncentracije raztopin, jih je treba ustrezno utemeljiti. Zmesi, ki vsebujejo površinsko aktivne snovi, se lahko preskušajo nerazredčene ali razredčene v ustrezni koncentraciji, in sicer odvisno od ustreznega scenarija izpostavljenosti *in vivo*. Če se uporabljajo druge koncentracije raztopin, jih je treba ustrezno utemeljiti. Roženice so tekočinam in površinsko aktivnim snovem izpostavljene 10 minut. Če je čas izpostavljenosti drugačen, ga je treba ustrezno znanstveno utemeljiti. Za opredelitev površinsko aktivnih snovi in zmesi, ki vsebujejo površinsko aktivne snovi, glej Dodatek 1.

Površinsko neaktivne trdne snovi se običajno preskušajo kot raztopine ali suspenzije pri 20-odstotni masni koncentraciji v 0,9-odstotni raztopini natrijevega klorida, destilirani vodi ali drugem topilu, za katerega je dokazano, da nima škodljivih učinkov na preskusni sistem. V določenih okoliščinah in ob ustrezni znanstveni utemeljitvi se lahko trdne snovi preskušajo tudi nerazredčene, tako da se neposredno nanesejo na površino roženice, pri čemer se uporablja odprta metoda (glej odstavek 32). Roženice so trdnim snovem izpostavljene štiri ure, čas izpostavljenosti pa se lahko tako kot pri tekočinah in površinsko aktivnih snoveh spremeni na podlagi ustrezne znanstvene utemeljitve.

Uporabljajo se lahko različne metode tretiranja, in sicer glede na fizikalne in kemijske lastnosti preskusne kemikalije (npr. trdne snovi, tekočine, viskozne ali neviskozne tekočine). Najpomembneje je, da preskusna kemikalija dovolj dobro pokriva epitelno površino in da se med spiranjem ustrezno odstrani. Zaprta metoda se običajno uporablja za neviskozne do nekoliko viskozne tekoče preskusne kemikalije, medtem ko se odprta metoda običajno uporablja za polviskozne in viskozne tekoče preskusne kemikalije in nerazredčene trdne snovi.

Pri zaprti metodi se prek dozirnih odprtih v zgornji površini v sprednji del držala doda toliko preskusne kemikalije (750 μ l), da ta prekrije epitelno stran roženice, odprtine pa se nato med obdobjem izpostavljenosti zatesnijo s tesnilnimi čepki. Vsaka roženica mora biti preskusni kemikaliji izpostavljena dovolj dolgo.

Pri odprti metodi se pred tretiranjem s sprednjega dela držala odstraniti obroček za zapiranje okenca in stekleno okence. Kontrolna ali preskusna kemikalija (750 μ l ali dovolj preskusne kemikalije, da je prekrita celotna roženica) se nanese neposredno na epitelno površino roženice z mikropipeto. Če se preskusna kemikalija težko pipetira, se jo lahko zaradi lažjega doziranja nanese s pipeto za neposredno izpodrivanje tlaka. Konica pipete za neposredno izpodrivanje tlaka se vstavi v dozirno konico brizge, da se material napolni v konico za izpodrivanje pod tlakom. Ob tem ko se potisni bat počasi sprošča, se vlečni bat pipete pomakne navzgor. Če v konici pipete začnejo nastajati zračni mehurčki, se preskusna kemikalija odstrani (zavrže) in postopek ponovi, dokler konica ni polna in v njej ni zračnih mehurčkov. Po potrebi se lahko uporabi običajna brizga (brez igle), saj omogoča merjenje natančne količine preskusne kemikalije in lažji nanos na epitelno površino roženice. Po odmerjanju se na sprednji del držala ponovno namesti stekleno okence in tako ponovno ustvari zaprt sistem.

Inkubacija po izpostavljenosti

Po obdobju izpostavljenosti se preskusna kemikalija, kemikalija za negativno kontrolo ali kemikalija za pozitivno kontrolo odstrani iz sprednjega dela držala, epitelij pa se najmanj trikrat (oziroma dokler preskusna snov ni več vidna) spere z EMEM (ki vsebuje fenol rdeče). Za spiranje se uporablja medij, ki vsebuje fenol rdeče, saj se lahko s spreminjanjem barv v fenol rdečem nadzoruje, ali je bilo spiranje kisljih ali alkalnih preskusnih kemikalij učinkovito. Če je fenol rdeče še vedno razbarvano (rumeno ali vijoličasto) ali če je preskusna kemikalija še vedno vidna, se roženice sperejo več kot trikrat. Ko v mediju ni več preskusne kemikalije, se roženice še zadnjič sperejo z EMEM (brez fenol rdečega). Pri zadnjem spiranju se uporabi EMEM (brez fenol rdečega), s čimer se zagotovi, da je bilo fenol rdeče odstranjeno iz sprednjega dela držala pred merjenjem motnjave. Nato se sprednji del držala ponovno napolni s svežim EMEM brez fenol rdečega.

Pri tekočinah ali površinsko aktivnih snoveh se roženice po spiranju dajo v inkubator še za dve dodatni uri pri 32 ± 1 °C. V določenih okoliščinah je po obdobju izpostavljenosti koristna tudi daljša inkubacija, vendar je to odvisno od vsakega primera posebej. Roženice, ki se preskušajo s trdnimi snovmi, se po štirih urah izpostavljenosti temeljito sperejo, vendar pri njih nadaljnja inkubacija ni potrebna.

Po koncu inkubacije, ki sledi obdobju izpostavljenosti, za tekočine in površinsko aktivne snovi in po koncu štiriurne izpostavljenosti za površinsko neaktivne trdne snovi se zabeleži motnjava in prepustnost vsake roženice. Poleg tega se vsaka roženica vizualno pregleda in se zabeležijo vsa pomembnejša opažanja (npr. lupljenje tkiva, prisotnost ostanka preskusne kemikalije, neenotni vzorci motnjave). Ta opažanja so lahko pomembna, saj se lahko izražajo z odkloni pri odčitkih opacitometra.

Kontrolne kemikalije

V vsak poskus sta vključeni sočasna negativna kontrola ali kontrola s topilom/vehiklom ter pozitivna kontrola.

Pri preskušanju 100-odstotne tekoče snovi se v preskusno metodo BCOP vključi sočasna negativna kontrola (npr. 0,9-odstotna raztopina natrijevega klorida ali destilirana voda), da se odkrijejo nespecifične spremembe preskusnega sistema in zagotovijo izhodiščne vrednosti za končne točke preskusa. Ta kontrola tudi zagotavlja, da preskusni pogoji ne povzročajo dražilnih reakcij.

Pri preskušanju razredčene tekočine, površinsko aktivne ali trdne snovi se v preskusno metodo BCOP vključi primerjalna kontrolna skupina s topilom/vehiklom, da se odkrijejo nespecifične spremembe preskusnega sistema in zagotovijo izhodiščne vrednosti za končne točke preskusa. Uporablja se lahko samo tako topilo/vehikel, za katerega je dokazano, da nima škodljivih učinkov na preskusni sistem.

Kemikalija, za katero je znano, da povzroča pozitiven odziv, se v vsak poskus vključi kot sočasna pozitivna kontrola, da se preveri celovitost preskusnega sistema in njegova pravilna izvedba. Da se lahko oceni variabilnost odziva pozitivne kontrole v daljšem časovnem obdobju pa stopnja dražilnega odziva ne sme biti prevelika.

Primer pozitivne kontrole za tekoče preskusne kemikalije je 100-odstotni etanol ali 100-odstotni dimetilformamid. Primer pozitivne kontrole za trdne preskusne kemikalije je 20-odstotna masna koncentracija imidazola v 0,9-odstotni raztopini natrijevega klorida.

Primerjalne kemikalije so primerne za ocenjevanje potenciala za draženje oči, ki ga imajo neznane kemikalije določenega kemijskega ali proizvodnega razreda, ali za ocenjevanje relativnega potenciala snovi za draženje oči v določenem razponu dražilnih učinkov.

Merjene končne točke

Motnjava je odvisna od količine svetlobe, ki prodre skozi roženico. Motnjava roženice se meri kvantitativno s pomočjo opacimetra, pri čemer se meri neprekinjeno.

Prepustnost je odvisna od količine barvila natrijevega fluoresceina, ki prodre skozi vse celične sloje roženice (tj. od epitelija na zunanji površini roženice do endotelija na notranji površini roženice). V sprednji del držala za roženico, na katerega je pripeta epitelna stran roženice, se doda 1 ml raztopine natrijevega fluoresceina (4 ali 5 mg/ml pri testiranju tekočin in površinsko aktivnih snovi oziroma površinsko neaktivnih snovi), medtem ko se zadnji del držala, na katerega je pripeta endotelna stran roženice, napolni s svežim EMEM. Držalo se nato da v inkubator v vodoravnem položaju za 90 ± 5 minut pri 32 ± 1 °C. Količina natrijevega fluoresceina, ki prodre v zadnji del držala, se meri kvantitativno s pomočjo spektrofotometrije UV/VIS. Spektrofotometrične meritve pri 490 nm se beležijo kot neprekinjeno merjene vrednosti optične gostote (OD490) ali absorbance. Prepuščanje fluoresceina se določa z vrednostmi OD490, ki so bile izmerjene s spektrofotometrom vidne svetlobe pri standardni dolžini poti 1 cm.

Namesto spektrofotometra se lahko uporabi tudi bralnik 96-jamičnih mikrotitrskih plošč, pod pogojem, da: (i) se lahko določi linearno merilno območje bralnika za določevanje vrednosti fluoresceina OD490 in (ii) se v 96-jamični mikrotitrski plošči uporablja pravilna količina vzorcev fluoresceina, zaradi česar vrednosti OD490 ustrezajo standardni dolžini poti 1 cm (za to so lahko potrebne popolnoma napolnjene posode [navadno 360 µl]).

PODATKI IN POROČANJE

Ocenjevanje podatkov

Potem ko se popravita vrednost motnjave in srednja vrednost prepustnosti (OD490) za vrednosti ozadja za motnjavo in vrednosti prepustnosti negativne kontrole OD490, se srednji vrednosti motnjave in prepustnosti OD490 za vsako tretirano skupino združita v empirično izpeljani formuli, s katero se izračuna stopnja IVIS za vsako tretirano skupino, kot sledi:

stopnja IVIS = srednja vrednost motnjave + (15 × srednja vrednost prepustnosti OD490).

Sina idr. (16) so poročali, da je bila ta formula izpeljana na podlagi študij v enem in več laboratorijih. Podatki za 36 spojin, pridobljeni med študijo, izvedeno v več laboratorijih, so bili ocenjeni z multivariantno analizo, s katero se je določila najustreznejša enačba za podatke *in vivo* ter *in vitro*. To analizo so izvedli znanstveniki dveh različnih podjetij, ki so izpeljali skoraj identični enačbi.

Vrednosti motnjave in prepustnosti je treba oceniti tudi neodvisno, da se ugotovi, ali preskusna kemikalija skozi eno od dveh končnih točk učinkuje jedko ali zelo dražilno (glej merila za odločanje).

Merila za odločanje

Mejne vrednosti stopnje draženja *in vitro* (IVIS) za opredelitev preskusnih kemikalij kot takih, ki povzročajo hude poškodbe oči (kategorija 1 po GHS ZN), in takih, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči (brez kategorije po GHS ZN), so:

IVIS	GHS ZN
≤ 3	brez kategorije
$> 3 \leq 55$	napoved ni mogoča
> 55	kategorija 1

Merila za sprejemljivost študije

Preskus se šteje za sprejemljivega, če je pri pozitivni kontroli stopnja IVIS znotraj dveh standardnih odklonov veljavne srednje vrednosti iz preteklih preskusov, ki jo je treba posodobiti vsaj vsake tri mesece ali vedno, kadar preskus izvajajo laboratoriji, ki preskuse izvajajo redko (tj. manj kot enkrat mesečno). Iz odzivov negativnih kontrol s topilom/vehiklom morajo biti razvidne vrednosti motnjave in prepustnosti, ki so manjše od veljavnih zgornjih omejitev vrednosti ozadja za motnjavo in prepustnost roženic goveda, obdelanih z zadevnimi negativnimi kontrolami ali kontrolami s topilom/vehiklom. Kadar je razvrstitev nedvoumna, bi moralo za preskusno kemikalijo zadoščati eno samo preskušanje, sestavljeno iz vsaj treh roženic. Vendar je treba v primeru mejnih rezultatov pri prvi ponovitvi preskušanja razmisliti o drugi ponovitvi (ki pa ni nujno potrebna), pa tudi tretji, če srednje vrednosti stopnje IVIS iz prvih dveh ponovitev niso skladne. V tem okviru se rezultat prve ponovitve preskušanja šteje za mejnega, če napovedi pri treh roženicah niso bile skladne, tako da:

- napovedi pri dveh od treh roženic niso bile skladne s srednjo vrednostjo vseh treh roženic ALI
- napovedi pri eni od treh roženic niso bile skladne s srednjo vrednostjo vseh treh roženic IN je neskladni rezultat odstopal za > 10 enot stopnje IVIS od mejne vrednosti IVIS, ki je 55.
- Če se pri ponovitvi preskušanja potrdi napoved iz prve ponovitve preskušanja (ki temelji na srednji vrednosti stopnje IVIS), se lahko končna odločitev sprejme brez nadaljnega preskušanja. Če se pri ponovitvi preskušanja pojavi neskladna napoved iz prve ponovitve preskušanja (ki temelji na srednji vrednosti stopnje IVIS), je treba izvesti tretjo in končno ponovitev preskušanja za razjasnitev neenakih napovedi in razvrstitev preskusne kemikalije. Nadaljnje preskušanje za razvrščanje in označevanje se lahko odpravi, če je pri kateri koli ponovitvi preskusa napovedana kategorija 1 po GHS ZN.

Poročilo o preskusu

V poročilo o preskusu se vključijo naslednji podatki, če so pomembni za izvedbo študije:

Preskusne in kontrolne kemikalije:

- kemijska imena, na primer strukturno ime, ki ga uporablja Služba za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS), ki jim sledijo druga imena, če so znana; registrska številka CAS (RN), če je znana;

- čistost in sestava preskusne/kontrolne kemikalije (v masnih odstotkih), če so ti podatki na voljo;
- fizikalno-kemijske lastnosti, pomembne za izvedbo študije, kot so agregatno stanje, hlapnost, vrednost pH, stabilnost, kemijski razred, topnost v vodi;
- obdelava preskusnih/kontrolnih kemikalij pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, drobljenje);
- stabilnost, če je znana.

Podatki o naročniku in preskuševalnem laboratoriju:

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

Pogoji preskusne metode:

- uporabljeni opacitometer (npr. model in specifikacije) ter nastavitve instrumenta;
- podatki o umerjanju za merilno napravo, s katero sta se merili motnjava in prepustnost (npr. opacitometer in spektrofotometer), da se zagotovi linearnost meritev;
- vrsta uporabljenih držal za roženico (npr. model in specifikacije);
- opis ostale uporabljene opreme;
- postopek, ki se je uporabil za zagotavljanje celovitosti (tj. točnosti in zanesljivosti) preskusne metode v daljšem časovnem obdobju (npr. redno preskušanje kemikalij za preverjanje usposobljenosti).

Merila za sprejemljivost preskusa:

- sprejemljiva sočasna pozitivna in negativna kontrola na podlagi podatkov iz preteklih preskusov;
- po potrebi razpon sprejemljivih referenčnih sočasnih kontrol na podlagi podatkov iz preteklih preskusov.

Zbiranje in priprava oči:

- podatki o viru oči (tj. obrat, v katerem so bile odvzete);
- premer roženice kot merilo za starost živalskega vira in primernost za test;
- pogoji hranjenja in prevoza oči (npr. datum in čas odvzema oči, čas do začetka preskušanja, transportni medij in temperaturni pogoji, morebitni uporabljeni antibiotiki);
- priprava in namestitev roženic govedu, vključno z izjavami glede njihove kakovosti, temperature držal za roženice in merili za izbiro roženic, uporabljenih za preskušanje.

Preskusni postopek:

- uporabljeno število ponovitev;
- opredelitev uporabljenih negativnih in pozitivnih kontrol (če je ustrezno, tudi kontrole s topilom in primerjalne kontrole);
- uporabljene koncentracije preskusne kemikalije, nanos, čas izpostavljenosti in čas po inkubaciji, ki sledi obdobju izpostavljenosti;
- opis uporabljenih meril za ocenjevanje in odločitev;
- opis uporabljenih meril za sprejemljivost študije;
- opis vseh prilagoditev preskusnega postopka;
- opis uporabljenih meril za ocenjevanje.

Rezultati

- preglednice s podatki iz posameznih preskusnih vzorcev (npr. vrednosti motnjave in OD490 ter izračunane stopnje IVIS za preskusno kemikalijo ter pozitivne, negativne in primerjalne kontrole [če so bile vključene], prikazane v obliki preglednice, vključno s podatki iz ponovitev preskusov s ponovljenimi vzorci, če so bili izvedeni, ter srednje vrednosti \pm standardni odklon za vsak poskus);
- opis drugih opaženih učinkov;
- izpeljana razvrstitev po GHS ZN *in vitro*, če je ustrezna.

Razprava o rezultatih

Sklepne ugotovitve

VIRI

- (1) ICCVAM (2006). Test Method Evaluation Report – *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH št. publikacije: 07-4517. Na voljo na: 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. NIH št. publikacije: 10-7553. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Na voljo na: <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. Series on Testing and Assessment, št. 189, OECD, Pariz.
- (4) ZN (2011). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS), ST/SG/AC.10/30. Rev. 4, New York in Ženeva: Združeni narodi. Na voljo na: 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. in 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. V: ICCVAM Test Method Evaluation Report – *in vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH št. publikacije: 07-4517. Na voljo na: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.
- (7) ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. V: ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH št. publikacije: 10-7553A. Na voljo na: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>.
- (8) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italija: Evropski center za validacijo alternativnih metod (ECVAM).
- (9) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. in 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. in Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Na voljo na: [<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf>].
- (12) Maurer, J. K., Parker, R. D. in 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. Series on Testing and Assessment, št. 160. Sprejet 25. oktobra 2011. Pariz: Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj.
- (14) Doughty, M. J., Petrou, S. in Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73: 2159–2165.
- (15) Collee, J. in 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. in 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) Poglavje B.5 te priloge: Akutno draženje oči/jedkost za oči.
- (18) ICCVAM (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH št. publikacije: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Na voljo na: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].
- (19) OECD (1998). Series on Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. Št. 1: OECD Principles on Good Laboratory Practice (rev. 1997).

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

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Točnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov „ustreznosti“. Ta izraz in izraz „skladnost“ se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusne metode.

Primerjalna kemikalija: kemikalija, ki se uporablja kot standard za primerjavo s preskusno kemikalijo. Primerjalna kemikalija mora imeti naslednje značilnosti: (i) ima trajen in zanesljiv vir, (ii) je strukturno in funkcijsko podobna kemikalijam iz preskušane razreda, (iii) ima znane fizikalne/kemijske lastnosti, (iv) ima spremne podatke o znanih učinkih in (v) ima znano moč v razponu želenega odziva.

Pristop od spodaj navzgor: stopenjski pristop, ki se uporablja za kemikalijo, za katero se domneva, da ne potrebuje razvrstitve glede na draženje oči ali hude poškodbe oči, pri čemer se najprej določijo kemikalije, ki ne potrebujejo razvrstitve (negativni rezultat), nato pa druge kemikalije (pozitivni rezultat).

Kemikalija: snov ali zmes.

Roženica: prozoren sprednji del zrkla, ki pokriva šarenico in zenico ter skozi katerega vstopa svetloba.

Motnjava roženice: merjenje stopnje motnjave roženice po izpostavljenosti preskusni kemikaliji. Povečana motnjava roženice pomeni, da je roženica poškodovana. Motnjava se lahko ocenjuje subjektivno, na primer z Draizovim testom draženja oči na kuncih, ali objektivno z inštrumentom, kot je „opacitometer“.

Prepustnost roženice: kvantitativno merjenje poškodb epitelijske roženice z določitvijo količine barvila natrijevega fluoresceina, ki prodre skozi vse celične plasti roženice.

Draženje oči: je povzročitev sprememb v očesu po nanosu preskusne kemikalije na sprednjo površino očesa, ki so v celoti popravljive v 21 dneh po nanosu. Ta pojem je sopomenka za „popravljive učinke na oči“ in „kategorijo 2 po GHS ZN“ (4).

Delež lažno negativnih rezultatov: delež vseh pozitivnih kemikalij, ki jih preskusna metoda zmotno prikaže kot negativne. To je eden od kazalnikov učinkovitosti preskusne metode.

Delež lažno pozitivnih rezultatov: delež vseh negativnih kemikalij, ki jih preskusna metoda zmotno prikaže kot pozitivne. To je eden od kazalnikov učinkovitosti preskusne metode.

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

Stopnja draženja *in vitro* (IVIS): empirično izpeljana formula, ki se uporablja pri preskusni metodi BCOP, pri kateri se srednje vrednosti motnjave in prepustnosti za vsako tretirano skupino združijo v eno samo vrednost *in vitro* za vsako tretirano skupino. Stopnja IVIS = srednja vrednost motnjave + (15 x srednja vrednost prepustnosti).

Nepopravljivi učinki na oči: glej „Huda poškodba oči“.

Zmes: zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi, ki v njej ne reagirajo (4).

Negativna kontrola: netretiran ponovljen vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema. Ta vzorec se obdela z vzorci, tretiranimi s preskusno kemikalijo, ali drugimi kontrolnimi vzorci, da se ugotovi, ali topilo reagira s preskusnim sistemom.

Brez razvrstitve: kemikalije, ki niso razvrščene glede na draženje oči (kategorija 2, 2A ali 2B po GHS ZN) ali hude poškodbe oči (kategorija 1 po GHS ZN). Ta pojem je sopomenka za „brez kategorije po GHS ZN“.

Opacitometer: instrument za merjenje motnjave roženice, ki kvantitativno ocenjuje prenos svetlobe skozi roženico. Običajno je sestavljen iz dveh delov, ki imata vsak svoj vir svetlobe in fotocelico. En del se uporablja za tretirano roženico, drugi pa za umerjanje in nastavitev instrumenta na vrednost nič. Svetloba halogene svetilke se skozi kontrolni del (prazna komora brez okenc ali tekočine) usmeri v fotocelico in primerja s svetlobo, usmerjeno v fotocelico skozi preskusni del, v katerem je komora z roženico. Nato se primerja razlika v svetlobi, prenesene iz fotocelic, in se na digitalnem zaslonu prikaže numerična vrednost motnjave.

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

Popravljivi učinki na oči: glej „Draženje oči“.

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusne metode v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih in interne laboratorijske ponovljivosti.

Huda poškodba oči: povzročitev poškodbe očesnega tkiva ali resne fizične okvare vida po nanosu preskusne kemikalije na sprednjo površino očesa, ki ni v celoti popravljiva v 21 dneh po nanosu. Ta pojem je sopomenka za „nepopravljive učinke na oči“ in „kategorijo 1 po GHS ZN“ (4).

Kontrola s topilom/vehiklom: netretiran vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema, vključno s topilom ali vehiklom, ki se obdela s vzorci, tretiranimi s preskusno kemikalijo, in drugimi kontrolnimi vzorci, da se določi izhodiščni odziv za vzorce, tretirane s preskusno kemikalijo, raztopljeno v istem topilu ali vehiklu. Pri preskušanju s sočasno negativno kontrolo ta vzorec tudi pokaže, ali topilo ali vehikel reagira s preskusnim sistemom.

Snov: kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo (4).

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

Zmes, ki vsebuje površinsko aktivno snov: v okviru te preskusne metode je to zmes, ki vsebuje eno ali več površinsko aktivnih snovi, pri čemer je njihova končna koncentracija > 5 %

Pristop od zgoraj navzdol: stopenjski pristop, ki se uporablja za kemikalijo, za katero se domneva, da povzroča hude poškodbe oči, pri čemer se najprej določijo kemikalije, ki jih je treba razvrstiti (pozitivni rezultat), nato pa še druge kemikalije (negativni rezultat).

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

Večstopenjska strategija preskušanja: stopenjsko preskušanje, pri katerem se v posebnem vrstnem redu pregledajo vsi obstoječi podatki o preskusni kemikaliji, pri čemer se na vsaki stopnji uporabi postopek, ki temelji na zanesljivosti dokazov, da se določi, ali je pred nadaljevanjem na naslednji stopnji na voljo dovolj podatkov za odločitev o razvrstitvi kemikalije glede na nevarnost, ki jo povzroča. Če se za preskusno kemikalijo na podlagi razpoložljivih podatkov lahko določi potencial za draženje, dodatno preskušanje ni potrebno. Če preskusni kemikaliji na podlagi razpoložljivih podatkov ni mogoče določiti potenciala za draženje, se izvede postopno zaporedno testiranje na živalih, dokler kemikalije ni mogoče jasno razvrstiti.

Globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudje (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (4).

Kategorija 1 po GHS ZN: glej „Huda poškodba oči“.

Kategorija 2 po GHS ZN: glej „Draženje oči“.

Brez kategorije po GHS ZN: kemikalije, ki ne izpolnjujejo zahtev za razvrstitev v kategorijo 1 ali 2 (2A ali 2B) po GHS ZN. Ta pojem je sopomenka za „brez razvrstitve“.

Validirana preskusna metoda: preskusna metoda, za katero sta bili na podlagi izvedenih validacijskih študij določeni ustreznost (vključno s točnostjo) in zanesljivost za določen namen. Opozoriti je treba, da točnost in zanesljivost validirane preskusne metode nista nujno zadostni, da bi bila sprejemljiva za predlagani namen.

Zanesljivost dokazov: postopek obravnavanja prednosti in slabosti različnih informacij v okviru sprejemanja in utemeljevanja sklepne ugotovitve glede potenciala nevarnosti preskusne kemikalije.

Dodatek 2

NAPOVEDOVALNA ZMOGLJIVOST PRESKUSNE METODE BCOP

Preglednica 1

Napovedovalna zmogljivost preskusne metode BCOP za opredelitev kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči [kemikalije kategorije 1, proti kemikalijam, ki ne spadajo v kategorijo 1 (kat. 2 + brez kat.) po GHS ZN/uredbi CLP EU; kemikalije kategorije I proti kemikalijam, ki ne spadajo v kategorijo I (kat. II + kat. III + kat. IV) po US EPA]

Sistem za razvrščanje	Št.	Točnost		Občutljivost		Lažno negativni rezultati		Specifičnost		Lažno pozitivni rezultati	
		v %	št.	v %	št.	v %	št.	v %	št.	v %	št.
GHS ZN uredba CLP EU	191	78,53	150/191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/126	25,40	32/126
US EPA	190	78,95	150/190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/127	24,41	31/127

Preglednica 2

Napovedovalna zmogljivost preskusne metode BCOP za opredelitev kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči („nedražilne snovi za oči“) [kemikalije brez kategorije proti kemikalijam, ki so razvrščene v kategorije (kat. 1 + kat. 2) po GHS ZN/uredbi CLP EU; kemikalije kategorije IV proti kemikalijam, ki ne spadajo v kategorijo IV (kat. I + kat. II + kat. III) po US EPA]

Sistem za razvrščanje	Št.	Točnost		Občutljivost		Lažno negativni rezultati		Specifičnost		Lažno pozitivni rezultati	
		v %	št.	v %	št.	v %	št.	v %	št.	v %	št.
GHS ZN uredba CLP EU	196	68,88	135/196	100	107/107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
US EPA	190	82,11	156/190	93,15	136/146	6,85	10/146	45,45	20/44	54,55	24/44

Dodatek 3

KEMIKALIJE ZA PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI ZA PRESKUSNO METODO BCOP

Pred redno uporabo te preskusne metode morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost tako, da pravilno opredelijo razvrstitev glede na nevarnosti za oči za 13 kemikalij, priporočenih v preglednici 1. Te kemikalije so bile izbrane, ker predstavljajo celoten razpon odzivov pri nevarnostih za oči, temeljijo pa na rezultatih preskusa draženja oči *in vivo* na kuncih (TG 405) (17) in sistemu za razvrščanje GHS ZN (tj. kategorije 1, 2A, 2B ali brez kategorije) (4). Druga merila za izbiro so bila razpoložljivost kemikalij na trgu, razpoložljivost visokokakovostnih referenčnih podatkov *in vivo* in razpoložljivost visokokakovostnih podatkov *in vitro* iz preskusne metode BCOP. Referenčni podatki so na voljo v dokumentu s povzetki (3) ter dokumentu ICCVAM o pregledu ozadja preskusne metode BCOP (2) (18).

Preglednica 1

Priporočene kemikalije za dokazovanje tehnične usposobljenosti za preskusno metodo BCOP

Kemikalija	Št. CAS	Kemijski razred (1)	Agregatno stanje	Razvrstitev <i>in vivo</i> (2)	Razvrstitev po BCOP
benzalkonijev klorid (5-odstotni)	8001-54-5	onijska spojina	tekočina	kategorija 1	kategorija 1
klorheksidin	55-56-1	amin, amidin	trdna snov	kategorija 1	kategorija 1
dibenzoil-L-vinska kislina	2743-38-6	karboksilna kislina, ester	trdna snov	kategorija 1	kategorija 1
imidazol	288-32-4	heterociklična spojina	trdna snov	kategorija 1	kategorija 1
trikloroacetna kislina (30-odstotna)	76-03-9	karboksilna kislina	tekočina	kategorija 1	kategorija 1
2,6-diklorobenzoil klorid	4659-45-4	kislinski halid	tekočina	kategorija 2A	točna/zanesljiva napoved ni mogoča
etil-2-metilacetoacetat	609-14-3	keton, ester	tekočina	kategorija 2B	točna/zanesljiva napoved ni mogoča
amonijev nitrat	6484-52-2	anorganska sol	trdna snov	kategorija 2 (3)	točna/zanesljiva napoved ni mogoča
dinatrijeva sol EDTA	25102-12-9	amin, karboksilna kislina (sol)	trdna snov	brez razvrstitve	brez razvrstitve
tween 20	9005-64-5	ester, polieter	tekočina	brez razvrstitve	brez razvrstitve

Kemikalija	Št. CAS	Kemijski razred ⁽¹⁾	Agregatno stanje	Razvrstitev <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Razvrstitev po BCOP
2-merkaptopirimidin	1450-85-7	kislinski halid	trdna snov	brez razvrstitve	brez razvrstitve
fenilbutazon	50-33-9	heterociklična spojina	trdna snov	brez razvrstitve	brez razvrstitve
polioksietilen 23 lauril eter (BRIJ-35) (10-odstotni)	9002-92-0	alkohol	tekočina	brez razvrstitve	brez razvrstitve

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

⁽¹⁾ Vsaki preskusni kemikaliji so bili dodeljeni kemijski razredi, pri čemer se je uporabil standardni sistem za razvrščanje, ki temelji na sistemu za razvrščanje MeSH (National Library of Medicine Medical Subject Headings) (na voljo na: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

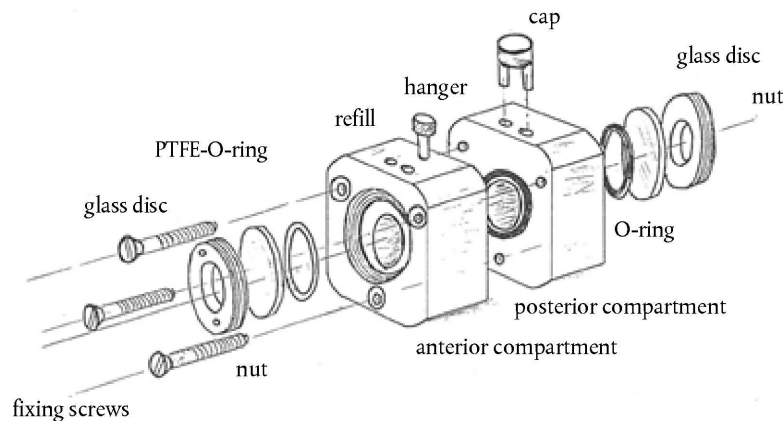
⁽²⁾ Na podlagi rezultatov preskusa draženja oči *in vivo* na kuncih (OECD TG 405) (17) in z uporabo GHS ZN (4).

⁽³⁾ Razvrščanje v kategorijo 2A ali 2B je odvisno od razlage merila za razlikovanje med obema kategorijama po GHS ZN, in sicer ena od treh oziroma dve od treh živali, ki imajo na sedmi dan učinke, zaradi katerih je treba kemikalijo razvrstiti v kategorijo 2A. V študijo *in vivo* so bile vključene 3 živali. Vse končne točke, razen rdečine veznice na eni živali, so se do sedmega dne ali prej popravile in so dosegle vrednost nič. Pri eni živali, ki si do sedmega dne ni popolnoma opomogla, je rdečina veznice (na sedmi dan) dosegla vrednost 1, popolnoma pa si je opomogla deseti dan.

Dodatek 4

DRŽALO ZA ROŽENICO ZA DOLOČANJE MOTNJAVE IN PREPUSTNOSTI ROŽENICE GOVEDA (BCOP)

Držala za roženico za BCOP so narejena iz inertnega materiala (npr. polipropilena). Sestavljena so iz dveh polovic (sprednje in zadnje komore) ter dveh podobnih cilindričnih notranjih posodic. Vsaka komora je zasnovana tako, da je njena prostornina približno 5 ml in se konča s steklenim okencem, skozi katerega se beležijo meritve prepustnosti. Premer posamezne notranje komore je 1,7 cm, globina pa 2,2 cm ⁽¹⁾. Tesnilni obroček na zadnji komori preprečuje iztekanje. Roženice se z endotelno stranjo navzdol položijo na tesnilni obroček zadnje komore, sprednja komora pa se položi na epitelno stran roženice. Obe komori sta pritrjeni skupaj s tremi vijaki iz nerjavnega jekla, ki so nameščeni na zunanji robovi komore. Na koncu vsake komore je stekleno okence, ki ga je mogoče za lažji dostop do roženice odstraniti. Med steklenim okencem in komoro je tesnilni obroček, ki preprečuje iztekanje. Skozi luknjici na vrhu vsake komore se vnašajo in odstranjujejo medij in preskusne kemikalije. Med tretiranjem in inkubacijo sta zaprti z gumijastimi čepki. Prenos svetlobe skozi držala za roženice se lahko spremeni, saj lahko učinki fizične obrabe ali kopičenja ostankov preskusnih kemikalij v luknjah notranje komore ali na steklenih okencih vplivajo na razpršitev svetlobe ali odbojnost. Posledice tega so lahko povečanje ali zmanjšanje izhodiščne vrednosti prenosa svetlobe (in, nasprotno, odčitkov izhodiščne vrednosti motnjave) skozi držala za roženice, kar se lahko opazi kot znatne spremembe pri pričakovanih meritvah izhodiščne začetne vrednosti motnjave roženice v posameznih komorah (to pomeni, da se lahko začetne vrednosti motnjave roženice v posebnih posameznih držalih za roženice od pričakovanih izhodiščnih vrednosti redno razlikujejo za več kot dve ali tri enote motnjave). Vsak laboratorij mora razmisliti o vzpostavitvi programa za ocenjevanje sprememb pri prenosu svetlobe skozi držala za roženice, in sicer glede na naravo preskušanih kemijskih lastnosti in pogostost uporabe komor. Za določitev izhodiščnih vrednosti se lahko držala za roženice pregledajo pred redno uporabo, tako da se izmerijo izhodiščne vrednosti motnjave (ali prenosa svetlobe) komor, popolnoma napolnjenih z medijem brez roženic. Držala za roženice se med obdobji uporabe nato redno pregledujejo, da se ugotovi, ali je pri prenosu svetlobe prišlo do sprememb. Vsak laboratorij lahko določi pogostost pregledovanja držal za roženice, in sicer glede na preskušene kemikalije, pogostost uporabe in opažene spremembe v izhodiščnih vrednostih motnjave roženice. Če se opazijo znatne spremembe pri prenosu svetlobe skozi držala za roženice, je treba razmisliti o ustreznih postopkih čiščenja in/ali poliranja notranje površine držal za roženice ali njihovi zamenjavi.

Držalo za roženico: tridimenzionalna risba držala z grafično ločenimi deli

⁽¹⁾ Navedene dimenzije se nanašajo na držala za roženico, ki se uporabljajo za krave, stare od 12 do 60 mesecev. Če se uporabljajo živali, stare od 6 do 12 mesecev, je treba držalo zasnovati tako, da je prostornina vsake komore 4 ml, premer obeh notranjih posodic 1,5 cm in njuna globina 2,2 cm. Pri vsakem novo zasnovanem držalu za roženico je pomembno, da je razmerje med izpostavljeno površino roženice in prostornino zadnje komore enako razmerju pri običajnih držalih za roženico. Tako se zagotovi, da se pravilno določijo vrednosti prepustnosti za izračun stopnje IVIS s predlagano formulo.

Dodatek 5

OPACITOMETER

Opacitometer je naprava, ki meri prenos svetlobe. Na primer pri opremi OP-KIT podjetja Electro Design (Riom, Francija), uporabljeni pri preskusni metodi BCOP, se svetloba halogene svetilke skozi kontrolni del (prazna komora brez okenc ali tekočine) usmeri v fotocelico in primerja s svetlobo, usmerjeno v fotocelico skozi preskusni del, v katerem je komora z roženico. Nato se primerja razlika v svetlobi, prenesene iz fotocelic, in se na digitalnem zaslonu prikaže numerična vrednost motnjave. Enote motnjave so že določene. Uporabijo se lahko druge vrste opacitometrov z drugačno zasnovo (npr. take, pri katerih vzporedne meritve v kontrolnem in poskusnem delu niso potrebne), če je dokazano, da lahko dajo podobne rezultate kot validirana oprema.

Opacitometer mora znotraj razpona odčitkov vrednosti motnjave zagotoviti linearni odziv, v katerem so upoštewane mejne vrednosti, ki se uporabljajo v različnih sistemih za razvrščanje, opisanih v modelu za napovedovanje (tj. do mejne vrednosti, ki določa jedkost/močno draženje). Da so izmerjene vrednosti do 75–80 enot motnjave linearne in natančne, je treba opacitometer umeriti s kalibratorji. Kalibratorji se vstavijo v komoro za umerjanje (komora za roženico, ki je zasnovana tako, da se vanjo lahko namestijo kalibratorji) in odčitavajo na opacitometru. Komora za umerjanje je zasnovana tako, da so kalibratorji na približno enaki oddaljenosti med svetlobo in fotocelico kot roženice med merjenjem prepustnosti. Referenčne in začetne nastavljene vrednosti so odvisne od vrste uporabljene opreme. Linearnost meritev prepustnosti je treba zagotoviti z ustreznimi postopki (za posamezne instrumente). Na primer za opremo OP-KIT podjetja Electro Design (Riom, Francija) je opacitometer najprej umerjen na enoto prepustnosti 0, pri čemer se uporabi komora za umerjanje brez kalibratorja. Nato se v komoro za umerjanje eden za drugim namestijo trije različni kalibratorji in izmeri prepustnost. Kalibratorji 1, 2 in 3 morajo zagotoviti odčitke prepustnosti, ki ustrezajo vnaprej določenim vrednostim 75, 150 oziroma 225 enot motnjave $\pm 5\%$.

(13) Poglavje B.48 dela B se nadomesti z naslednjim:

„B.48 Preskusna metoda na izoliranih očeh piščancev za opredelitev i) kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči, in ii) kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči

UVOD

Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD (TG) 438 (2013). Preskusno metodo na izoliranih očeh piščancev (Isolated Chicken Eye – preskusna metoda ICE) je v letih 2006 in 2010 ocenil Medagencijski koordinacijski odbor za validacijo alternativnih metod (ICCVAM) v sodelovanju z Evropskim centrom za validacijo alternativnih metod (ECVAM) ter Japonskim centrom za validacijo alternativnih metod (JaCVAM) (1) (2) (3). Pri prvem ocenjevanju je bila preskusna metoda ICE potrjena kot znanstveno veljavna preskusna metoda, ki se uporablja kot presejalni test za opredelitev kemikalij (snovi in zmesi), ki povzročajo hude poškodbe oči (kategorija 1), kot je opredeljeno v globalno usklajenem sistemu Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN) (1) (2) (4) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (CLP) ⁽¹⁾. Pri drugem ocenjevanju je bila preskusna metoda ICE ocenjena glede na svojo uporabnost kot presejalni test za opredelitev kemikalij, ki niso razvrščene glede na draženje oči ali hude poškodbe oči, kot je opredeljeno v GHS ZN (3) (4). Rezultati validacijske študije in priporočila odbora za medsebojni strokovni pregled so podprli prvotno priporočilo za uporabo preskusne metode ICE za razvrščanje kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči (kategorija 1 po GHS ZN), saj se razpoložljiva zbirka podatkov od prvotne validacije odbora ICCVAM ni spremenila. Na tej stopnji nadaljnja priporočila za razširitev področja uporabe preskusne metode ICE, da bi se vanjo vključile tudi druge kategorije, niso bila predlagana. Ponovno se je ocenila zbirka podatkov *in vitro* ter *in vivo*, uporabljenih v validacijski študiji, pri čemer se je osredotočilo na oceno uporabnosti preskusne metode ICE za opredelitev kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči (5). Pri tej ponovni oceni

⁽¹⁾ Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 31.12.2008, str. 1).

je bilo ugotovljeno, da se preskusna metoda ICE lahko uporabi tudi za opredelitev kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči, kot je opredeljeno v GHS ZN (4) (5). Ta preskusna metoda vključuje priporočeno uporabo in omejitve preskusne metode ICE, ki temeljijo na teh ocenah. Najpomembnejše razlike med prvotno različico smernic za preskušanje OECD iz leta 2009 in posodobljeno različico iz leta 2013 se nanašajo, niso pa omejene na: uporabo preskusne metode ICE za opredelitev kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na sistem za razvrščanje GHS ZN, posodobitev elementov poročila o preskusu, posodobitev Dodatka 1 o opredelitvah pojmov ter posodobitev Dodatka 2 o seznamu kemikalij za preverjanje usposobljenosti.

Zdaj na splošno velja, da Draizovega preskusa draženja oči *in vivo* v bližnji prihodnosti ne bo mogoče nadomestiti z enim samim preskusom draženja oči *in vitro*, da bi se predvidel celoten razpon dražilnih učinkov za različne kemijske razrede. Draizov preskus draženja oči pa bi morda lahko nadomestile strateške kombinacije več alternativnih preskusnih metod v okviru (večstopenjske) strategije preskušanja (6). Pristop od zgoraj navzdol (7) je treba uporabiti takrat, ko se na podlagi obstoječih informacij pričakuje, da bo imela kemikalija visok potencial draženja, pristop od spodaj navzgor (7) pa takrat, ko se na podlagi obstoječih informacij pričakuje, da kemikalija ne bo povzročila tolikšnega draženja oči, da bi jo bilo treba razvrstiti. Preskusna metoda ICE je metoda preskušanja *in vitro*, ki se lahko pod določenimi pogoji in s posebnimi omejitvami, kot so opisane v odstavkih od 8 do 10, uporabi za razvrstitev glede na nevarnosti za oči in označevanje kemikalij. Čeprav se preskusna metoda ICE ne obravnava kot veljaven samostojen nadomestek preskusa draženja oči *in vivo* na kuncih, se vseeno priporoča kot prvi korak preskusne strategije, kot je pristop od zgoraj navzdol, ki ga priporoča Scott idr. (7), za opredelitev kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči, tj. kemikalij, ki jih je treba v kategorijo 1 po GHS ZN razvrstiti brez nadaljnega preskušanja (4). Ta metoda je priporočljiva tudi za opredelitev kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči, kot je opredeljeno v sistemu GHS ZN (brez kategorije) (4), zaradi česar se lahko uporabi kot prvi korak v okviru strategije preskušanja od spodaj navzgor (7). Vendar če se s preskusno metodo ICE ne predvidi, da kemikalija povzroča hude poškodbe oči ali razvrstitev glede na draženje oči/hude poškodbe oči, bi bilo treba to kemikalijo dodatno preskusiti (*in vitro* in/ali *in vivo*), da se določi končna razvrstitev. Poleg tega se je treba pred uporabo pristopa od spodaj navzgor pri preskusni metodi ICE v okviru drugih sistemov za razvrščanje, ki niso GHS ZN, posvetovati z ustreznimi regulativnimi organi.

V tej preskusni metodi so opisani postopki za oceno potencialne nevarnosti preskusne kemikalije za oči glede na njeno (ne)zmožnost, da v izoliranem očesu piščanca povzroči toksičnost. Toksični učinki na roženico se merijo s: (i) kvalitativnim ocenjevanjem motnjave, (ii) kvalitativnim ocenjevanjem poškodbe epitelija na podlagi nanosa fluoresceina na oko (zadrževanje fluoresceina), (iii) kvantitativnim merjenjem povečane debeline (nabreklosti) in (iv) kvalitativnim ocenjevanjem makroskopske morfološke poškodbe na površini. Motnjava roženice, nabreklost in ocenjevanje poškodb po izpostavljenosti preskusni kemikaliji se najprej ocenijo posamično, nato pa združijo, da se lahko določi razvrstitev glede na draženje oči.

Opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

Ta preskusna metoda temelji na protokolu, predlaganem v Dokumentu s smernicami OECD št. 160 (8), ki je bil razvit na podlagi mednarodne validacijske študije (1) (3) (9) odbora ICCVAM, pri kateri so sodelovali Evropski center za validacijo alternativnih metod (ECVAM), Japonski center za validacijo alternativnih metod (JaCVAM) ter Oddelek za toksikologijo in uporabno farmakologijo nizozemskega Inštituta za raziskave TNO (Nizozemska). Protokol temelji na informacijah iz objavljenih protokolov ter protokolu, ki ga trenutno uporablja TNO (10) (11) (12) (13) (14).

V validacijski študiji, na kateri temelji ta preskusna metoda, je bil preizkušen širok nabor kemikalij, in v empirično zbirko podatkov validacijske študije je vključenih 152 kemikalij, od tega 72 snovi in 80 zmesi (5). Ta preskusna metoda se uporablja za trdne snovi, tekočine, emulzije in gele. Tekoče snovi so lahko vodne raztopine ali ne, trdne snovi so lahko topne ali netopne v vodi. Plini in aerosoli še niso bili ocenjeni v validacijski študiji.

Preskusna metoda ICE se lahko uporabi za opredelitev kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči, tj. kemikalij, ki jih je treba razvrstiti v kategorijo 1 po GHS ZN (4). Ko se opredeljene omejitve za preskusno metodo ICE uporabljajo za ta namen, temeljijo na visokem deležu lažno pozitivnih rezultatov za alkohole ter lažno negativnih rezultatov za trdne in površinsko aktivne snovi (1) (3) (9). Vendar delež lažno negativnih rezultatov v tem okviru (kategorija 1 po GHS ZN, ki je opredeljena, kot da ni kategorija 1 po GHS ZN) ni ključen, saj se vse preskusne kemikalije, ki se izkažejo za negativne, naknadno preskusijo z drugimi ustrezno potrjenimi preskusi *in vitro* ali –kot zadnja možnost – s preskusom na kuncih, in sicer glede na regulativne zahteve, pri čemer se uporabi strategija zaporednega preskušanja s pristopom, ki temelji na zanesljivosti dokazov. Opozoriti je treba, da lahko trdne snovi pri Draizovem preskusu draženja oči *in vivo* povzročijo spremenljive in ekstremne pogoje izpostavljenosti, zaradi česar je napoved njihovega resničnega potenciala draženja lahko brezpredmetna (15). Raziskovalci lahko razmislijo o uporabi te preskusne metode za vse vrste kemikalij, pri čemer je treba pozitiven rezultat sprejeti kot kazalnik za odziv, ki povzroča hude poškodbe oči, kar pomeni razvrstitev v kategorijo 1 po GHS ZN brez nadaljnega preskušanja. Vendar je treba pozitivne rezultate, pridobljene z uporabo alkoholov, razlagati previdno, saj obstaja tveganje, da je njihova vrednost precenjena.

Kadar se preskusna metoda ICE uporablja za opredelitev kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči (kategorija 1 po GHS ZN), je v primerjavi s podatki preskusa draženja oči *in vivo* na kuncih, razvrščenimi glede na sistem za razvrščanje GHS ZN (4) (5), njena splošna točnost 86-odstotna (120/140), delež lažno pozitivnih rezultatov je 6-odstoten (7/113), delež lažno negativnih rezultatov pa 48-odstoten (13/27).

Preskusna metoda ICE se lahko uporabi tudi za opredelitev kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na nevarnost draženja oči ali hudih poškodb oči v skladu s sistemom za razvrščanje GHS ZN (4). Preden se pri preskusni metodi ICE uporabi pristop od spodaj navzgor v okviru drugih sistemov za razvrščanje, se je treba posvetovati z ustreznimi regulativnimi organi. Ta preskusna metoda se lahko uporabi za vse vrste kemikalij, pri čemer se lahko negativen rezultat sprejme, kot da ne razvršča kemikalije glede na draženje oči ali hude poškodbe oči. Vendar se lahko na podlagi enega rezultata iz validacijske zbirke podatkov vrednosti za barve, ki vsebujejo organsko topilo proti obraščanju, podcenijo (5).

Kadar se preskusna metoda ICE uporablja za opredelitev kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči in hude poškodbe oči, je v primerjavi s podatki preskusa draženja oči *in vivo* na kuncih, razvrščenimi glede na sistem za razvrščanje GHS ZN (4) (5), njena splošna točnost 82-odstotna (125/152), delež lažno pozitivnih rezultatov je 33-odstoten (26/79), delež lažno negativnih rezultatov pa 1-odstoten (1/73). Kadar so iz zbirke podatkov izključene preskusne kemikalije iz določenih razredov (npr. organsko topilo proti obraščanju, ki ga vsebujejo barve), je točnost preskusne metode ICE glede na sistem za razvrščanje GHS ZN (4) (5) 83-odstotna (123/149), delež lažno pozitivnih rezultatov je 33-odstoten (26/78), delež lažno negativnih rezultatov pa 0-odstoten (0/71).

Preskusna metoda ICE ni priporočljiva za opredelitev preskusnih kemikalij, ki jih je treba razvrstiti kot dražilne za oči (kategorija 2 ali kategorija 2A po GHS ZN), ali preskusnih kemikalij, ki jih je treba razvrstiti kot zmerno dražilne za oči (kategorija 2B po GHS ZN), saj je precejšnje število kemikalij kategorije 1 po GHS ZN razvrščenih pre nizko, in sicer v kategorije 2, 2A ali 2B po GHS ZN, precejšnje število kemikalij brez kategorije po GHS ZN pa je razvrščenih previsoko, in sicer v kategorije 2, 2A ali 2B po GHS ZN. Zato je morda potrebno nadaljnje preskušanje z drugo ustrežno metodo.

Pri vseh postopkih na očeh piščancev je treba upoštevati veljavna pravila in postopke preskusnega laboratorija o ravnanju s človeškimi ali živalskimi materialom, kamor spadajo med drugim tudi tkiva in tkivne tekočine. Priporočajo se splošni previdnostni ukrepi za laboratorije (16).

Čeprav se pri preskusni metodi ICE ne proučujejo poškodbe veznice in šarenice, kot se ocenjuje pri preskusu draženja oči na kuncih, se obravnavajo učinki na roženico, ki so pomembno gonilo pri razvrščanju *in vivo* ob upoštevanju razvrščanja po GHS ZN. Čeprav s preskusno metodo ICE ni mogoče oceniti popravljivosti poškodb roženice kot take, je bilo na podlagi študij na očeh kuncev predlagano, da se lahko za opredelitev nekaterih vrst nepopravljivih učinkov uporabi ocena prvotne globine poškodbe roženice (17). Zlasti je potrebno nadaljnje znanstveno znanje, da bi razumeli, kako nastanejo nepopravljivi učinki, ki niso povezani z začetno hudo poškodbo. Treba je tudi opozoriti, da s preskusno metodo ICE ni mogoče oceniti potencialne sistemske toksičnosti, povezane z izpostavljenostjo oči.

Ta preskusna metoda se bo redno posodabljala ob upoštevanju novih informacij in podatkov. Kadar je potrebna popolnejša opredelitev poškodbe roženice, se je lahko uporabna na primer histopatologija. Za oceno te možnosti se uporabnikom priporoča, naj oči shranijo in pripravijo histopatološke vzorce, ki se lahko uporabijo pri ustvarjanju zbirke podatkov in oblikovanju meril za odločanje, s katerimi se lahko nadalje izboljša točnost te preskusne metode. OECD je pripravila dokument s smernicami za uporabo preskusnih metod *in vitro* za ugotavljanje toksičnosti za oči, ki vključuje podrobne postopke o zbirki histopatoloških vzorcev in informacije o tem, kam poslati vzorce in/ali histopatološke podatke (8).

Vsak laboratorij, ki ta preskus izvaja prvič, mora uporabiti kemikalije za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 2. Laboratorij lahko te kemikalije uporabi, da dokaže svojo tehnično usposobljenost za izvajanje preskusne metode ICE, preden podatke o tej metodi predloži za namene regulativne razvrstitve glede na nevarnosti.

NAČELO PRESKUSA

Preskusna metoda ICE je organotipski model, s katerim se piščančje oko za kratek čas ohrani *in vitro*. Pri tej preskusni metodi se poškodba, ki jo povzroči preskusna kemikalija, oceni tako, da se določijo nabreklost roženice, njena prepustnost in zadrževanje fluoresceina. Medtem ko se slednja parametra ocenjujeta kvalitativno, je treba nabreklost roženice oceniti kvantitativno. Vsaka meritev se bodisi pretvori v kvantitativni rezultat, ki se uporabi za izračun splošnega indeksa dražilnosti, bodisi kvalitativno razvrsti v kategorijo, ki se uporabi za razvrstitev glede na nevarnosti za oči *in vitro* kot kategorija 1 po GHS ZN ali brez kategorije po GHS ZN. Kateri koli od teh rezultatov se lahko uporabi za napoved, da je preskusna kemikalija zmožna povzročiti hude poškodbe oči *in vivo* ali da preskusne kemikalije ne bo treba razvrstiti glede na nevarnosti za oči (glej merila za odločanje). Vendar kemikalij, pri katerih se napove, da ne bodo povzročile hudih poškodb oči, ali ki glede na preskusno metodo ICE niso razvrščene (glej odstavek 11), ni mogoče razvrstiti.

Izvor in starost oči piščancev

Za ta preskus se običajno uporabljajo oči piščancev, ki so bili zaklani v klavnica in namenjeni za človeško prehrano, kar pomeni, da poskusne živali niso potrebne. Uporabljajo se samo oči zdravih živali, primernih za vstop v prehransko verigo človeka.

Čeprav kontrolirana študija za ocenjevanje najprimernejše starosti piščancev ni bila opravljena, so se v preteklih preskusih po tej metodi uporabljali mladi piščanci, ki so bili zaklani v klavnica (tj. piščanci, stari približno 7 tednov in teži od 1,5 do 2,5 kg).

Odvzem in prevoz oči v laboratorij

Glave se odstranijo neposredno po omamljanju piščancev, običajno z električnim šokom, in po izkrvavitvi zaradi prereza vratu. Piščanci morajo izhajati iz lokalnega vira v bližini laboratorija, tako da se njihove glave iz klavnice v laboratorij pripeljejo tako hitro, da se njihovo stanje čim manj poslabša in/ali čim bolj zmanjša možnost bakterijske okužbe. Čas od odvzema glav piščancev in vstavitve oči v komoro naprave za superfuzijo po odvzemu oči mora biti čim krajši (običajno manj kot dve uri), da se izpolnijo merila za sprejemljivost preskusa. Vse oči, uporabljene v preskusu, morajo pripadati isti skupini oči, odvzeti na določeni dan.

Ker se oči secirajo v laboratoriju, se nepoškodovane glave iz klavnice v laboratorij prepeljejo pri sobni temperaturi (običajno med 18 °C in 25 °C) v plastičnih posodah, ki so navlažene s krpami, prepojenimi s fiziološko raztopino.

Merila za izbor in število oči, uporabljenih v preskusni metodi ICE

Oči z močno izhodiščno obarvanostjo s fluoresceinom (tj. > 0,5) ali motno roženico (tj. > 0,5) po odvzemu se zavržejo.

Vsaka tretirana skupina in sočasna pozitivna kontrola sta sestavljeni iz vsaj treh oči. Za negativno kontrolno skupino ali kontrolo s topilom (če se namesto fiziološke raztopine uporablja drugo topilo) se uporabi vsaj eno oko.

V primeru trdnih materialov, pri katerih se pojavi rezultat brez kategorije po GHS ZN, je priporočljiva druga ponovitev s tremi očmi, da se negativni rezultat potrdi ali zavrže.

POSTOPEK

Priprava oči

Veke se pazljivo odstranijo, pri čemer je treba paziti, da se ne poškoduje roženica. Celovitost roženice se hitro oceni tako, da se na njeno površino za nekaj sekund nanese kapljica 2-odstotnega (m/v) natrijevega fluoresceina, površina pa se nato spere s fiziološko raztopino. Oči, obdelane s fluoresceinom, se nato pregledajo z biomikroskopom s špransko svetilko, da se preveri, ali je roženica nepoškodovana (tj. zadrževanje fluoresceina in motnjava roženice $\leq 0,5$).

Če je oko nepoškodovano, se izreže iz lobanje, pri čemer je treba paziti, da se roženica ne poškoduje. Zrklo se iz očesne votline potegne tako, da se žmurka trdno zagrabi s kirurškimi prijemalkami, očesne mišice pa se prerežejo z ukrivljenimi škarjami s topo konico. Tako se prepreči, da bi se roženica zaradi prevelikega tlaka poškodovala (tj. artefakti zaradi stisnjenja).

Ko se oko odstrani iz očesne votline, se ga mora še vedno držati viden del vidnega živca. Po odstranitvi iz očesne votline se oko položi na vpojno podlago, nato pa se odrežeta žmurka in preostalo vezno tkivo.

Izolirano oko se namesti v prijemalko iz nerjavnega jekla, tako da je roženica v navpičnem položaju. Prijemalka se nato prenese v komoro naprave za superfuzijo (18). Prijemalke je treba v napravi za superfuzijo namestiti tako, da kapljice fiziološke raztopine močijo celotno roženico (3 do 4 kapljice na minuto ali od 0,1 do 0,15 ml na minuto). Komore naprave za superfuzijo morajo imeti nadzorovano temperaturo, in sicer pri $32 \pm 1,5$ °C. V Dodatku 3 je diagram običajne naprave za superfuzijo s prijemalkami za oči, ki je na voljo na trgu, laboratoriji pa jo lahko izdelajo tudi sami. Naprava se lahko prilagodi potrebam posameznega laboratorija (tj. za različno število oči).

V napravi za superfuzijo se oči še enkrat pregledajo z biomikroskopom s špransko svetilko, s čimer se zagotovi, da se med seciranjem niso poškodovale. Pri tem se z nastavkom za merjenje globine na biomikroskopu na apeksu roženice izmeri tudi debelina roženice. Oči z (i) vrednostjo zadržanega fluoresceina > 0,5, (ii) motnjavo roženice > 0,5, ali (iii) dodatnimi znaki poškodb je treba zamenjati. Za oči, ki se na podlagi katerega koli od teh meril ne zavržejo, velja, da jih je treba vseeno zavreči, če se debelina roženice za več kot 10 % razlikuje od srednje vrednosti vseh oči. Uporabniki se morajo zavedati, da se lahko z biomikroskopi s špransko svetilko pri različnih širinah špranje pridobijo različne vrednosti meritev debeline roženice. Širino špranje je treba nastaviti na 0,095 mm.

Po tem ko se vse oči pregledajo in odobrijo, se inkubirajo za približno 45 do 60 minut, da se pred odmerjanjem uravnotežijo s preskusnim sistemom. Po obdobju uravnoteženja se kot izhodiščna vrednost za debelino in motnjavo roženice zabeleži nična vrednost (tj. čas = 0). Vrednost fluoresceina, določena pri seciranju, se uporabi kot izhodiščna vrednost za to končno točko.

Uporaba preskusne kemikalije

Takoj po meritvi z ničnimi referenčnimi vrednostmi se oko (skupaj z držalom) vzame iz naprave za superfuzijo in položi vodoravno, nato pa se na roženico nanese preskusna kemikalija.

Tekoče preskusne kemikalije se običajno preskusijo nerazredčene, po potrebi pa se lahko tudi razredčijo (tj. kot del zasnove študije). Kot topilo pri razredčenih preskusnih kemikalijah se najpogosteje uporablja fiziološka raztopina. V nadzorovanih pogojih pa se lahko uporabijo tudi druga topila, vendar je ustreznost topil, ki niso fiziološka raztopina, treba dokazati.

Tekoče preskusne kemikalije se na roženico nanesejo tako, da je celotna površina roženice enakomerno prekrita z njimi, pri čemer je standardna količina 0,03 ml.

Če je mogoče, se trdne preskusne kemikalije čim bolj zdrobijo v terilnici s pestilom ali primerljivim orodjem za drobljenje. Prašek se nanese na roženico tako, da je njena površina enakomerno prekrita s preskusno kemikalijo, pri čemer je standardna količina 0,03 g.

Preskusna kemikalija (tekoča ali trdna) se pusti učinkovati 10 sekund, nato pa se z očesa spere s fiziološko raztopino (približno 20 ml) pri sobni temperaturi. Nato se oko (skupaj z držalom) ponovno vstavi v napravo za superfuzijo, in sicer v prvotnem, pokončnem položaju. Po potrebi se lahko dodatno spere po 10-sekundnem učinkovanju in v poznejših časovnih točkah (npr. v primeru odkritja ostankov preskusne kemikalije na roženici). V splošnem dodatno uporabljena količina fiziološke raztopine ni ključnega pomena, pač pa je pomembno to, ali se opazi oprijemanje kemikalije na roženico.

Kontrolne kemikalije

V vsak poskus je treba vključiti sočasno negativno kontrolo ali kontrolo s topilom/vehiklom ter pozitivne kontrole.

Pri preskušanju 100-odstotnih tekočin ali trdnih snovi se kot primerjalna negativna kontrola pri preskusni metodi ICE uporablja fiziološka raztopina, da se odkrijejo nespecifične spremembe preskusnega sistema in da preskusni pogoji ne povzročajo neustreznih dražilnih reakcij.

Pri preskušanju razredčenih tekočin se v preskusno metodo vključi sočasna kontrolna skupina s topilom/vehiklom, da se odkrijejo nespecifične spremembe preskusnega sistema in da preskusni pogoji ne povzročajo neustreznih dražilnih reakcij. Kot je navedeno v odstavku 31, se lahko uporablja samo topilo/vehikel, za katerega je dokazano, da na preskusni sistem nima škodljivih učinkov.

V vsak poskus se kot sočasna pozitivna kontrola vključi znana dražilna snov za oči, da se preveri, ali se sproži zelena reakcija. Ker se preskus ICE pri tej preskusni metodi uporablja za opredelitev jedkih ali zelo dražilnih snovi, je treba za pozitivno kontrolo uporabiti tako referenčno kemikalijo, ki pri tej preskusni metodi povzroči močno reakcijo. Da se lahko oceni variabilnost odziva pozitivne kontrole v daljšem časovnem obdobju pa stopnja močnega odziva ne sme biti prevelika. Za pozitivno kontrolo je treba pridobiti dovolj podatkov *in vitro*, da se lahko izračuna statistično opredeljeno sprejemljivo območje pozitivne kontrole. Če za določeno pozitivno kontrolo ni na voljo ustreznih podatkov o preskusni metodi ICE iz preteklih preskusov, je treba opraviti študije, v katerih se bodo ti podatki zbrali.

Primeri pozitivnih kontrol za tekoče preskusne kemikalije sta 10-odstotna očetna kislina ali 5-odstoten benzalkonijev klorid, primera pozitivnih kontrol za trdne preskusne kemikalije pa natrijev hidroksid in imidazol.

Primerjalne kemikalije so primerne za ocenjevanje potenciala za draženje oči, ki ga imajo neznane kemikalije določenega kemijskega ali proizvodnega razreda, ali za ocenjevanje relativnega potenciala snovi za draženje oči v določenem razponu dražilnih učinkov.

Merjene končne točke

Tretirane roženice se ocenijo pred tretiranjem in nato 30, 75, 120, 180 in 240 minut (± 5 minut) po spiranju, opravljenem po tretiranju. S temi časovnimi točkami se omogoči ustrezno število meritev med štiriurnim tretiranjem in hkrati zagotovi dovolj časa, da se oči med posameznimi meritvami ustrezno pregledajo.

Končne točke, ki se ocenijo, so motnjava in nabreklost roženice, zadrževanje fluoresceina in morfološki učinki (tj. luknjičavost ali odstopanje epitelija). Vse končne točke razen zadrževanja fluoresceina (ki se oceni samo pred tretiranjem in 30 minut po izpostavljenosti preskusni kemikaliji) se ocenijo pri vsaki od navedenih časovnih točk.

Priporoča se, da se motnjava roženice, zadrževanje fluoresceina, morfološki učinki in morebitni histopatološki izvidi dokumentirajo.

Po tem ko se po štirih urah opravi končni pregled, se uporabnikom priporoča, naj oči shranijo v ustrezni fiksirni raztopini (tj. v nevtralnem formalinskem pufru), da se lahko po potrebi opravi histopatološki pregled (za podrobnosti glej odstavek 14 in vir (8)).

Nabreklost roženice se določi na podlagi meritev debeline roženice, opravljenih z optičnim pahimetrom na biomikroskopu s špranjso svetilko. Izrazi se v odstotkih in izračuna iz meritev debeline roženice z naslednjo formulo:

$$\left(\frac{\text{debelina roženice v času } t - \text{debelina roženice v času } = 0}{\text{debelina roženice v času } = 0} \right) \times 100$$

Srednja odstotna vrednost nabreklosti roženice vseh preskusnih oči se izračuna za vse časovne točke opazovanja. Na podlagi najvišje srednje vrednosti nabreklosti roženice, kot je bila opažena v kateri koli časovni točki, se za vsako preskusno kemikalijo določi skupna vrednost za posamezno kategorijo (glej odstavek 51).

Pri oceni motnjave roženice se upošteva predel roženice, ki je pri beleženju rezultatov najbolj moten (glej preglednico 1). Za vse časovne točke opazovanja se izračuna srednja vrednost motnjave roženice vseh preskusnih oči. Na podlagi najvišje srednje vrednosti motnjave roženice, kot je bila opažena v kateri koli časovni točki, se za vsako preskusno kemikalijo določi skupna vrednost za posamezno kategorijo (glej odstavek 51).

Preglednica 1

Vrednosti motnjave roženice

Vrednost	Opažanje
0	roženica ni motna
0,5	roženica zelo malo motna
1	posamična ali razpršena območja motnjave; podrobnosti šarenice jasno vidne
2	lahko razločljivo prosojno območje; podrobnosti šarenice rahlo zabrisane
3	zelo motna roženica; podrobnosti šarenice niso vidne; velikost zenice komaj razpoznavna
4	popolnoma motna roženica; šarenica ni vidna

Zadrževanje fluoresceina se oceni samo v časovni točki opazovanja po 30 minutah, kot je prikazano v preglednici 2. Nato se izračuna srednja vrednost zadržanega fluoresceina vseh preskusnih oči za časovno točko opazovanja po 30 minutah, ki se pri vsaki preskusni kemikaliji uporabi kot skupna vrednost za posamezno kategorijo (glej odstavek 51).

Preglednica 2

Vrednost zadržanega fluoresceina

Vrednost	Opazanje
0	ni zadržanega fluoresceina
0,5	zelo malo zadržanega fluoresceina v posameznih celicah
1	posamezne celice z nekaj fluoresceina, razpršene po tretiranem predelu roženice
2	točkaste ali zlite celice z veliko fluoresceina
3	velika zlita področja roženice, v katerih se zadržuje fluorescein

Morfološki učinki vključujejo „luknjičaste“ epitelne celice roženice, epitelij, ki odstopa, „grobno“ roženično površino in „prilepljenost“ preskusne kemikalije na roženico. Te ugotovitve so lahko različno resne in se lahko pojavijo istočasno. Razvrščanje teh ugotovitev poteka subjektivno v skladu z razlago raziskovalca.

PODATKI IN POROČANJE

Ocenjevanje podatkov

Rezultate za motnjavo in nabreklost roženice ter zadrževanje fluoresceina je treba oceniti ločeno, da se ustvari razred ICE za vsako končno točko. Razredi ICE za vsako končno točko se nato združijo, da se vsaka preskusna kemikalija lahko razvrsti v razred dražilnosti.

Merila za odločanje

Po oceni vsake končne točke se na podlagi vnaprej določenega območja določijo razredi ICE. Pri razlagi debeline roženice (preglednica 3), motnjave roženice (preglednica 4) in zadrževanja fluoresceina (preglednica 5) se uporabljajo štiri razredi ICE v skladu z spodnjimi lestvicami. Opozoriti je treba, da so vrednosti nabreklosti roženice iz preglednice 3 uporabne le, če je debelina izmerjena z biomikroskopom s špransko svetilko (npr. z modelom Haag-Streit BP900) z napravo za merjenje globine št. 1 in nastavitvijo širine špranje na 9½, kar ustreza 0,095 mm. Uporabniki se morajo zavedati, da se lahko z biomikroskopi pri različnih širinah špranje pridobijo različne vrednosti meritev debeline roženice.

Preglednica 3

Merila ICE za razvrstitev glede na nabreklost roženice

Srednja nabreklost roženice (v %) (*)	Razred ICE
0 do 5	I
> 5 do 12	II

Srednja nabreklost roženice (v %) (*)	Razred ICE
> 12 do 18 (> 75 min po tretiranju)	II
> 12 to 18 (\leq 75 min po tretiranju)	III
> 18 do 26	III
> 26 do 32 (> 75 min po tretiranju)	III
> 26 to 32 (\leq 75 min po tretiranju)	IV
> 32	IV

(*) Najvišja srednja vrednost, ki se opazi pri kateri koli časovni točki.

Preglednica 4

Merila ICE za razvrstitev motnjave roženice

Najvišja srednja vrednost motnjave (*)	Razred ICE
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–4,0	IV

(*) Najvišja srednja vrednost, ki se opazi pri kateri koli časovni točki (na podlagi vrednosti motnjave iz preglednice 1).

Preglednica 5

Merila ICE za razvrstitev glede na srednjo vrednost zadržanega fluoresceina

Srednja vrednost zadržanega fluoresceina 30 minut po tretiranju (*)	Razred ICE
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–3,0	IV

(*) Na podlagi vrednosti iz preglednice 2.

Razvrstitev preskusne kemikalije *in vitro* se oceni na podlagi razvrstitve po GHS ZN, ki ustreza kombinaciji kategorij, pridobljenih za nabreklost in motnjavo roženice ter zadrževanje fluoresceina, kot je navedeno v preglednici 6.

Preglednica 6

Splošne razvrstitve *in vitro*

Razvrstitev po GHS ZN	Kombinacije treh končnih točk
brez kategorije	3 × I 2 × I, 1 × II
napoved ni mogoča	druge kombinacije
kategorija 1	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) motnjava roženice ≥ 3 po 30 min (pri vsaj dveh očeh) motnjava roženice = 4 pri kateri koli časovni točki (pri vsaj dveh očeh) epitelij močno odstopa (pri vsaj enem očesu)

(*) Manj pogoste kombinacije.

Merila za sprejemljivost študije

Preskus se šteje za sprejemljivega, če so sočasne negativne kontrole ali kontrole z vehiklom/topilom opredeljene kot brez kategorije po GHS ZN, sočasne pozitivne kontrole pa kot kategorija 1 po GHS ZN.

Poročilo o preskusu

V poročilo o preskusu se vključijo naslednji podatki, če so pomembni za izvedbo študije:

Preskusna kemikalija in kontrolne kemikalije:

- kemijska imena, na primer strukturno ime, ki ga uporablja Služba za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS), ki jim sledijo druga imena, če so znana;
- registrska številka CAS (RN), če je znana;
- čistost in sestava preskusne/kontrolne kemikalije (v masnih odstotkih), če so ti podatki na voljo;
- fizikalno-kemijske lastnosti, pomembne za izvedbo študije, npr. agregatno stanje, vrednost pH, stabilnost, kemijski razred, topnost v vodi;
- obdelava preskusnih/kontrolnih kemikalij pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, drobljenje);
- stabilnost, če je znana.

Podatki o naročniku in preskuševalnem laboratoriju:

- ime in naslov naročnika, preskuševalnega laboratorija in vodje študije;
- podatki o viru oči (npr. obrat, v katerem so bile odvzete).

Pogoji preskusne metode:

- opis uporabljenega preskusnega sistema;

- uporabljeni biomikroskop s špranjsko svetilko (npr. model) in nastavitve tega uporabljenega instrumenta;
- sklic na rezultate negativnih in pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov in, če je ustrezno, podatki iz preteklih preskusov, ki dokazujejo sprejemljiva območja sočasne primerjalne kontrole;
- postopek, ki se je uporabil za zagotavljanje celovitosti (tj. točnosti in zanesljivosti) preskusne metode v daljšem časovnem obdobju (npr. redno preskušanje kemikalij za preverjanje usposobljenosti).

Zbiranje in priprava oči:

- teža in starost živali darovalke in druge posebne značilnosti živali, od katerih so bile pridobljene oči (npr. spol, sev), če so na voljo;
- pogoji hranjenja in prevoza oči (npr. datum in čas odvzema oči, čas od odvzema glav piščancev do vstavitve odvzetih oči v komoro naprave za superfuzijo);
- priprava in namestitev oči, vključno z izjavami glede njihove kakovosti, temperature komor za oči in merili za izbiro oči, uporabljenih za preskušanje.

Preskusni postopek:

- uporabljeno število ponovitev;
- opredelitev uporabljenih negativnih in pozitivnih kontrol (če je ustrezno, tudi kontrole s topilom in primerjalne kontrole);
- odmerek preskusne kemikalije, nanašanje in čas izpostavljenosti;
- časovne točke opazovanja (pred tretiranjem in po njem);
- opis uporabljenih meril za ocenjevanje in odločitev;
- opis uporabljenih meril za sprejemljivost študije;
- opis vseh prilagoditev preskusnega postopka.

Rezultati:

- preglednice s podatki o nabreklosti in prepustnosti roženice ter vrednosti zadržanega fluoresceina, pridobljeni za vsako posamezno oko in pri vsaki časovni točki opazovanja, vključno s srednjimi vrednostmi pri vsaki točki opazovanja za vse preskušene oči;
- najvišja ugotovljena srednja vrednost (v kateri koli časovni točki) nabreklosti in motnjave roženice ter vrednosti zadrževanja fluoresceina ter njena povezava z razredom ICE;
- opis vseh drugih opaženih učinkov;
- izpeljana razvrstitev po GHS ZN *in vitro*;
- fotografije oči, če je ustrezno.

Razprava o rezultatih

Sklepne ugotovitve

VIRI

- (1) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report – *In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives*. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH št. publikacije: 07-4517. Na voljo na: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.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. Na voljo na: <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. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH št. publikacije: 10-7553A. Na voljo na: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>.
 - (4) Združeni narodi (ZN) (2011). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS), četrta revidirana izdaja, ZN New York in Ženeva, 2011. Na voljo na: 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. Series on Testing and Assessment št. 188 (Dela 1 in 2), OECD, Pariz.
 - (6) Poglavje B.5 te priloge: Akutno draženje oči/jedkost za oči.
 - (7) Scott, L., Eskes, C., Hoffman, S., Adriaens, E., Alepee, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, 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. in 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*, zv. 24, str. 1–9.
 - (8) 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. Series on Testing and Assessment no. 160“, OECD, Pariz.
 - (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. NIH št. publikacije: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Na voljo na: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm.
 - (10) Prinsen, M. K. in 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 (INVITTOX) (2009). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, str. 13. Na voljo na: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>.
 - (12) Balls, M., Botham, P. A., Bruner, L. H. in 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. in 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. in Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Na voljo na: <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>.
 - (17) Maurer, J. K., Parker, R. D. in 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., York, M. in Lawrence, R.S. (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.-Toxicol.* 19, str. 471–480.
-

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Točnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov „ustreznosti“. Ta izraz in izraz „skladnost“ se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusne metode.

Primerjalna kemikalija: kemikalija, ki se uporablja kot standard za primerjavo s preskusno kemikalijo. Primerjalna kemikalija mora imeti naslednje značilnosti: (i) ima trajen in zanesljiv vir; (ii) je strukturno in funkcijsko podobna kemikalijam iz preskušane razreda, (iii) ima znane fizikalne/kemijske lastnosti, (iv) ima spremne podatke o znanih učinkih in (v) ima znano moč v razponu zelenega odziva.

Pristop od spodaj navzgor: stopenjski pristop, ki se uporablja za kemikalijo, za katero se domneva, da ne potrebuje razvrstitve glede na draženje oči ali hude poškodbe oči, pri čemer se najprej določijo kemikalije, ki ne potrebujejo razvrstitve (negativni rezultat), nato pa druge kemikalije (pozitivni rezultat).

Kemikalija: snov ali zmes.

Roženica: prozoren sprednji del zrkla, ki pokriva šarenico in zenico ter skozi katerega vstopa svetloba.

Motnjava roženice: merjenje stopnje motnjave roženice po izpostavljenosti preskusni kemikaliji. Povečana motnjava roženice pomeni, da je roženica poškodovana.

Nabreklost roženice: objektivna meritev stopnje raztezanja roženice pri preskusu ICE po izpostavljenosti preskusni kemikaliji. Izražena je kot odstotek, izračuna pa se iz meritev osnovne debeline roženice (pred odmerkom) in debeline, zabeležene v rednih intervalih po izpostavljenosti preskusni kemikaliji v preskusu ICE. Stopnja nabreklosti roženice je kazalnik poškodbe roženice.

Draženje oči: je povzročitev sprememb v očesu po nanosu preskusne kemikalije na sprednjo površino očesa, ki so v celoti popravljive v 21 dneh po nanosu. Ta pojem je sopomenka za „popravljive učinke na oči“ in „kategorijo 2 po GHS ZN“ (4).

Delež lažno negativnih rezultatov: delež vseh pozitivnih kemikalij, ki jih preskusna metoda zmotno prikaže kot negativne. To je eden od kazalnikov učinkovitosti preskusne metode.

Delež lažno pozitivnih rezultatov: delež vseh negativnih kemikalij, ki jih preskusna metoda zmotno prikaže kot pozitivne. To je eden od kazalnikov učinkovitosti preskusne metode.

Zadrževanje fluoresceina: subjektivna meritev stopnje natrijevega fluoresceina pri preskusu ICE, ki se zadrži v celicah epitelija v roženici po izpostavitvi preskusni kemikaliji. Stopnja zadržanega fluoresceina je kazalnik poškodb epitelija roženice.

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

Nepopravljivi učinki na oči: glej „Huda poškodba oči“ in „Kategorija 1 po GHS ZN“.

Zmes: zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi, ki v njej ne reagirajo (4).

Negativna kontrola: netretiran ponovljen vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema. Ta vzorec se obdela z vzorci, tretiranimi s preskusno kemikalijo, ali drugimi kontrolnimi vzorci, da se ugotovi, ali topilo reagira s preskusnim sistemom.

Brez razvrstitve: kemikalije, ki niso razvrščene glede na draženje oči (kategorija 2 po GHS ZN) ali hude poškodbe oči (kategorija 1 po GHS ZN). Ta pojem je sopomenka za „brez kategorije po GHS ZN“.

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

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusne metode v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih in interne laboratorijske obnovljivosti.

Popravljivi učinki na oči: glej „Draženje oči“ in „Kategorija 2 po GHS ZN“.

Huda poškodba oči: povzročitev poškodbe očesnega tkiva ali resne fizične okvare vida po nanosu preskusne kemikalije na sprednjo površino očesa, ki ni v celoti popravljiva v 21 dneh po nanosu. Ta pojem je sopomenka za „nepopravljive učinke na oči“ in „kategorijo 1 po GHS ZN“ (4).

Biomikroskop s špranjsko svetilko: instrument, ki se uporablja za neposredno preiskavo očesa in ki skupaj z binokularnim mikroskopom tvori pokončno stereomikroskopsko sliko. Pri preskusni metodi ICE se ta instrument uporablja za vpogled v sprednje strukture očesa piščanca ter za objektivno merjenje debeline roženice z nastavkom za merjenje globine.

Kontrola s topilom/vehiklom: netretiran vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema, vključno s topilom ali vehiklom, ki se obdela s vzorci, tretiranimi s preskusno kemikalijo, in drugimi kontrolnimi vzorci, da se določi izhodiščni odziv za vzorce, tretirane s preskusno kemikalijo, raztopljeno v istem topilu ali vehiklu. Pri preskušanju s sočasno negativno kontrolo ta vzorec tudi pokaže, ali topilo ali vehikel reagira s preskusnim sistemom.

Snov: kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo (4).

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

Pristop od zgoraj navzdol: stopenjski pristop, ki se uporablja za kemikalijo, za katero se domneva, da povzroča hude poškodbe oči, pri čemer se najprej določijo kemikalije, ki jih je treba razvrstiti (pozitivni rezultat), nato pa še druge kemikalije (negativni rezultat).

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

Večstopenjska strategija preskušanja: stopenjsko preskušanje, pri katerem se v posebnem vrstnem redu pregledajo vsi obstoječi podatki o preskusni kemikaliji, pri čemer se na vsaki stopnji uporabi postopek, ki temelji na zanesljivosti dokazov, da se določi, ali je pred nadaljevanjem na naslednji stopnji na voljo dovolj podatkov za odločitev o razvrstitvi kemikalije glede na nevarnost, ki jo povzroča. Če se za preskusno kemikalijo na podlagi razpoložljivih podatkov lahko določi potencial za draženje, dodatno preskušanje ni potrebno. Če preskusni kemikaliji na podlagi razpoložljivih podatkov ni mogoče določiti potenciala za draženje, se izvede postopno zaporedno testiranje na živalih, dokler kemikalije ni mogoče jasno razvrstiti.

Globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudi (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (4).

Kategorija 1 po GHS ZN: glej „Huda poškodba oči“ in/ali „Nepopravljivi učinki na oči“.

Kategorija 2 po GHS ZN: glej „Draženje oči“ in/ali „Popravljivi učinki na oči“.

Brez kategorije po GHS ZN: snovi, ki ne izpolnjujejo zahtev za razvrstitev v kategorijo 1 ali 2 (2A ali 2B) po GHS ZN. Ta pojem je sopomenka za „brez razvrstitve“.

Validirana preskusna metoda: preskusna metoda, za katero sta bili na podlagi izvedenih validacijskih študij določeni ustreznost (vključno s točnostjo) in zanesljivost za določen namen. Opozoriti je treba, da točnost in zanesljivost validirane preskusne metode nista nujno zadostni, da bi bila sprejemljiva za predlagani namen.

Zanesljivost dokazov: postopek obravnavanja prednosti in slabosti različnih informacij v okviru sprejemanja in utemeljevanja sklepne ugotovitve glede potenciala nevarnosti kemikalije.

Dodatek 2

KEMIKALIJE ZA PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI ZA PRESKUSNO METODO ICE

Pred redno uporabo te preskusne metode, ki izpolnjuje zahteve te preskusne metode, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost tako, da pravilno opredelijo razvrstitev glede na nevarnosti za oči za 13 kemikalij, priporočenih v preglednici 1. Te kemikalije so bile izbrane, ker predstavljajo celoten razpon odzivov pri nevarnostih za oči, temeljijo pa na rezultatih preskusa draženja oči *in vivo* na kuncih (TG 405) in sistemu za razvrščanje GHS ZN (tj. kategorije 1, 2A, 2B ali brez kategorije) (4) (6). Druga merila za izbiro so bila razpoložljivost kemikalij na trgu, razpoložljivost visokokakovostnih referenčnih podatkov *in vivo* in visokokakovostni podatki *in vitro* iz metode ICE. Referenčni podatki so na voljo v dokumentu s povzetkom (5) ter dokumentu ICCVAM o pregledu ozadja preskusne metode ICE (9).

Preglednica 1

Priporočene kemikalije za dokazovanje tehnične usposobljenosti za ICE

Kemikalija	Št. CAS	Kemijski razred (1)	Agregatno stanje	Razvrstitev <i>in vivo</i> (2)	Razvrstitev <i>in vitro</i> (3)
benzalkonijev klorid (5-odstotni)	8001-54-5	onijska spojina	tekočina	kategorija 1	kategorija 1
klorheksidin	55-56-1	amin, amidin	trdna snov	kategorija 1	kategorija 1
dibenzoil-L-vinska kislina	2743-38-6	karboksilna kislina, ester	trdna snov	kategorija 1	kategorija 1
imidazol	288-32-4	heterociklična spojina	trdna snov	kategorija 1	kategorija 1
trikloroacetna kislina (30-odstotna)	76-03-9	karboksilna kislina	tekočina	kategorija 1	kategorija 1
2,6-diklorobenzoil klorid	4659-45-4	kislinski halid	tekočina	kategorija 2A	napoved ni mogoča (4)
amonijev nitrat	6484-52-2	anorganska sol	trdna snov	kategorija 2A (5)	napoved ni mogoča (4)
etil-2-metil acetoacetat	609-14-3	keton, ester	tekočina	kategorija 2B	napoved ni mogoča (4)
dimetil sulfoksid	67-68-5	organska žveplova spojina	tekočina	brez kategorije	brez kategorije
glicerol	56-81-5	alkohol	tekočina	brez kategorije	brez kategorije (mejno)

Kemikalija	Št. CAS	Kemijski razred ⁽¹⁾	Agregatno stanje	Razvrstitev <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Razvrstitev <i>in vitro</i> ⁽³⁾
metilciklopentan	96-37-7	ogljikovodik (ciklični)	tekočina	brez kategorije	brez kategorije
n-heksan	110-54-3	ogljikovodik (aciklični)	tekočina	brez kategorije	brez kategorije
triacetin	102-76-1	lipid	tekočina	ni razvrščen	brez kategorije

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

⁽¹⁾ Vsaki preskusni kemikaliji so bili dodeljeni kemijski razredi, pri čemer se je uporabil standardni sistem za razvrščanje, ki temelji na sistemu za razvrščanje MeSH (na voljo na <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽²⁾ Na podlagi rezultatov preskusa draženja oči *in vivo* na kuncih (OECD TG 405) in z uporabo GHS ZN (4) (6).

⁽³⁾ Na podlagi rezultatov pri preskusni metodi ICE, kot so opisani v preglednici 6.

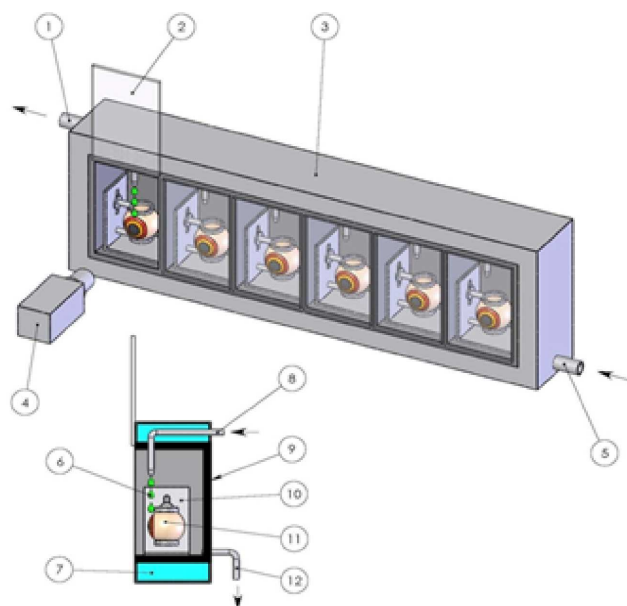
⁽⁴⁾ Kombinacija rezultatov preskusne metode ICE, ki niso opisani v preglednici 6, za opredelitev snovi brez kategorije ali kategorije 1 po GHS ZN (glej preglednico 6).

⁽⁵⁾ Razvrščanje v kategorijo 2A ali 2B je odvisno od razlage merila za razlikovanje med obema kategorijama po GHS ZN, in sicer ena od treh oziroma dve od treh živali, ki imajo na sedmi dan učinke, zaradi katerih je treba kemikalijo razvrstiti v kategorijo 2A. V študijo *in vivo* so bile vključene 3 živali. Vse končne točke, razen rdečine veznice na eni živali, so se do sedmega dne ali prej popravile in so dosegle vrednost nič. Pri eni živali, ki si do sedmega dne ni popolnoma opomogla, je rdečina veznice (na sedmi dan) dosegla vrednost 1, popolnoma pa si je opomogla deseti dan.

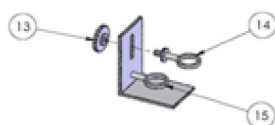
Dodatek 3

DIAGRAMI NAPRAVE ZA SUPERFUZIJO IN PRIJEMALK ZA OČI PRI ICE

(Za dodatne splošne opise naprave za superfuzijo in prijemalk za oči glej Burton idr. (18))



CROSS SECTION COMPARTMENT



EYE HOLDER

Št. dela	Opis	Št. dela	Opis
1	odvod tople vode	9	predelek
2	drsna vratca	10	držalo za oči
3	naprava za superfuzijo	11	oko piščanca
4	instrument za optično merjenje	12	odvod fiziološke raztopine
5	dovod tople vode	13	nastavni vijak
6	fiziološka raztopina	14	prilagodljiva zgornja opora
7	topla voda	15	fiksna spodnja opora
8	dovod fiziološke raztopine		

(14) Poglavje B.49 dela B se nadomesti z naslednjim:

„B.49 *In vitro* preskus mikronukleusov na celicah sesalcev

UVOD

Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD 487 (2016). Je del sklopa preskusnih metod o genetski toksikologiji. Pripravljen je dokument OECD, ki zagotavlja jedrnatne informacije o preskušanju v zvezi z genetsko toksikologijo in pregled nedavnih sprememb teh preskusnih smernic (1).

In vitro preskus mikronukleusov je preskus genotoksičnosti za odkrivanje mikronukleusov v citoplazmi celic v interfazi. Mikronukleusi lahko izvirajo iz acentričnih fragmentov kromosomov (kar pomeni, da so brez centromere) ali celih kromosomov, ki med anafazo celične delitve ne morejo potovati na pole. Zato je ta preskus metoda, ki zagotavlja celovito podlago za *in vitro* preiskovanje potenciala za povzročitev poškodb kromosomov, saj se lahko v celicah, pri katerih je med izpostavljenostjo preskusni kemikaliji ali po njej prišlo do delitve celic, zaznajo anevgene in klastogene snovi (2) (3) (za več podrobnosti glej odstavek 13). V mikronukleusih je vidna poškodba, ki se je prenesla na hčerinske celice, medtem ko se kromosomske aberacije v celicah v metafazi ne morejo prenesti. V vsakem primeru spremembe morda niso združljive s preživetjem celic.

Pri tej preskusni metodi je mogoče uporabiti protokole z inhibitorjem polimerizacije aktina citohalazinom B ali brez njega. Zaradi dodatka citohalazina B pred mitozo nastanejo celice z dvema jedroma, kar omogoča opredelitev in analizo mikronukleusov le v tistih celicah, v katerih se je zaključila ena mitoza (4) (5). S to preskusno metodo je tudi mogoče uporabiti protokole brez citokinetičnega bloka, če obstajajo dokazi, da se je pri analizirani celični populaciji zaključila mitoza.

Poleg uporabe *in vitro* preskusa mikronukleusov za opredelitev kemikalij, ki spodbujajo nastanek mikronukleusov, se lahko dodatne informacije o mehanizmih poškodb kromosomov in nastanka mikronukleusov pridobijo tudi z imunokemijskim označevanjem kinetohorov ali hibridizacijo s centromerno/telomerno sondo (fluorescenčna hibridizacija *in situ* (FISH)) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Navedena postopka označevanja in hibridizacije se lahko uporabita v primeru povečanega nastajanja mikronukleusov, ko želi raziskovalec ugotoviti, ali je povečanje nastalo zaradi klastogenih in/ali anevgenih dogodkov.

Ker se mikronukleusi v celicah v interfazi lahko ocenjujejo razmeroma objektivno, morajo zaposleni v laboratoriju določiti število celic z dvema jedroma samo, ko se uporabi citohalazin B, pojavnost celic z mikronukleusi pa v vseh primerih. Zato se lahko rezultati preparatov sorazmerno hitro zabeležijo, analiza pa je lahko avtomatizirana. Zaradi tega se lahko pri vsakem tretiranju praktično oceni na tisoče namesto na stotine celic, s čimer se poveča moč preskusa. Ker lahko mikronukleusi nastanejo iz zaostalih kromosomov, obstaja možnost zaznavanja snovi, ki povzročajo anevploidijo in se pri klasičnih preskusih kromosomskih aberacij težko proučujejo, gl. npr. Poglavje B.10 te priloge (18). Vendar *in vitro* preskus mikronukleusov, kot je opisan v tej preskusni metodi, ne omogoča razlikovanja med kemikalijami, ki povzročajo spremembe števila kromosomov in/ali ploidijo, in tistimi, ki povzročajo klastogenost, brez posebnih tehnik, kot je fluorescenčna hibridizacija *in situ* (FISH), omenjena v odstavku 4.

In vitro preskus mikronukleusov je zanesljiv in se lahko izvaja na različnih vrstah celic ter ob prisotnosti ali odsotnosti citohalazina B. Veljavnost *in vitro* preskusa mikronukleusov (MNvit), pri katerem se uporabljajo različne vrste celic (kulture celičnih linij ali primarne celične kulture), je mogoče podpreti z obsežnimi podatki (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). Ti vključujejo zlasti mednarodne validacijske študije, ki jih usklajuje Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (19) (20) (21) (22) (23), ter poročila International Workshop on Genotoxicity Testing (5) (17). Razpoložljivi podatki so bili tudi ponovno ocenjeni v retrospektivni validacijski študiji, ki temelji na zanesljivosti dokazov, ki jo je izvedel Evropski center za validacijo alternativnih metod (ECVAM) Evropske komisije, Znanstveni svetovni odbor ECVAM (ESAC) pa je preskusno metodo potrdil kot znanstveno veljavno (37) (38) (39).

Pri *in vitro* preskusu mikronukleusov se lahko uporabijo kulture celičnih linij ali primarne celične kulture človeškega ali glodalkega izvora. Ker pogostost mikronukleusov v ozadju vpliva na občutljivost preskusa, je priporočljivo uporabljati celične vrste s stabilno in opredeljeno pogostostjo nastajanja mikronukleusov v ozadju. Uporabljene celice se izberejo glede na njihovo zmožnost dobre rasti v kulturi, stabilnost kariotipa (vključno s kromosomskim številom) in pogostnost spontanov mikronukleusov (40). Na podlagi razpoložljivih podatkov za zdaj ni mogoče navesti trdnih priporočil, vendar je iz njih razvidno, da je treba pri ocenjevanju kemične nevarnosti upoštevati status beljakovine p53, gensko stabilnost (stabilnost kariotipa), sposobnost popravljanja DNK in izvor (glodalški/človeški) celic, izbranih za preskušanje. Uporabnikom te preskusne metode se torej priporoča, naj upoštevajo vpliv te in drugih lastnosti celic na uspešnost celične linije pri odkrivanju indukcije kromosomskih aberacij, medtem ko se razvija znanje na tem področju.

Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

Pri preskusih, izvedenih *in vitro*, je običajno treba uporabiti zunanji vir presnovne aktivacije, razen če so celice v zvezi s preskusno kemikalijo sposobne presnavljanja. Zunanji sistem presnovne aktivacije ne posnema pogojev *in vivo* v celoti. Paziti je treba, da se izogibamo pogojem, ki bi lahko povzročili lažno pozitivne rezultate, ki ne odražajo genotoksičnosti preskusnih kemikalij. Med take pogoje so vključene spremembe vrednosti pH (41) (42) (43) ali osmolarnosti, medsebojno delovanje s sestavinami celičnega gojišča (44) (45) ali previsoke ravni citotoksičnosti (glej odstavek 29).

Pri analizi nastanka mikronukleusov je bistveno, da mitozna poteče tako v tretiranih kot tudi netretiranih kulturah. Glede štetja mikronukleusov se največ podatkov pridobi s celicami, v katerih se je med tretiranjem s preskusno kemikalijo ali po njej zaključila ena mitozna. Pri proizvedenih nanomaterialih so potrebne posebne prilagoditve te preskusne metode, ki pa pri tej metodi niso opisane.

Pred uporabo te preskusne metode za preskušanje zmesi in pridobivanje podatkov za predvideni regulativni namen bi bilo treba proučiti, ali bo zagotovila sprejemljive rezultate za navedeni namen in, če jih bo, zakaj. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni.

NAČELO PRESKUSA

Človeške celične kulture ali celične kulture drugih sesalcev so preskusni kemikaliji izpostavljene z zunanjim virom presnovne aktivacije ali brez njega, razen če so uporabljene celice z ustrezno sposobnostjo metabolizma (glej odstavek 19).

Med izpostavljenostjo preskusni kemikaliji in po njej se celice gojijo dovolj dolgo, da so mogoči poškodba kromosomov ali drugi učinki na celični cikel/delitev celic, kar povzroči nastanek mikronukleusov v celicah v interfazi. Za nastanek aneuploidije mora biti običajno preskusna kemikalija prisotna med mitozo. Odvzete in obarvane celice v interfazi se analizirajo na prisotnost mikronukleusov. Mikronukleuse je treba po možnosti šteti samo v tistih celicah, v katerih se je mitozna zaključila med izpostavljenostjo preskusni kemikaliji ali v morebitnem obdobju po tretiranju. V kulturah, tretiranih z zaviralcem citokineze, se to zlahka doseže tako, da se štejejo le celice z dvema jedroma. Če se zaviralec citokineze ne uporabi, je treba dokazati, da se je v analiziranih celicah najverjetneje zaključila delitev celic, in sicer na podlagi povečanja celične populacije med izpostavljenostjo preskusni kemikaliji ali po njej. Pri vseh protokolih je treba dokazati, da je do celične proliferacije prišlo tako v kontrolnih kot tudi tretiranih kulturah, v vseh kulturah, pri katerih se štejejo mikronukleusi, pa je treba oceniti obseg citotoksičnosti ali citostaze, ki je nastala zaradi preskusne kemikalije.

OPIS METODE

Celice

Uporabijo se lahko gojeni primarni limfociti periferne krvi človeka ali drugih sesalcev (7) (20) (46) (47) in številne celične linije glodalcev, kot so celice CHO, V79, CHL/IU in L5178Y, ali človeške celične linije, kot je TK6 (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (glej odstavek 6). Pri preskušanju mikronukleusov so bile uporabljene tudi druge celične linije, kot so HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50) (51), celice HepG2 (52) (53), A549 in primarne embrionalne celice sirijskega hrčka (54), vendar zaenkrat še niso obširno validirane. Zato je treba uporabo navedenih celičnih linij in vrst utemeljiti na podlagi njihove dokazane učinkovitosti v preskusu, kot je opisano v oddelku o merilih za sprejemljivost. Poročalo se je o morebitnem vplivu citohalazina B na rast celic L5178Y, zato s to celično linijo ni priporočljiv (23). Pri uporabi primarnih celic je treba zaradi dobrobiti živali razmisliti o uporabi človeških primarnih celic, če je to izvedljivo, ter jih vzorčiti v skladu s človeškimi etičnimi načeli in predpisi.

Limfocite periferne krvi človeka je treba pridobiti od mladih oseb (starih med približno 18 in 35 let), ki ne kadajo, nimajo znanih bolezni ali niso bili nedavno izpostavljeni takim stopnjam genotoksičnih snovi (npr. kemikalijam, ionizirajočemu sevanju), zaradi katerih bi se povečala pojavnost celic z mikronukleusi v ozadju. Tako se zagotovi, da je pojavnost celic z mikronukleusi v ozadju nizka in konsistentna. Osnovna pojavnost celic z mikronukleusi se povečuje s starostjo in ta trend je izrazitejši pri ženskah kot pri moških (55). Če se za uporabo zberejo celice več kot enega darovalca, je treba navesti število darovalcev. Prikazati je treba, da so se celice delile od začetka tretiranja s preskusno kemikalijo do njihovega vzorčenja. Celične kulture se vzdržujejo v eksponentni fazi rasti celic (celične linije) ali se stimulira njihova delitev (primarne kulture limfocitov), da se izpostavijo celice v različnih fazah celičnega cikla, saj morda ni znano, kako so posamezne faze celičnega cikla občutljive na preskusne kemikalije. Primarne celice, katerih delitev je treba stimulirati z mitogeni, med izpostavljenostjo preskusni kemikaliji v splošnem niso več sinhronizirane (npr. človeški limfociti po 48-urni stimulaciji z mitogeni). Uporaba sinhroniziranih celic med tretiranjem s preskusno kemikalijo ni priporočljiva, vendar je lahko sprejemljiva, če se utemelji.

Gojišča in pogoji kultiviranja

Za vzdrževanje kultur je treba uporabiti ustrezno gojišče in pogoje inkubacije (posode za gojenje, vlažno ozračje s 5 % CO₂, če je ustrezno, temperatura inkubacije 37 °C). Redno je treba preverjati, ali je modalno kromosomsko število v celičnih linijah stabilno in ali te linije niso okužene z mikoplazmo; celice se ne smejo uporabljati, če so okužene ali če se je spremenilo modalno kromosomsko število. Določiti je treba običajno trajanje celičnega cikla celičnih linij ali primarnih kultur, uporabljenih v preskuševalnem laboratoriju, ki mora biti skladno z objavljenimi lastnostmi celic.

Priprava kultur

Celične linije: celice se namnožijo iz osnovnih kultur, nasadijo v gojišče tako na gosto, da celice v suspenzijah ali monosloju še naprej eksponentno rastejo do odvzema celic (npr. pri celicah, ki rastejo v monosloju, se je treba izogibati konfluenci).

Limfociti: celotna kri, obdelana z antikoagulantom (npr. heparinom), ali ločeni limfociti se dodajo v gojišče (človeški limfociti npr. za 48 ur), ki vsebuje mitogen (za človeške limfocite npr. fitohemaglutinin), da se spodbudi delitev celic pred izpostavitvijo preskusni kemikaliji in citohalazinu B.

Presnovna aktivacija

Pri uporabi celic z neustrezno notranjo sposobnostjo presnavljanja je treba uporabiti zunanje presnovne sisteme. Najpogosteje uporabljeni sistem, ki je priporočen kot privzet, razen če ni utemeljen drug sistem, je s kofaktorjem dopolnjena postmitohondrijska frakcija (S9), pripravljena iz jeter glodalcev (običajno podgan), ki so bila obdelana s sredstvi za encimsko indukcijo, kot je Aroclor 1254 (56) (57), ali z mešanico fenobarbitala in b-naftoflavona (58) (59) (60). Ta mešanica ni v nasprotju s Stockholmsko konvencijo o obstojnih organskih onesnaževalih (61) ter se je v primerjavi s sredstvom Aroclor 1254 izkazala kot enako učinkovita za povzročanje oksidaz z mešano funkcijo (58) (59) (60). Frakcija S9 se v končnem preskusnem gojišču običajno uporablja v koncentracijah, ki se gibljejo v razponu od 1 do 2 vol. %, lahko pa se poveča na 10 vol. %. Med tretiranjem se je treba izogibati kemičnim izdelkom, ki zmanjšujejo mitotični indeks, zlasti snovem, ki tvorijo kalcijev kompleks (62). Na izbiro vrste in koncentracije zunanjega sistema presnovne aktivacije ali sredstva za indukcijo presnove lahko vpliva razred kemikalij, ki se preskušajo.

Priprava preskusne kemikalije

Trdne preskusne kemikalije je treba pred tretiranjem celic pripraviti v ustreznih topilih in, če je ustrezno, razredčiti. Tekoče preskusne kemikalije se lahko dodajo neposredno v preskusni sistem in/ali razredčijo pred tretiranjem preskusnega sistema. Plinaste ali hlapne preskusne kemikalije je treba preskusiti z ustrezno prilagojenimi standardnimi protokoli, kot je tretiranje v zatesnjenih posodah za gojenje (63) (64) (65). Preskusne kemikalije je treba pripraviti tik pred tretiranjem, razen če podatki o stabilnosti kažejo, da je shranjevanje sprejemljivo.

Preskusni pogoji

Topila

Izbrati je treba tako topilo, ki optimizira topnost preskusnih kemikalij in ne vpliva negativno na izvedbo preskusa, tj. ne spremeni rast celic, ne vpliva na celovitost preskusne kemikalije, ne reagira s posodami za gojenje, ne ovira sistema presnovne aktivacije. Priporočljivo je, da se, kadar koli je to mogoče, najprej razmisli o uporabi vodnega topila (ali gojišča). Zelo uveljavljeni topili sta na primer voda ali dimetil sulfoksid (DMSO). Organska topila v splošnem ne smejo presegati 1 vol. %. Če se citohalazin B raztopi v DMSO, skupna količina organskega topila, ki se uporabi za preskusno kemikalijo in citohalazin B, ne sme presegati 1 vol. %; v nasprotnem primeru je treba uporabiti netretirane kontrole, da se zagotovi, da odstotek organskega topila nima škodljivega učinka. Vodna topila (fiziološka raztopina ali voda) v končnem obdelovalnem gojišču ne smejo presegati 10 vol. %. Če se uporabljajo neuveljavljena topila (npr. etanol ali aceton), je treba njihovo uporabo podpreti s podatki, ki dokazujejo njihovo združljivost s preskusno kemikalijo in preskusnim sistemom ter odsotnost genotoksičnosti pri uporabljeni koncentraciji. Če takšnih podpornih podatkov ni, je treba vključiti netretirane kontrole (glej Dodatek 1) ter kontrole s topilom, ki dokazujejo, da izbrano topilo ne povzroča škodljivih ali kromosomskih učinkov (npr. aneuploidije ali klastogenosti).

Uporaba citohalazina B kot zaviralca citokineze

Eden od najpomembnejših dejavnikov za uspešno izvedbo *in vitro* preskusa mikronukleusov je zagotavljanje, da se je v celicah, ki se štejejo, med tretiranjem ali v morebitnem obdobju inkubacije po tretiranju zaključila mitotična delitev. Zato mora biti število mikronukleusov omejeno na celice, v katerih med tretiranjem ali po njem poteka mitotična delitev. Citohalazin B je snov, ki se najpogosteje uporablja za zaviranje citokineze, saj zavira sestavljanje aktina in tako preprečuje ločevanje hčerinskih celic po mitotični delitvi, zaradi česar nastanejo celice z dvema jedroma (6) (66) (67). Kadar se uporabi citohalazin B, se lahko sočasno meri učinek preskusne kemikalije na kinetiko celične proliferacije. Citohalazin B je treba kot zaviralec citokineze uporabljati takrat, ko se uporabljajo človeški limfociti, saj se trajanje celičnih ciklov med različnimi darovalci razlikuje in se vsi limfociti ne odzivajo na stimulacijo s fitohemaglutininom (PHA). Ni pa obvezen za druge vrste celic, če se lahko ugotovi, da je v njih prišlo do delitve, kot je opisano v odstavku 27. Poleg tega se citohalazin B običajno ne uporablja, ko se v vzorcih ocenijo mikronukleusi z uporabo pretočnih citometričnih metod.

Laboratorij mora za vsako vrsto celic določiti ustrezno koncentracijo citohalazina B, da se doseže optimalna pogostost celic z dvema jedroma v kontrolnih kulturah s topilom, in dokazati je treba, da nastaja dober prirast celic z dvema jedroma za število. Ustrezna koncentracija citohalazina B je običajno od 3 do 6 µg/ml (19).

Merjenje celične proliferacije in citotoksičnosti ter izbira koncentracij za tretiranje

Pri določanju najvišje koncentracije preskusne kemikalije se je treba izogibati koncentracijam, pri katerih se lahko pojavijo lažni pozitivni odzivi, kot so tisti, ki povzročajo preveliko citotoksičnost (glej odstavke 29), obarvanje v gojiščih (glej odstavke 30) ali znatne spremembe vrednosti pH ali osmolarnosti (glej odstavke 9). Če preskusna kemikalija ob dodajanju povzroči znatno spremembo vrednosti pH v gojišču, se lahko vrednost pH prilagodi z dodajanjem pufru v končno obdelovalno gojišče, da se izogne lažno pozitivnim rezultatom in vzdržujejo ustrezni pogoji kultiviranja.

Z meritvami celične proliferacije se zagotovi, da med preskusom poteka mitotična delitev v zadostnem številu tretiranih celic in da se tretiranja izvedejo pri ustreznih ravneh citotoksičnosti (glej odstavke 29). Citotoksičnost je treba določiti v glavnem preskusu s presnovno aktivacijo ali brez nje ter pri tem uporabiti ustrezen kazalnik celične smrti in rasti (glej odstavke 26 in 27). Čeprav je lahko koristno, da se zaradi boljšega določanja koncentracij, ki jih je treba uporabiti v glavnem preskusu, citotoksičnost oceni v začetnem predhodnem preskusu, ta preskus ni obvezen. Če se izvede, ne sme nadomestiti merjenja citotoksičnosti v glavnem preskusu.

Tretiranje kultur s citohalazinom B in merjenje relativne pogostosti celic z enim, dvema ali več jedri v kulturi zagotavljata natančno metodo za količinsko opredelitev učinka na proliferacijo celic in citotoksično ali citostatično delovanje tretiranja (6) ter zagotavljata, da so pod mikroskopom preštete samo celice, pri katerih je prišlo do delitve med tretiranjem ali po njem. Za oceno citotoksičnega in citostatičnega delovanja tretiranja je priporočljivo uporabiti proliferacijski indeks citokinetskega bloka (cytokinesis-block proliferation index – CBPI) (6) (27) (68) ali indeks pomnoževanja (Replication Index – RI) vsaj 500 celic na kulturo (glej Dodatek 2 za formule), tako da se primerjajo vrednosti v tretirani in kontrolni kulturi. Z oceno drugih znakov citotoksičnosti (npr. celična neokrnjenost, apoptoza, nekroza, število v metafazi, celični cikel) se lahko pridobijo uporabne informacije, vendar se ne sme uporabiti namesto proliferacijskega indeksa citokinetskega bloka ali indeksa pomnoževanja.

V študijah brez citohalazina B je treba prikazati, da so se celice v kulturi delile, tako da je v precejšnjem deležu štetih celic prišlo do delitve med tretiranjem s preskusno kemikalijo ali po njem, sicer lahko nastanejo lažno negativni odzivi. Za oceno citotoksičnega in citostatičnega učinkovanja tretiranja se priporoča merjenje relativne podvojitve populacije ali relativnega povečanja števila celic (17) (68) (69) (70) (71) (glej Dodatek 2 za formule). Pri daljših časih izpostavljenosti (npr. tretiranje, ki traja od 1,5 do 2 dolžini normalnega celičnega cikla, in odvzem po dodatnih 1,5 do 2 dolžinah normalnega celičnega cikla, kar vodi do časov vzorčenja, daljših od 3 do 4 dolžine normalnega celičnega cikla skupaj, kot je opisano v odstavkih 38 in 39) se lahko pri relativni podvojitvi populacije vrednost citotoksičnosti podceni (71). V tem primeru je boljše merilo relativno povečanje števila celic ali pa je v pomoč ocena citotoksičnosti po 1,5 do 2 dolžinah normalnega celičnega cikla. Ocena drugih označevalcev citotoksičnosti ali citostaze (npr. celična neokrnjenost, apoptoza, nekroza, štetje v metafazi, indeks proliferacije, celični cikel, nukleoplazmatski mostički in jedrni brsti) lahko zagotovi uporabne dodatne informacije, vendar se ne sme uporabiti namesto proliferacijskega indeksa citokinetskega bloka ali indeksa pomnoževanja.

Oceniti je treba vsaj tri preskusne koncentracije (v kar niso vključeni topilo in pozitivne kontrole), ki izpolnjujejo merila za sprejemljivost (ustrezna citotoksičnost, število celic itd.). Ne glede na vrsto celic (celične linije ali primarne kulture limfocitov) se lahko pri vsaki preskušeni koncentraciji tretira ponovitev kulture ali le ena sama kultura. Čeprav je priporočljiva uporaba podvojenih kultur, je sprejemljiva tudi ena sama kultura, če je skupno število celic v eni kulturi ali ponovitvah kulture enako. Uporaba ene kulture je pomembna zlasti takrat, ko se ocenjujejo več kot 3 koncentracije (glej odstavek 44 in 45). Za analizo podatkov se lahko zberejo rezultati, pridobljeni iz neodvisnih ponovitev kulture pri določeni koncentraciji. Za preskusne kemikalije, ki kažejo malo ali nič citotoksičnosti, bodo ustrezni približno 2- do 3-kratni intervali med koncentracijami. V primeru citotoksičnosti morajo izbrane preskusne koncentracije zajemati območje iz navedene nastale citotoksičnosti, kot je opisano v odstavku 29, ter vključevati koncentracije, pri katerih je citotoksičnost zmerna oziroma majhna ali je ni. Pri številnih preskusnih kemikalijah so vidne strme krivulje odziva na koncentracijo, zato je treba za pridobitev podatkov za nizko in zmerno citotoksičnost ali podrobno proučevanje razmerja med odzivom in odmerkom uporabiti večje število koncentracij, ki so tesno skupaj, in/ali več kot tri koncentracije (ena kultura ali ponovitve kulture), zlasti kadar je treba poskus ponoviti (glej odstavek 60).

Če največja koncentracija temelji na citotoksičnosti, si je treba pri najvišji koncentraciji prizadevati, da citotoksičnost ne preseže razpona $55 \pm 5 \%$, pri čemer se uporabljajo priporočeni parametri citotoksičnosti (tj. zmanjšanje relativnega povečanja števila celic in relativne podvojitve populacije za celične linije, ko se citohalazin B ne doda, ter zmanjšanje proliferacijskega indeksa citokinetskega bloka ali indeksa pomnoževanja, ko se citohalazin B doda, na razpona $45 \pm 5 \%$ sočasne negativne kontrole) (72). Pozitivne rezultate, ki se nahajajo le na višjem koncu tega razpona citotoksičnosti, ki znaša $55 \pm 5 \%$, je treba razlagati previdno (71).

Pri slabo topnih preskusnih kemikalijah, ki pri koncentracijah, nižjih od najnižje netopne koncentracije, niso citotoksične, mora najvišja analizirana koncentracija ob koncu tretiranja s preskusno kemikalijo povzročiti nastanek motnosti ali oborine, ki je vidna s prostim očesom ali pod invertnim mikroskopom. Tudi če se citotoksičnost pojavi nad najnižjo netopno koncentracijo, je priporočljivo, da se preskusi le pri eni koncentraciji, ki povzroči nastanek motnosti ali vidne oborine, saj lahko oborina povzroči lažne učinke. Pri koncentraciji, ki povzroči nastanek oborine, je treba paziti, da oborina ne vpliva na izvedbo preskusa (npr. barvanje ali štetje). Koristno je lahko, če se pred preskusom določi topnost v gojišču.

Če oborina ni vidna ali ni opažene mejne citotoksičnosti, mora najvišja preskusna koncentracija ustrezati 10 mM, 2 mg/ml ali 2 µl/ml, pri čemer se upošteva najnižja od teh koncentracij (73) (74) (75). Če preskusna kemikalija nima določene sestave, kot so npr. snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali (UVCB) (76), okoljski ekstrakt itd., je v primeru odsotnosti ustrezne citotoksičnosti morda treba povečati najvišjo koncentracijo (npr. 5 mg/ml), da bi se povečala koncentracija vsake posamezne sestavine. Vendar je treba opozoriti, da se lahko pri zdravlilih za uporabo v humani medicini te zahteve razlikujejo (93).

Kontrole

V vsak odvzem celic je treba vključiti sočasne negativne kontrole (glej odstavek 21), sestavljene le iz topila v obdelovalnem gojišču, ki je obdelano enako kot kulture za tretiranje.

Sočasne pozitivne kontrole so potrebne, da se dokaže zmožnost laboratorija, da odkrije klastogene in anevgene pod pogoji uporabljenega preskusnega protokola, ter učinkovitost zunanega sistema presnovne aktivacije (če je ustrezno). Primeri pozitivnih kontrol so navedeni v preglednici 1. Za pozitivno kontrolo se lahko uporabijo tudi druge kemikalije, če je to utemeljeno.

Trenutno niso znani nobeni anevgeni, ki bi za svojo genotoksično delovanje potrebovali presnovno aktivacijo (17). Ker so preskusi genske toksičnosti *in vitro* za celice sesalcev dovolj standardizirani za kratkotrajna tretiranja, ki se izvedejo sočasno s presnovno aktivacijo in brez nje ter z enakim trajanjem tretiranja, je uporaba pozitivnih kontrol lahko omejena na klastogen, pri katerem je potrebna presnovna aktivacija. V tem primeru en sam klastogen odziv pri pozitivni kontroli dokaže tako dejavnost metabolnega sistema kot tudi odzivnost preskusnega sistema. Vendar je treba pri dolgotrajnem tretiranju (brez S9) uporabiti lastno pozitivno kontrolo, saj se trajanje tretiranja razlikuje od preskusa, pri katerem se uporablja presnovna aktivacija. Če se pri kratkotrajnem tretiranju s presnovno aktivacijo in brez nje za eno samo pozitivno kontrolo izbere klastogen, je treba pri dolgotrajnem tretiranju brez presnovne aktivacije izbrati anevgen. V celicah, ki so sposobne presnavljanja in ne potrebujejo S9, je treba za klastogenost in anevgenost uporabiti pozitivne kontrole.

Vsako pozitivno kontrolo je treba uporabiti pri eni ali več koncentracijah, pri katerih se pričakuje obnovljivo in zaznavno povečanje glede na ozadje, da se dokaže občutljivost preskusnega sistema (kar pomeni, da so učinki jasni, vendar pri odčitavanju ne razkrijejo takoj identitete označenih mikroskopskih preparatov), odziva pa ne sme ogroziti citotoksičnost, ki bi preseгла meje, določene za to preskusno metodo.

Preglednica 1

Referenčne kemikalije, ki se priporočajo za ocenjevanje usposobljenosti laboratorija in izbor pozitivne kontrole

Kategorija	Kemikalija	Št. CAS
1. Klastogeni, aktivni brez presnovne aktivacije		
	metil metansulfonat	66-27-3
	mitomicin C	50-07-7
	4-nitrokvinolin-N-oksidi	56-57-5
	citozin arabinozid	147-94-4
2. Klastogeni, pri katerih je potrebna presnovna aktivacija		
	benzo(a)piren	50-32-8
	ciklofosfamid	50-18-0

Kategorija	Kemikalija	Št. CAS
3. Anevgeni		
	kolhicin	64-86-8
	vinblastin	143-67-9

POSTOPEK

Časovni raspored tretiranja

Da bi bila verjetnost odkritja anevgenih ali klastogenih snovi, ki delujejo v določeni fazi celičnega cikla, čim večja, mora biti s preskusno kemikalijo tretirano zadostno število celic v vseh fazah njihovih celičnih ciklov. Vsa tretiranja je treba začeti in končati med eksponentno rastjo celic, celice pa morajo do vzorčenja še naprej rasti. Zato se lahko časovni raspored tretiranja za celične linije in primarne celične kulture nekoliko razlikuje od tistega za limfocite, pri katerih je treba začetek celičnega cikla stimulirati z mitogeni (17). Pri limfocitih je najučinkovitejši pristop ta, da se tretiranje s preskusno kemikalijo začne 44 do 48 ur po stimulaciji s fitohemaglutininom, ko se celice delijo asinhrono (6).

Iz objavljenih podatkov (19) je razvidno, da se anevgeni in klastogeni odkrijejo s kratkotrajnim tretiranjem, ki traja od 3 do 6 ur v prisotnosti S9 ali brez nje, čemur sledi odstranitev preskusne kemikalije in vzorčenje ob času, ki ustreza približno 1,5 do 2,0 dolžine normalnega celičnega cikla po začetku tretiranja (7).

Za temeljito oceno, ki bi bila potrebna za sklep o negativnem rezultatu, je treba izvesti vse tri naslednje preskusne pogoje ter pri tem uporabiti kratkotrajno tretiranje s presnovno aktivacijo in brez nje ter dolgotrajno tretiranje brez presnovne aktivacije (glej odstavke 56, 57 in 58):

- celice je treba za 3 do 6 ur izpostaviti preskusni kemikaliji brez presnovne aktivacije in vzorčiti ob času, ki ustreza približno 1,5 do 2,0 dolžine normalnega celičnega cikla po začetku tretiranja (19),
- celice je treba za 3 do 6 ur izpostaviti preskusni kemikaliji s presnovno aktivacijo in vzorčiti ob času, ki ustreza približno 1,5 do 2,0 dolžine normalnega celičnega cikla po začetku tretiranja (19),
- celice morajo biti kemikaliji nenehno izpostavljene brez presnovne aktivacije, dokler se ne vzorčijo ob času, ki ustreza približno 1,5 do 2,0 dolžine normalnega celičnega cikla.

Če so pri katerem koli od navedenih preskusnih pogojev rezultati pozitivni, morda ni treba raziskovati nobenih drugih režimov tretiranja.

Čas vzorčenja ali obnavljanja se lahko podaljša za nadaljnje 1,5 do 2,0 dolžine normalnega celičnega cikla (tj. skupno trajanje 3,0 do 4,0 dolžine celičnega cikla po začetku kratkotrajnega ali dolgotrajnega tretiranja), če je znano ali se domneva, da preskusna kemikalija vpliva na dolžino celičnega cikla (npr. pri preskušanju nukleozidnih analogov), zlasti za p53-kompetentnih celic (35) (36) (77). Te možnosti so namenjene primerom, kjer se lahko pojavijo pomisleki glede morebitnih interakcij med preskusno kemikalijo in citohalazinom B. Ko se uporabljajo daljši časi vzorčenja (tj. skupaj 3,0 do 4,0 dolžine celičnega cikla časa gojitve), je treba biti pozoren na to, da se celice še vedno dejavno delijo. Pri limfocitih se lahko na primer eksponentna rast po 96 urah po stimulaciji zmanjšuje in monoslojne celične kulture lahko postanejo konfluentne.

Priporočeni časovni razporedi tretiranja celic so predstavljeni v preglednici 2. Ti splošni časovni razporedi tretiranja se lahko prilagodijo (ob ustrezni utemeljitvi) glede na stabilnost ali reaktivnost preskusne kemikalije ali določene značilnosti rasti uporabljenih celic.

Preglednica 2

Trajanja tretiranja in odvzema celic pri *in vitro* preskusu mikronukleusov

Limfociti, primarne celice in celične linije, tretirane s citohalazinom B	+ S9 kratkotrajno tretiranje	Tretiranje traja od 3 do 6 ur v prisotnosti S9; odstranita se S9 in obdelovalni medij; dodata se svež medij in citohalazin B; celice se odvzamejo ob 1,5 do 2,0 dolžine normalnega celičnega cikla po začetku tretiranja.
	– S9 kratkotrajno tretiranje	Tretiranje traja od 3 do 6 ur; odstrani se obdelovalni medij; dodata se svež medij in citohalazin B; celice se odvzamejo ob 1,5 do 2,0 dolžine normalnega celičnega cikla po začetku tretiranja.
	– S9 daljše tretiranje	Tretiranje traja od 1,5 do 2 dolžini normalnega celičnega cikla v prisotnosti citohalazina B; celice se odvzamejo ob koncu obdobja tretiranja.

Celične linije, tretirane brez citohalazina B (enako kot prej navedeni časovni razporedi tretiranja, vendar brez dodajanja citohalazina B)

Pri monoslojnih kulturah so lahko po zaključku tretiranja, ki traja 3 do 6 ur, prisotne mitotične celice (so okrogle in se ločujejo od površine). Ker se te mitotične celice zlahka ločijo, se lahko ob odstranitvi gojišča s preskusno kemikalijo izgubijo. Če obstaja dokaz o znatnem povečanju števila mitotičnih celic v primerjavi s kontrolami, ki kažejo verjetno mitotično zaviranje, potem je treba celice zbrati s centrifugiranjem in jih dodati nazaj h kulturi, da ne bi izgubili celic, pri katerih poteka mitoza in pri katerih ob odvzemu celic obstaja tveganje nastanka mikronukleusov/kromosomske aberacije.

Odvzem celic in priprava preparatov

Vsako kulturo je treba odvzeti in obdelati ločeno. Priprava celic lahko vključuje hipotonično obdelavo, vendar to ni potrebno, če se ustrezno širjenje celic doseže tudi drugače. Za pripravo preparatov se lahko uporabijo različne tehnike, pod pogojem, da se za štetje pridobijo celični preparati visoke kakovosti. Celice z nedotaknjeno celično membrano in citoplazmo je treba ohraniti, da se omogoči odkrivanje mikronukleusov in (v primeru metode citokinetičnega bloka) zanesljiva opredelitev celic z dvema jedroma.

Preparati se lahko obarvajo z različnimi metodami, kot so barvila Giemsa ali DNK-specifična fluorescentna barvila. Uporaba ustreznih fluorescentnih barvil (npr. akridin oranž (78) ali Hoechst 33258 plus pyronin-Y (79)) lahko prepreči nastanek nekaterih artefaktov, povezanih z uporabo barvila, ki ni DNK-specifično. Antikinetohorna protitelesa, fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH) s pancentromernimi DNK-sondami ali primarno označevanje *in situ* s pancentromerno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi, skupaj z ustreznim nasprotnim barvanjem DNK, se lahko uporabijo za opredelitev vsebine (obarvajo se celi kromosomi, acentrični kromosomski delci pa ne) mikronukleusov, če se pridobivajo mehanistični podatki o njihovem nastanku (16) (17). Za razlikovanje med anevgenimi in klastogenimi snovmi se lahko uporabijo druge metode, če so se izkazale kot učinkovite in so validirane. Na primer pri določenih celičnih linijah se lahko pridobijo koristne informacije z meritvijo jedra sub-2N kot hipodiploidnega dogodka s tehnikami, kot so analiza slik, laserska vrstična citometrija ali pretočna citometrija (80) (81) (82). Znaki morebitne aneuploidije se lahko odkrijejo tudi z morfološkimi opazovanji jeder. Poleg tega je lahko uporaben način za določitev tega, ali so mikronukleusi posledica pretrganja kromosoma (pri čemer vemo, da se izguba kromosomov pri preskusu kromosomskih aberacij ne bi odkrila), preskus kromosomskih aberacij v metafazi, najbolje ob uporabi iste vrste celic in protokola s primerljivo občutljivostjo.

Analiza

Vse preparate, vključno s tistimi s kontrolo s topilom, netretiranimi (če se uporabljajo) in pozitivnimi kontrolami, je treba pred mikroskopsko analizo pogostosti mikronukleusov neodvisno označiti. Pri uporabi avtomatiziranega sistema štetja, na primer pretočne citometrije, laserske vrstične citometrije ali analize slike, je treba uporabiti ustrezne tehnike za nadzor kakršnih koli izkrivljanj ali sprememb. Ne glede na to, ali se za štetje mikronukleusov uporablja avtomatizirana platforma, je treba sočasno oceniti proliferacijski indeks citokinetskega bloka, indeks pomnoževanja, relativno podvojitev populacije ali relativno povečanje števila celic.

V kulturah, tretiranih s citohalazinom B, je treba pogostost mikronukleusov analizirati v vsaj 2 000 celicah z dvema jedroma na koncentracijo in kontrolo (83), enakomerno porazdeljenimi med ponovljenimi vzorci, če se ti uporabljajo. V primeru ene same kulture na odmerek (glej odstavek 28) je treba v tej eni kulturi šteti vsaj 2 000 celic z dvema jedroma na kulturo (83). Če je za štetje pri vsaki koncentraciji uporabljenih precej manj kot 1 000 celic z dvema jedroma na kulturo (v primeru dveh ponovitev kulture) ali 2 000 celic (v primeru ene same kulture) in če ni ugotovljeno znatno povečanje števila mikronukleusov, je treba preskus ponoviti z več celicami ali z manj citotoksičnimi koncentracijami, kar je ustrežnejše. Paziti je treba, da se ne štejejo celice z dvema jedroma, ki so nepravilnih oblik ali pri katerih se velikost jeder zelo razlikuje. Prav tako se celice z dvema jedroma ne smejo zamenjevati s slabo razširjenimi celicami z več jedri. Celice, ki imajo več kot dve glavni jedri, se ne analizirajo glede mikronukleusov, saj je lahko izhodiščna pogostost mikronukleusov v teh celicah večja (84). Štetje celic z enim jedrom je sprejemljivo, če je za preskusno snov znano, da vpliva na delovanje citohalazina B. V takih primerih je koristen ponovljen preskus brez citohalazina B. Uporabne informacije se lahko pridobijo s tem, da se poleg celic z dvema jedroma štejejo tudi celice z enim jedrom (85) (86), vendar to štetje ni obvezno.

V celičnih linijah, ki se preskušajo brez tretiranja s citohalazinom B, je treba mikronukleuse šteti v vsaj 2 000 celicah z dvema jedroma na koncentracijo in kontrolo (83), enakomerno porazdeljenimi med ponovljenimi vzorci, če se ti uporabljajo. V primeru uporabe ene kulture na koncentracijo (glej odstavek 28) je treba v tej kulturi v štetje vključiti vsaj 2 000 celic na kulturo. Če je za štetje pri vsaki koncentraciji na voljo znatno manj kot 1 000 celic (v primeru dveh ponovitev kulture) ali 2 000 celic (v primeru ene same kulture) in če ni ugotovljeno znatno povečanje števila mikronukleusov, je treba preskus ponoviti z več celicami ali z manj citotoksičnimi koncentracijami, kar je ustrežnejše.

Kadar se uporabi citohalazin B, je treba za oceno celične proliferacije določiti proliferacijski indeks citokinetskega bloka ali indeks pomnoževanja (glej Dodatek 2) na podlagi vsaj 500 celic na kulturo. Kadar se tretiranje izvaja v odsotnosti citohalazina B, je treba zagotoviti dokaz, da so se celice v kulturi delile, kot je obravnavano v odstavkih od 24 do 28.

Usposobljenost laboratorija

Preden se začne laboratorij uporabljati za rutinsko preskušanje, mora izvesti sklop preskusov z referenčnimi pozitivnimi kemikalijami, ki delujejo z različnimi mehanizmi (vsaj enega s presnovno aktivacijo in enega brez nje ter enega, ki deluje z anevgenim mehanizmom, pri čemer so kemikalije izbrane izmed kemikalij iz preglednice 1) ter različnimi negativnimi kontrolami (vključno z netretiranimi kulturami in različnimi topili/vehikli), s čimer dokaže, da ima zadostne izkušnje s preskusom. Ti odzivi pozitivnih in negativnih kontrol morajo biti skladni z viri. To ne velja za laboratorije, ki imajo izkušnje, tj. ki imajo na voljo zbirko podatkov iz preteklih preskusov, kot je opredeljena v odstavkih od 49 do 52.

Izbor kemikalij za pozitivno kontrolo (glej preglednico 1) je treba preiskati s kratkotrajnim ali dolgotrajnim tretiranjem brez presnovne aktivacije ter kratkotrajnim tretiranjem ob presnovni aktivaciji, da se dokaže usposobljenost za odkrivanje klastogenih in anevgenih kemikalij, določi učinkovitost sistema presnovne aktivacije ter dokaže ustreznost postopkov štetja (mikroskopska vizualna analiza, pretočna citometrija, laserska vrstična citometrija ali analiza slike). Izbrati je treba območje koncentracij izbranih kemijskih snovi, kar omogoča ponovljiva in s koncentracijo povezana povečanja glede na ozadje, da se pokaže občutljivost in dinamično območje preskusnega sistema.

Podatki o kontrolah iz preteklih preskusov

Laboratorij mora določiti:

- območje in porazdelitev pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov ter
- območje in porazdelitev negativnih kontrol (netretirane, topilo) iz preteklih preskusov.

Ko se podatki za porazdelitev negativnih kontrol iz preteklih preskusov pridobivajo prvič, morajo biti sočasne negativne kontrole skladne z objavljenimi podatki o kontrolah, če obstajajo. Ko se k porazdelitvi kontrol dodaja več podatkov o preskusu, sočasne negativne kontrole po možnosti ne bi smele preseči 95-odstotne kontrolne meje za navedeno porazdelitev (87) (88). Zbirka podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov mora sprva temeljiti na vsaj 10 preskusih, po možnosti pa mora biti sestavljena iz vsaj 20 preskusov, izvedenih v primerljivih poskusnih pogojih. Laboratoriji morajo uporabljati metode nadzora kakovosti, kot so kontrolne karte (npr. c-karte ali „X-črta“ karte (88)), da opredelijo, kako variabilni so njihovi podatki o pozitivnih in negativnih kontrolah, in pokažejo, da je metodologija v njihovem laboratoriju „pod nadzorom“ (83). Nadaljnja priporočila o načinu oblikovanja in uporabe podatkov iz preteklih preskusov (tj. merila za vključitev podatkov med podatke iz preteklih preskusov in njihovo izključitev iz teh podatkov ter merila za sprejemljivost za zadevni poskus) so navedena v virih (87).

Vsako spremembo v protokolu poskusa je treba proučiti glede na skladnost z obstoječimi zbirkami podatkov laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov. Če se pojavijo večje neskladnosti, je treba ustvariti novo zbirko podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov.

V podatke o negativnih kontrolah je treba vključiti pojav celic z mikronukleusi iz ene kulture ali vsote ponovitev kulture, kot je opisano v odstavku 28. Sočasne negativne kontrole po možnosti ne smejo preseči 95-odstotne kontrolne meje porazdelitve iz zbirke podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (87) (88). Kadar podatki o sočasni negativni kontroli presežejo 95-odstotno kontrolno mejo, jih je sprejemljivo vključiti v porazdelitev kontrol iz preteklih preskusov, če ti podatki niso izjemni osamelci ter če obstaja dokaz, da je preskusni sistem „pod nadzorom“ (glej odstavek 50), in dokaz o odsotnosti tehničnih ali človeških napak.

PODATKI IN POROČANJE

Predstavitev rezultatov

Če se uporabi tehnika citokinetskega bloka, se pri ocenjevanju nastajanja mikronukleusov uporabi samo pogostost celic z dvema jedroma z mikronukleusi (ne glede na število mikronukleusov na celico). O štetju števila celic z enim, dvema ali več jedri se lahko poroča ločeno in s takim štetjem se lahko pridobijo uporabne informacije, vendar ni obvezno.

Določiti je treba sočasne meritve citotoksičnosti in/ali citostaze za vse tretirane, pozitivne in negativne kontrolne kulture (16). Pri uporabi metode citokinetskega bloka je treba za vse tretirane in kontrolne kulture izračunati proliferacijski indeks citokinetskega bloka ali indeks pomnoževanja kot merilo zakasnitve celičnega cikla. V odsotnosti citohalazina B je treba uporabiti relativno podvojitev populacije ali relativno povečanje števila celic (glej Dodatek 2).

Navedejo se podatki za posamezne kulture. Poleg tega se vsi podatki povzamejo v obliki preglednice.

Merila za sprejemljivost

Sprejemljivost preskusa temelji na naslednjih merilih:

- Šteje se, da je sočasna negativna kontrola sprejemljiva za vključitev v zbirko podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov, kot je opisano v odstavku 50.
- Sočasne pozitivne kontrole (glej odstavek 50) morajo povzročiti odzive, ki so skladni z odzivi iz zbirke podatkov laboratorija o pozitivnih kontrolah iz preteklih poskusov, in statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo.
- Izpolnjena morajo biti merila za celično proliferacijo v kontroli s topilom (odstavki od 25 do 27).
- Preskušeni so bili vsi preskusni pogoji, razen če so pri enem nastali pozitivni rezultati (odstavki od 36 do 40).
- Analizirati je mogoče ustrezno število celic in koncentracij (odstavki 28 ter od 44 do 46).
- Merila za izbor najvišje koncentracije so skladna z merili, opisanimi v odstavkih od 24 do 31.

Vrednotenje in razlaga rezultatov

Pod pogojem, da so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje kot jasno pozitivna, če se v katerem koli od proučevanih preskusnih pogojev (glej odstavke od 36 do 39):

- pri vsaj eni od preskusnih koncentracij pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo (89),
- je pri vsaj enem poskusnem pogoju povečanje povezano z odmerkom, kadar se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom (glej odstavek 28),
- je kateri koli od rezultatov zunaj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi, glej odstavek 52).

Ko so izpolnjena vsa ta merila, se nato šteje, da lahko preskusna kemikalija povzroči prelome kromosomov in/ali pridobitev ali izgubo v tem preskusnem sistemu. Priporočila glede najustrežnejših statističnih metod so navedena tudi v virih (90) (91) (92).

Pod pogojem, da so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno negativno, če se v katerem koli od proučevanih preskusnih pogojev (glej odstavke od 36 do 39):

- pri nobeni od preskusnih koncentracij ne pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;
- ne pojavi povečanje, povezano z odmerkom, kadar se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom;
- vsi rezultati nahajajo znotraj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi; glej odstavek 52).

Nato se šteje, da preskusna kemikalija ne more povzročiti preloma kromosomov in/ali pridobitve ali izgube v tem preskusnem sistemu. Priporočila glede najustrežnejših statističnih metod so navedena tudi v virih (90) (91) (92).

Preverjanje jasno pozitivnega in jasno negativnega odziva ni potrebno.

Če odziv ni niti jasno negativen niti jasno pozitiven, kot je opisano zgoraj, in/ali za podporo pri ugotavljanju biološke pomembnosti rezultatov, je treba podatke oceniti s strokovno presojo in/ali nadaljnjimi preiskavami. Štetje dodatnih celic (po potrebi) ali izvedba ponovitve poskusa je lahko koristna, po možnosti z uporabo spremenjenih preskusnih pogojev (npr. razmik med koncentracijami, drugi pogoji za presnovno aktivacijo [tj. koncentracija ali izvor S9]).

Zbirka podatkov v redkih primerih celo po izvedbi nadaljnjih preiskav onemogoča sprejetje sklepa o pozitivnih ali negativnih rezultatih, zato se zaključí, da je odziv dvoumen.

Preskusne kemikalije lahko pri *in vitro* preskusu mikronukleusov povzročijo nastanek mikronukleusov zato, ker povzročajo prelom ali izgubo kromosomov ali pa oboje hkrati. Za ugotovitev, ali je mehanizem za nastajanje mikronukleusov posledica klastogenega in/ali aneugenega delovanja, se lahko izvede nadaljnja analiza z uporabo antikinetohornih protiteles, *in situ* sond, specifičnih za centromere, ali drugih metod.

Poročilo o preskusu

V poročilo o preskusu se vključijo naslednji podatki:

Preskusna kemikalija:

- vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;
- stabilnost preskusne kemikalije, če je znana;
- reaktivnost preskusne kemikalije s topilom/vehiklom ali gojiščem celic;
- topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu/nosilcu, če sta znani;
- meritve vrednosti pH, osmolarnosti in oborine v gojišču, ki mu je bila dodana preskusna kemikalija, če je ustrezno.

Snov iz ene sestavine:

- fizični videz, topnost v vodi in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti;
- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

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

Topilo:

- utemeljitev izbire topila;
- odstotek topila v končnem gojišču.

Celice:

- vrsta in izvor uporabljenih celic;
- ustreznost uporabljene vrste celic;
- za celične linije – odsotnost mikoplazme;
- za celične linije – informacije o trajanju celičnega cikla, podvojitvenem času ali indeksu proliferacije;
- pri uporabi limfocitov – spol donorjev krvi, starost in vse pomembne informacije o donorju, uporabljeni krvi v celoti ali ločenih limfocitih, mitogenih;
- običajno trajanje celičnega cikla (negativne kontrole);
- za celične linije – število pasaž, če je na voljo;
- za celične linije – metode vzdrževanja celičnih kultur;
- za celične linije – modalno število kromosomov.

Preskusni pogoji:

- identiteta snovi za citogenetski blok (npr. cytoB), če je uporabljena, njena koncentracija in trajanje izpostavljenosti celic;
- koncentracija preskusne kemikalije, izražena kot končna koncentracija v gojišču (npr. v μg ali mg/ml ali mM gojišča);
- razlogi za izbiro koncentracij in števila kultur, vključno s podatki o citotoksičnosti in mejah topnosti;
- sestava gojišča, koncentracija CO_2 , če je na voljo, stopnja vlažnosti;
- koncentracija (in/ali volumen) topila in preskusne kemikalije, ki se dodata v gojišče;
- inkubacijska temperatura in čas trajanja inkubacije;
- trajanje tretiranja;
- odvzem celic po tretiranju;
- gostota celic ob nasaditvi, če je ustrezno;
- vrsta in sestava sistema presnovne aktivacije (vir S9, način priprave zmesi S9, koncentracija ali volumen zmesi S9, S9 v končnem gojišču, nadzor kakovosti S9 (npr. encimska aktivnost, sterilnost, presnovna zmogljivost));
- kemikalije pozitivne in negativne kontrole, končne koncentracije, pogoji in trajanje tretiranja ter obdobja obnavljanja;
- metode priprave preparatov in uporabljene tehnike barvanja;
- merila za štetje celic z mikronukleusi (izbira celic, primernih za analizo, in opredelitev mikronukleusov);
- števila analiziranih celic;

- metode merjenja citotoksičnosti;
- vsi dodatni podatki, pomembni za citotoksičnost in uporabljeno metodo;
- merila za obravnavanje študij kot pozitivnih, negativnih ali dvoumnih;
- uporabljene metode statistične analize;
- metode, kot so uporaba antikinetohornih protiteles ali pancentromerno specifičnih sond, da se ugotovi, ali mikronukleusi vsebujejo cele kromosome ali njihove fragmente, če je ustrezno;
- uporabljene metode za določitev vrednosti pH, osmolarnosti in obarjanja.

Rezultati:

- opredelitev celic, sprejemljivih za analizo;
- ob odsotnosti citohalazina B število tretiranih celic in število odvzetih celic za vsako kulturo v primeru celičnih linij;
- uporabljena meritev citotoksičnosti, npr. proliferacijski indeks citokinetskega bloka ali indeks pomnoževanja v primeru metode citokinetskega bloka; relativno povečanje števila celic ali relativna podvojitev populacije, če se metode citokinetskega bloka ne uporabljajo; morebitna druga opažanja (npr. konfluentnost celic, apoptoza, nekroza, štetje v metafazi, pogostost celic z dvema jedroma);
- znaki obarjanja in čas odkritja;
- podatki o vrednosti pH in osmolarnosti obdelovalnega gojišča, če sta bili določeni;
- porazdelitev celic z enim, dvema ali več jedri v primeru uporabe metode citokinetskega bloka;
- število celic z mikronukleusi, navedeno ločeno za vsako tretirano in kontrolno kulturo, ter po potrebi opredelitev, ali so iz celic z dvema ali enim jedrom;
- razmerje med koncentracijo in odzivom, kadar je mogoče;
- podatki o sočasnih negativnih (s topilom) in pozitivnih kontrolah (koncentracije in topila);
- podatki o negativnih (s topilom) in pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov, skupaj z razponi, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni ter 95-odstotnimi kontrolnimi mejami za porazdelitev, pa tudi število podatkov;
- statistična analiza; p-vrednosti, če obstajajo.

Razprava o rezultatih

Sklepne ugotovitve

VIRI

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, št. 234, OECD, Pariz.
- (2) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research*, zv. 392/1–2, str. 1–4.
- (3) Parry, J. M. in Sors, A. (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Research*, zv. 287/1, str. 3–15.
- (4) Fenech, M. in Morley, A. A. (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios*, zv. 43/172–173, str. 233–246.

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

- (23) Oliver, J. idr. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Research*, zv. 607/1, str. 125–152.
- (24) Albertini, S. idr. (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Research*, zv. 392/1–2, str. 187–208.
- (25) Miller, B. idr. (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research*, zv. 392/1–2, str. 45–59.
- (26) Miller, B. idr. (1998). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft für Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Research*, zv. 410, str. 81–116.
- (27) Kalweit, S. idr. (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches. *Mutation Research*, zv. 439/2, str. 183–190.
- (28) Kersten, B. idr. (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research*, zv. 445/1, str. 55–71.
- (29) von der Hude, W. idr. (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*, zv. 468/2, str. 137–163.
- (30) Garriott, M. L., Phelps J. B. in Hoffman, W. P. (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*, zv. 517/1–2, str. 123–134.
- (31) Matsushima, T. idr. (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis*, zv. 14/6, str. 569–580.
- (32) Elhajouji, A. in Lorge, E. (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research*, zv. 607/1, str. 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*, zv. 702/2, str. 139–147.
- (34) Hashimoto, K. idr. (2011). Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, zv. 59/1, str. 28–36.
- (35) Honma, M. in Hayashi, M. (2011). Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 52/5, str. 373–384.
- (36) Zhang, L. S. idr. (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research Letters*, zv. 347/3–4, str. 105–115.
- (37) ECVAM (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. 25. sestanek odbora ESAC, 16.–17. novembra 2006. Na voljo na: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- (38) ESAC (2006). ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Na voljo na: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- (39) Corvi, R. idr. (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis*, zv. 23/4, str. 271–283.

- (40) ILSI paper (osnutek). Lorge, E., Moore, M. M., Clements, J., O'Donovan, M., Honma, M., Kohara, A., van Benthem, J., Galloway, S., Armstrong, M. J., Sutter, A., Thybaud, V., Gollapudi, B., Aardema, M. in Young-Tannir, J. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. *Mutation Research*.
- (41) Scott, D. idr. (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Research*, zv. 257/2, str. 147–205.
- (42) Morita, T. idr. (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research*, zv. 268/2, str. 297–305.
- (43) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environmental Mutagenesis*, zv. 8/6, str. 789–886.
- (44) Long, L. H. idr. (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*, zv. 634/1–2, str. 177–183.
- (45) Nesslany, F. idr. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation*, zv. 49, str. 439–452.
- (46) Fenech, M. in Morley, A. A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, zv. 147/1–2, str. 29–36.
- (47) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research*, zv. 392, str. 11–18.
- (48) Payne, C. M. idr. (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*, zv. 62/6, str. 825–840.
- (49) Bazin, E. idr. (2010). Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin, Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 51/3, str. 251–259.
- (50) Le Hegarat, L. idr. (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cells by the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, zv. 25/6, str. 555–560.
- (51) Josse, R. idr. (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay. *Mutagenesis*, zv. 27/3, str. 295–304.
- (52) Kalweit, S. idr. (2002). Fumonisin B₁ is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis*, zv. 17/3, str. 257–260.
- (53) Knasmüller, S. idr. (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology*, zv. 198/1–3, str. 315–328.
- (54) Gibson, D. P. idr. (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*, zv. 392/1–2, str. 61–70.
- (55) Bonassi, S. idr. (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*, zv. 37/1, str. 31–45.
- (56) Maron, D. M. in Ames, B. N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, zv. 113/3–4, str. 173–215.
- (57) Ong, T.-m. idr. (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*, zv. 4/1, str. 55–65.

- (58) Elliott, B. M. idr. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, zv. 7, str. 175–177.
- (59) Matsushima, T. idr. (1976). „A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems“, v *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F. J. idr. (eds.), Elsevier, North-Holland, str 85–88.
- (60) Johnson, T. E., Umbenhauer, D. R. in Galloway, S. M. (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 28, str. 51–59.
- (61) UNEP (2001). Stockholmska konvencija o obstojnih organskih onesnaževalih, Program Združenih narodov za okolje (UNEP). Na voljo na: <http://www.pops.int/>.
- (62) Tucker, J. D. in Christensen, M. L. (1987). Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutation Research*, zv. 190/3, str. 225–8.
- (63) Krahn, D. F., Barsky F. C. in McCooley, K. T. (1982). „CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids“, in *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. Tice, R. R., Costa, D. L. in Schaich, K. M. (eds.), Plenum, New York, str. 91–103.
- (64) Zamora, P. O. idr. (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*, zv. 5/6, str. 795–801.
- (65) Asakura, M. idr. (2008). An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay. *Mutation Research*, zv. 652/2, str. 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*, zv. 285/1, str. 35–44.
- (67) Phelps, J. B., Garriott, M. L. in Hoffman, W. P. (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*, zv. 521/1–2, str. 103–112.
- (68) Kirsch-Volders, M. idr. (2004). Corrigendum to „Report from the *in vitro* micronucleus assay working group“. *Mutation Research*, zv. 564, str. 97–100.
- (69) Lorge, E. idr. (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Research*, zv. 655/1–2, str. 1–3.
- (70) Surralles, J. idr. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, zv. 341/3, str. 169–184.
- (71) Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutation Research*, zv. 724, str. 86–87.
- (72) Pfuhrer, S. idr. (2011). *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutation Research*, zv. 723/2, str. 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 (Test Guidelines 473, 476 and 487). ENV/JM/TG(2014)17. Na voljo na zahtevo.
- (74) Morita, T., Honma, M. in Morikawa, K. (2012). Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity. *Mutation Research*, zv. 741, str. 32–56.
- (75) Brookmire, L. Chen, J. J. in Levy, D. D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *in vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 54/1, str. 36–43.

- (76) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (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. idr. (2012). Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutation Research*, zv. 746/1, str. 29–34.
- (78) Hayashi, M., Sofuni, T. in Ishidate, M. Jr. (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Research*, zv. 120/4, str. 241–247.
- (79) MacGregor, J. T., Wehr, C. M. in Langlois, R. G. (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Research*, zv. 120/4, str. 269–275.
- (80) Bryce, S. M. idr. (2011). Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 52/4, str. 280–286.
- (81) Nicolette, J. idr. (2011). *in vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 52/5, str. 355–362.
- (82) Shi, J., Bezabhie, R. in Szkudlinska, A. (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*, zv. 25/1, str. 33–40.
- (83) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on testing and assessment, št. 198, OECD Publishing, Pariz.
- (84) Fenech, M. idr. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, zv. 534/1–2, str. 65–75.
- (85) Elhajouji, A., Cunha, M. in Kirsch-Volders, M. (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis*, zv. 13/2, str. 193–8.
- (86) Kirsch-Volders, M. idr. (2011). The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology*, zv. 85/8, str. 873–99.
- (87) Hayashi, M. idr. (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, zv. 723/2, str. 87–90.
- (88) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. druga izdaja, John Wiley and Sons, New York.
- (89) Hoffman, W. P., Garriott, M. L. in Lee, C. (2003). „*In vitro* micronucleus test“, in *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, druga izdaja, Chow, S. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, str. 463–467.
- (90) Fleiss, J. L., Levin, B. in Paik, M. C. (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions*, tretja izdaja, John Wiley & Sons, New York.
- (91) Galloway, S. M. idr. (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 10/dod. 10, str. 1–175.
- (92) Richardson, C. idr. (1989). Analysis of Data from *in vitro* Cytogenetic Assays. in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D. J. (ed), Cambridge University Press, Cambridge, str. 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

OPREDELITVE POJMOV

Anevgen: vsaka kemikalija ali proces, na podlagi katerega pride do aneuploidije v celicah ali organizmih zaradi reagiranja z elementi mitotskega in mejnega cikla delitve celic.

Aneuploidija: vsako odstopanje od normalnega diploidnega (ali haploidnega) števila kromosomov za en ali več kot en kromosom, vendar ne za celotni set kromosomov (poliploidija).

Apoptoza: programirana celična smrt, za katero je značilna vrsta korakov, ki vodijo v razgradnjo celic na delce, obdane z membrano, ki se nato odstranijo s fagocitozo ali osipanjem.

Celična proliferacija: povečanje števila celic kot posledica mitotične delitve celic.

Centromera: območje kromosoma, ki vsebuje DNK, kjer sta spojeni obe kromatidi in na katerem sta na obeh straneh pritrjeni obe kinetohori.

Kemikalija: snov ali zmes.

Koncentracije: se nanašajo na končne koncentracije preskusne kemikalije v gojišču.

Klastogen: vsaka kemikalija, ki povzroči strukturne kromosomske aberacije v populacijah celic ali evkariotskih organizmih.

Citokineza: proces delitve celic, ki nastopi takoj po mitozu in vpliva na oblikovanje dveh hčerinskih celic, ki imata vsaka eno samo jedro.

Proliferacijski indeks citokinetskega bloka (Cytokinesis-Block Proliferation index – CPBI): delež celic, pri katerih se je izvedla druga delitev, v tretirani populaciji glede na netretirano kontrolo (glej Dodatek 2 za formulo).

Citostaza: zaviranje rasti celic (glej Dodatek 2 za formulo).

Citotoksičnost: Za poskuse, zajete v to preskusno metodo in izvedene v prisotnosti citohalazina B, je citotoksičnost opredeljena kot zmanjšanje proliferacijskega indeksa citokinetskega bloka (CPBI) ali indeksa pomnoževanja pri tretiranih celicah v primerjavi z negativno kontrolo (glej odstavek 26 in Dodatek 2).

Za poskuse, zajete v to preskusno metodo in izvedene brez citohalazina B, je citotoksičnost opredeljena kot zmanjšanje relativne podvojitve populacije (RPD) ali relativnega povečanja števila celic (RICC) pri tretiranih celicah v primerjavi z negativno kontrolo (glej odstavek 27 in Dodatek 2).

Genotoksiče: splošni pojem, ki zajema vse vrste poškodb DNK ali kromosomov, vključno s prelomi, delecijami, adukti, nukleotidnimi spremembami in povezavami, prerazporeditvami, mutacijami genov, kromosomskimi aberacijami in aneuploidijo. Vsi genotoksični učinki ne vplivajo na nastanek mutacij ali trajno poškodbo kromosomov.

Celice v interfazi: celice, ki niso v fazi mitoze.

Kinetohor: beljakovinska struktura, ki nastane na centromeri kromosoma, na katero se med delitvijo celice pripnejo niti delitvenega vretena, kar omogoča pravilno gibanje hčerinskih kromosomov proti poloma hčerinskih celic.

Mikronukleusi: majhna jedra, poleg glavnega jedra celic in ločena od njega, ki nastanejo med telofazo mitoze ali mejoze iz zaostalih fragmentov kromosomov ali celih kromosomov.

Mitoza: delitev celičnega jedra, ki je običajno razdeljena na profazo, prometafazo, metafazo, anafazo in telofazo.

Mitotični indeks: razmerje med številom celic v metafazi in skupnim številom celic v opazovani populaciji celic; kazalnik stopnje celične proliferacije te populacije.

Mutagen: povzročča dedno spremembo zaporedij baznih parov DNK v genih ali strukturi kromosomov (kromosomske aberacije).

Nerazdvajanje: par kromatid se ne razdvoji in ustrezno loči v razvijajoče se hčerinske celice, zaradi česar imata hčerinski celici nenormalno število kromosomov.

Status beljakovine p53: beljakovina p53 je vključena v reguliranje celičnega cikla, apoptozo in popravljanje DNK. Celice brez funkcionalne beljakovine p53, ki ne morejo zaustaviti celičnega cikla ali odstraniti poškodovanih celic z apoptozo ali drugimi mehanizmi (npr. indukcijo popravljanja DNK), povezanimi s funkcijami beljakovine p53, s katerimi se ta odzove na poškodbo DNK, so teoretično bolj nagnjene h genskim mutacijam ali kromosomskim aberacijam.

Poliploidija: numerične kromosomske aberacije v celicah ali organizmih, ki ne vplivajo na posamezen kromosom ali kromosome (aneuploidija), temveč na celoten set kromosomov.

Proliferacijski indeks: metoda merjenja citotoksičnosti, ko se citohalazin B ne doda (glej Dodatek 2 za formulo).

Relativno povečanje števila celic (RICC): metoda merjenja citotoksičnosti, ko se citohalazin B ne doda (glej Dodatek 2 za formulo).

Relativna podvojitev populacije (RPD): metoda merjenja citotoksičnosti, ko se citohalazin B ne doda (glej Dodatek 2 za formulo).

Indeks pomnoževanja (RI): razmerje ciklov celične delitve v tretirani kulturi glede na netretirano kulturo med obdobjem izpostavljenosti in obnavljanja (glej Dodatek 2 za formulo).

Frakcija S9, pripravljena iz jeter: supernatant iz homogenata jeter po centrifugiranju pri 9 000 g, tj. izvleček surovih jeter.

Mešanica S9: mešanica S9, pripravljene iz jeter, in kofaktorjev, potrebnih za dejavnosti presnovnih encimov.

Kontrola s topilom: splošni pojem za opredelitev kontrolnih kultur, ki prejmejo samo topilo, uporabljeno za raztopitev preskusne kemikalije.

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

Netretirana kontrola: kulture, ki se ne tretirajo (tj. niti s preskusno kemikalijo niti s topilom), temveč se sočasno tretirajo enako kot kulture, v katere se doda preskusna kemikalija.

—

Dodatek 2

FORMULE ZA OCENJEVANJE CITOTOKSIČNOSTI

Ko se doda citohalazin B, ocena citotoksičnosti temelji na **proliferacijskem indeksu citokinetskega bloka (CBPI)** ali **indeksu pomnoževanja (RI)** (17) (69). CBPI označuje srednje število jeder na celico in se lahko uporabi za izračun celične proliferacije. RI označuje relativno število celičnih ciklov na celico med obdobjem izpostavljenosti citohalazinu B v tretiranih kulturah v primerjavi s kontrolnimi kulturami in se lahko uporabi za izračun % citostaze:

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

in

T = kultura, tretirana s preskusno kemikalijo

C = kontrolna kultura

pri čemer je:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{št. celic z enim jedrom}) + (2 \times \text{št. celic z dvema jedroma}) + (3 \times \text{št. celic z več jedri}))}{(\text{skupno število celic})}$$

Tako je CPBI z vrednostjo 1 (vse celice imajo eno jedro) enak 100-odstotni citostazi.

$$\text{Citostaza} = 100 - \text{RI}$$

$$\text{RI} = \frac{((\text{št. celic z dvema jedroma}) + (2 \times \text{št. celic z več jedri})) / (\text{skupno število celic})_T}{((\text{št. celic z dvema jedroma}) + (2 \times \text{št. celic z več jedri})) / (\text{skupno število celic})_C} \times 100$$

T = tretirane kulture

C = kontrolne kulture

RI v višini 53 % torej pomeni, da se je v primerjavi s številom celic, ki so se delile v kontrolni kulturi in oblikovale celice z dvema jedroma in več jedri, v tretirani kulturi delilo le 53 % tega števila celic, kar pomeni, da je citostaza 47-odstotna.

Ko se citohalazin B ne doda, se priporoča ocena citotoksičnosti na podlagi **relativnega povečanja števila celic (RICC)** ali **relativne podvojitve populacije (RPD)** (69), saj se pri obeh metodah upošteva delež celične populacije, ki se je delil.

$$\text{RICC}(\%) = \frac{(\text{povečanje števila celic v tretiranih kulturah (končno -začetno)})}{(\text{povečanje števila celic v kontrolnih kulturah (končno -začetno)})} \times 100$$

$$\text{RPD}(\%) = \frac{(\text{št. podvojitvev populacije v tretiranih kulturah})}{(\text{št. podvojitvev populacije v kontrolnih kulturah})} \times 100$$

pri čemer je:

$$\text{podvojitvev populacije} = [\log (\text{število celic po tretiranju}) \div \log (\text{prvotno število celic})] \div \log 2$$

RICC ali RPD v višini 53 % torej pomeni, da je citotoksičnost/citostaza 47-odstotna.

S **proliferacijskim indeksom (PI)** se lahko citotoksičnost oceni s štetjem števila klonov, ki imajo eno celico (cl1), dve celici (cl2), tri do štiri celice (cl4) ter pet do osem celic (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 se uporablja kot dragocen in zanesljiv parameter citotoksičnosti tudi za celične linije, gojene *in vitro* v odsotnosti citohalazina B (35) (36) (37) (38), ter se lahko šteje za uporaben dodaten parameter.

V vsakem primeru mora biti število celic pred tretiranjem v tretiranih in negativnih kontrolnih kulturah enako.

Čeprav se je v preteklosti kot parameter citotoksičnosti uporabljalo relativno število celic (RCC) (tj. število celic v tretiranih kulturah/število celic v kontrolnih kulturah), to ni več priporočljivo, saj lahko podceni vrednost citotoksičnosti.

Če se uporablja avtomatiziran sistem štetja, na primer pretočna citometrija, laserska vrstična citometrija ali analiza slike, se lahko število celic v formuli zamenja s številom jeder.

V negativnih kontrolnih kulturah mora biti podvojitve populacije ali indeks pomnoževanja združljiv z zahtevo po vzorčenju celic po tretiranju v času, ki ustreza približno 1,5 do 2,0 dolžine normalnega celičnega cikla.“

(15) V delu B se dodajo naslednja poglavja:

„B.59 Preobčutljivost kože *in chemico*: neposredni preskus reaktivnosti peptidov (DPRA)

UVOD

Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD (TG) 442C (2015). Povzročitelj preobčutljivosti kože je snov, ki povzroči alergijski odziv po stiku s kožo, kot je opredeljeno v globalno usklajenem sistemu Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN) (1) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (uredba CLP) ⁽¹⁾. Pri tej preskusni metodi se izvede postopek *in chemico* (Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) – neposredni preskus reaktivnosti peptidov), ki ga je treba uporabiti v podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, v skladu z GHS ZN in uredbo CLP.

Obstaja splošno soglasje glede ključnih bioloških dogodkov, ki so osnova za preobčutljivost kože. Obstoječe znanje o kemijskih in bioloških mehanizmih, povezanih s preobčutljivostjo kože, je povzeto v obliki poteka neželenega izida (Adverse Outcome Pathway – AOP) (2) od začetnega dogodka na molekularni ravni prek vmesnih dogodkov do škodljivega učinka, tj. alergijskega kontaktnega dermatitisa pri ljudeh ali kontaktne preobčutljivosti pri glodalcih. Pri poteka neželenega izida preobčutljivosti kože je začetni dogodek na molekularni ravni kovalentna vezava elektrofilnih snovi na nukleofilne centre v beljakovinah kože.

Ocena preobčutljivosti kože se je običajno izvajala z uporabo laboratorijskih živali. Pri klasični metodi, ki temelji na morskih prašičkih, tj. Magnusson–Kligmanovem maksimizacijskem preskusu na morskih prašičkih (preskus GMPT) in Buehlerjevem preskusu (PM B.6 (3)), se proučuje preobčutljivost kože v fazah indukcije in elicitanje. Lokalna analiza bezgavk pri miših (Local Lymph Node Assay – LLNA, PM B.42 (4)) in njeni dve neradioaktivni prilagoditvi, tj. LLNA: DA (PM B.50 (5)) in LLNA: BrdU-ELISA (PM B.51 (6)), ki vse ocenjujejo le indukcijski odziv, so bile prav tako sprejete, saj je njihova prednost v primerjavi s preskusi pa morskih prašičkih v tem, da upoštevajo dobrobit živali in zagotavljajo objektivne meritve v fazi indukcije preobčutljivosti kože.

Pred kratkim pa sta se kot znanstveno veljavni za ocenjevanje nevarnosti kemikalij za preobčutljivost kože začeli šteti preskusni metodi *in chemico* ter *in vitro*, ki temeljita na mehanističnih merilih. Da bi bilo mogoče v celoti nadomestiti testiranja na živalih, ki se trenutno uporabljajo, pa bodo potrebne kombinacije metod, ki se ne izvajajo na živalih (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*) v okviru celostnih pristopov k testiranju in ocenjevanju (Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA)), pri čemer se upošteva omejeno mehanistično kritje poteka neželenega izida pri vsaki od trenutno razpoložljivih preskusnih metod, ki se ne izvajajo na živalih (2) (7).

⁽¹⁾ Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 31.12.2008, str. 1).

Predlagano je, da bi DPRA kot začetni dogodek poteka neželenega izida preobčutljivosti kože na molekularni ravni, tj. reaktivnost beljakovin, obravnaval tako, da bi se reaktivnost preskusnih kemikalij količinsko opredelila glede na vzorčne sintetične peptide, ki vsebujejo lizin ali cistein (8). Odstotne vrednosti izgube peptidov za cistein in lizin se nato uporabijo za razvrstitev snovi v enega od štirih razredov reaktivnosti, s čimer se podpira razlikovanje med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože (9).

Preskus DPRA, ki je bil ocenjen v validacijski študiji pod vodstvom Referenčnega laboratorija Evropske unije za alternative testiranju na živalih (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing – EURL ECVAM), nato pa še z naknadnim neodvisnim medsebojnim strokovnim pregledom, ki sta ga izvedla EURL ECVAM in Znanstveni svetovni odbor (ESAC), je bil ocenjen kot znanstveno veljaven (10) za uporabo kot del IATA, da se podpre razlikovanje med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, zaradi razvrstitve glede na nevarnosti in označevanje. V virih poročajo o primerih uporabe podatkov iz preskusa DPRA v kombinaciji z drugimi informacijami (11) (12) (13) (14).

Opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI, UPORABNOST IN OMEJITVE

Korelacija med reaktivnostjo beljakovin in potencialom za povzročanje preobčutljivosti kože je dobro dokazana (15) (16) (17). Vendar ker je vezava na beljakovine le en ključni dogodek, čeprav je začetni dogodek poteka neželenega izida preobčutljivosti kože na molekularni ravni, informacije o reaktivnosti beljakovin, pridobljene s preskusnimi in nepreskusnimi metodami, kot take morda ne zadostujejo za ugotovitev, da kemikalija nima potenciala za povzročanje preobčutljivosti kože. Zato je treba podatke, pridobljene s to preskusno metodo, obravnavati v okviru celostnih pristopov, kot je IATA, in jih združiti z drugimi dopolnilnimi informacijami, ki izhajajo na primer iz poskusov *in vitro*, s katerimi se obravnavajo drugi ključni dogodki poteka neželenega izida preobčutljivosti kože, ter nepreskusnimi metodami, vključno z navzkrižnim branjem pri podobnih kemijskih snoveh.

Ta preskusna metoda se lahko v kombinaciji z drugimi dopolnilnimi informacijami uporabi v podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože (tj. kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP) in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, v okviru IATA. Te preskusne metode ni mogoče uporabiti samostojno niti za razvrstitev povzročiteljev preobčutljivosti kože v podkategoriji 1A in 1B, kot sta opredeljeni v GHS ZN/uredbi CLP, niti za napoved stopnje povzročanja preobčutljivosti v okviru odločanja o oceni varnosti. Vendar pa je, odvisno od regulativnega okvira, pozitiven rezultat pri preskusu DPRA kot tak mogoče uporabiti za razvrstitev kemikalije v kategorijo 1 po GHS ZN/uredbi CLP.

Izkazalo se je, da se preskus DPRA lahko prenese v laboratorije, ki imajo izkušnje z analizo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (high-performance liquid chromatography – HPLC). Stopnja ponovljivosti napovedi, ki jo je mogoče pričakovati pri preskusni metodi, je v enem laboratoriju 85-odstotna, v več laboratorijih pa 80-odstotna (10). Rezultati, pridobljeni z validacijsko študijo (18) in objavljenimi študijami (19), na splošno kažejo, da je točnost preskusa DPRA pri razlikovanju povzročiteljev preobčutljivosti (tj. kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP) in snovi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti, 80-odstotna ($N = 157$), pri čemer je občutljivost v primerjavi z rezultati pri preskusu LLNA 80-odstotna (88/109), specifičnost pa 77-odstotna (37/48). Pri preskusu DPRA je bolj verjetno, da se podceni vrednost kemikalij z nizko do zmerno stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (tj. podkategorija 1B po GHS ZN/uredbi CLP) kot pa kemikalij z visoko stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (tj. podkategorija 1A po GHS ZN/uredbi CLP) (18) (19). Vendar so tukaj navedene vrednosti točnosti za preskus DPRA kot samostojno preskusno metodo zgolj okvirne, saj jo je treba obravnavati skupaj z drugimi viri informacij v okviru IATA in v skladu z določbami odstavka 9. Poleg tega je treba pri ocenjevanju metod za preobčutljivost kože, ki se ne izvajajo na živalih, upoštevati, da preskus LLNA ter druga testiranja na živalih razmer v proučevani vrsti, tj. pri človeku, ne odražajo v celoti. Na podlagi splošno razpoložljivih podatkov se je pokazalo, da se preskus DPRA lahko uporablja za preskusne kemikalije, ki zajemajo različne organske funkcionalne skupine, mehanizme reakcije, stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (kot je določena v študijah *in vivo*) ter fizikalno-kemijske lastnosti (8) (9) (10) (19). Vse te informacije skupaj kažejo, da preskus DPRA uporabno prispeva k opredelitvi nevarnosti za povzročanje preobčutljivosti kože.

Pojem „preskusna kemikalija“ se pri tej preskusni metodi nanaša na to, kar se preskuša, in ni povezan z uporabnostjo preskusa DPRA za preskušanje snovi in/ali zmesi. Ta preskusna metoda se ne uporablja za preskušanje kovinskih spojin, saj je znano, da z beljakovinami reagirajo z mehanizmi, ki niso kovalentna vezava. Preskusna kemikalija mora biti topna v ustreznem topilu v končni koncentraciji 100 mM (glej odstavek 18). Za preskusne kemikalije, ki niso topne pri tej koncentraciji, pa se lahko še vedno preskusi, ali so topne pri nižjih koncentracijah. V takem primeru je s pozitivnim rezultatom še vedno mogoče podpreti opredelitev, da je preskusna kemikalija povzročiteljica preobčutljivosti kože, iz negativnega rezultata pa ni mogoče izpeljati trdnega sklepa o pomanjkanju reaktivnosti. Za zdaj so na voljo omejene informacije o uporabnosti preskusa DPRA za zmesi z znano sestavo (18) (19). Preskus DPRA se kljub temu šteje kot tehnično uporaben za preskušanje snovi z več sestavinami in zmesi z znano sestavo (glej odstavek 18). Preden se ta preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba proučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki premisleki niso potrebni. Sedanjega modela za napovedovanje zaradi določenega molskega razmerja preskusne kemikalije in peptida ni mogoče uporabiti za kompleksne zmesi z neznano sestavo ali snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksne reakcijske produkte ali biološke materiale (npr. snovi UVCB). Za to bo treba razviti nov model za napovedovanje, ki temelji na gravimetričnem pristopu. Kadar se lahko dokaže, da preskusne metode ni mogoče uporabljati za druge posebne kategorije kemikalij, se ta preskusna metoda zanje ne sme uporabiti.

Ta preskusna metoda je metoda *in chemico*, ki ne zajema metabolnega sistema. Z njo ni mogoče zaznati kemikalij, pri katerih je za prikaz njihovega potenciala za povzročanje preobčutljivosti kože potrebna encimska bioaktivacija (tj. pro-haptenov). Poroča se, da se s preskusno metodo v nekaterih primerih pravilno zaznajo kemikalije, ki postanejo povzročiteljice preobčutljivosti kože po abiotski pretvorbi (tj. pre-hapteni) (18). Glede na navedeno je treba negativne rezultate, pridobljene s preskusno metodo, razlagati v okviru navedenih omejitev in v povezavi z drugimi viri informacij v okviru IATA. Pri preskusnih kemikalijah, ki se na peptid ne vežejo kovalentno, temveč spodbujajo njegovo oksidacijo (tj. dimerizacija cisteina), se lahko preceni vrednost izgubljanja peptidov, zaradi česar so možni lažni pozitivni rezultati in/ali razvrstitev v višji razred reaktivnosti (glej odstavka 29 in 30).

Kot je navedeno, preskus DPRA podpira razlikovanje med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože. Kadar se uporablja v celostnih pristopih, kot je IATA, pa lahko prispeva tudi k oceni stopnje povzročanja preobčutljivosti kože (11). Vendar je potrebno nadaljnje delo, ki po možnosti temelji na podatkih za ljudi, da se določi, kako bi se lahko na podlagi rezultatov preskusa DPRA ocenila stopnja povzročanja preobčutljivosti.

NAČELO PRESKUSA

Preskus DPRA je metoda *in chemico*, s katero se količinsko opredeli preostala koncentracija peptida, sestavljenega iz cisteina ali lizina, po 24-urni inkubaciji s preskusno kemikalijo pri $25 \pm 2,5$ °C. Sintetični peptidi vsebujejo fenilalanin, ki pomaga pri odkrivanju. Relativna koncentracija peptidov se meri s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z gradientno elucijo in UV-detekcijo pri 220 nm. Nato se izračunajo odstotne vrednosti izgube peptidov, sestavljenih iz cisteina in lizina, ter uporabijo v napovednem modelu (glej odstavek 29), kar omogoča razvrstitev preskusne kemikalije v enega izmed štirih razredov reaktivnosti, s katerimi se podpira razlikovanje med povzročitelji preobčutljivosti in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti.

Pred redno uporabo metode, opisane pri tej preskusni metodi, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost, tako da uporabijo deset snovi za preverjanje usposobljenosti, navedenih v Dodatku 2.

POSTOPEK

Ta preskusna metoda temelji na protokolu DPRA DB-ALM št. 154 (20), tj. protokolu, ki se uporablja v validacijski študiji, ki jo usklajuje EURL ECVAM. Priporočljivo je, da se ta protokol uporablja pri izvajanju in uporabi te metode v laboratoriju. V nadaljevanju so opisani glavni elementi in postopki v preskusu DPRA. V primeru uporabe alternativnega sistema HPLC je treba prikazati, da je enakovreden validiranemu sistemu v protokolu DB-ALM (npr. s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 2).

Priprava peptidov, sestavljenih iz cisteina ali lizina

Tik pred inkubacijo s preskusno kemikalijo je treba sveže pripraviti osnovne raztopine cisteina (Ac-RFAACAA-COOH) in lizina (Ac-RFAAKAA-COOH), ki vsebujejo sintetične peptide, katerih stopnja čistosti je višja od 85 % in po možnosti v razponu od 90 do 95 %. Končna koncentracija peptida, sestavljenega iz cisteina, mora biti 0,667 mM v fosfatnem pufru z vrednostjo pH 7,5, končna koncentracija peptida, sestavljenega iz lizina, pa 0,667 mM v pufru amonijevega acetata z vrednostjo pH 10,2. Določiti je treba zaporedje ponovitev HPLC, da analiza HPLC ne traja dlje kot 30 ur. Pri sistemu HPLC, uporabljenem v tej validacijski študiji in opisanem v tej preskusni metodi, je mogoče v eno samo ponovitev HPLC vključiti do 26 vzorcev za analizo (ki vključujejo preskusno kemikalijo, pozitivno kontrolo in ustrezno število kontrol s topilom, in sicer glede na število posameznih topil, uporabljenih v preskusu, pri čemer se vsak preskusi v treh ponovitvah). Pri vseh ponovljenih vzorcih, analiziranih v isti ponovitvi, je treba uporabiti enake osnovne raztopine peptidov, sestavljenih iz cisteina in lizina. Priporočljivo je, da se pred uporabo dokaže ustrezna topnost posameznih serij peptidov.

Priprava preskusne kemikalije

Pred izvedbo preskusa je treba oceniti topnost preskusne kemikalije v ustreznem topilu po postopku solubilizacije, opisanem v protokolu DPRA DB-ALM (20). Ustrezno topilo povsem raztopi preskusno kemikalijo. Ker je pri preskusu DPRA preskusna kemikalija inkubirana v velikem presežku s peptidi, sestavljenimi iz cisteina ali lizina, vizualni pregled nastajanja jasne raztopine zadostuje, da se ugotovi, ali je preskusna kemikalija (in vse njene sestavine v primeru preskušanja snovi z več sestavinami ali zmesi) raztopljena. Ustrezna topila so acetonitril, voda, zmes vode in acetonitrila v razmerju 1: 1, izopropanol, aceton ali zmes acetona in acetonitrila v razmerju 1: 1. Uporabijo se lahko tudi druga topila, če ne vplivajo na stabilnost peptidov, kar se nadzoruje z referenčnimi kontrolnimi vzorci C (tj. vzorci, sestavljenimi iz zgolj peptidov, raztopljenih v ustreznem topilu; glej Dodatek 3). Če preskusna kemikalija ni topna v nobenem od teh topil, jo je treba kot zadnjo možnost poskusiti raztopiti v 300 µL dimetil sulfoksida (DMSO) in nastalo raztopino razredčiti z 2 700 µL acetonitrila; če preskusna kemikalija ni topna v tej zmesi, je treba poskusiti enako količino preskusne kemikalije raztopiti v 1 500 µL DMSO in nastalo raztopino razredčiti z 1 500 µL acetonitrila. Preskusno kemikalijo je treba vnaprej stehtati v steklenih vialah in tik pred preskušanjem raztopiti z ustreznimi topili, da se pripravi 100 mM raztopina. Za zmesi in snovi z več sestavinami z znano sestavo je treba določiti enotno čistost, tako da se seštejejo deleži njihovih sestavin (razen vode), enotno navidezno molekulska masa pa je treba določiti tako, da se upoštevajo posamezne molekulske mase vsake sestavine v zmesi (razen vode) in njihova posamezna razmerja. Dobljena čistost in navidezna molekulska masa se nato uporabita pri izračunu teže preskusne kemikalije, ki je potrebna za pripravo 100 mM raztopine. Za polimere, pri katerih prevladujejo molekulske mase ni mogoče določiti, se lahko za pripravo 100 mM raztopine uporabi molekulska masa monomera (ali navidezna molekulska masa različnih monomerov, ki sestavljajo polimer). Pri preskušanju zmesi, snovi z več sestavinami ali polimerov z znano sestavo pa je treba razmisliti tudi o preskušanju čiste kemikalije. Pri tekočinah je treba preskusiti čisto kemikalijo kot tako brez predhodnega razredčenja, tako da se s peptidi, sestavljenimi iz cisteina, inkubira v molskem razmerju 1: 10, s peptidi, sestavljenimi iz lizina, pa v molskem razmerju 1: 50. Pri trdnih snoveh je treba preskusno kemikalijo raztopiti do največje možne topne koncentracije v istem topilu, kot je bilo uporabljeno za pripravo navidezne 100 mM raztopine. Nato jo je treba preskusiti kot tako brez dodatnega razredčenja, tako da se s peptidi, sestavljenimi iz cisteina, inkubira v razmerju 1: 10, s peptidi, sestavljenimi iz lizina, pa v razmerju 1: 50. Na podlagi skladnih rezultatov (reaktivnih ali nereaktivnih) med navidezno 100 mM raztopino in čisto kemikalijo je mogoče zanesljivo sklepati o rezultatu.

Priprava pozitivnega kontrolnega vzorca, referenčnih kontrolnih vzorcev in koelucijskih kontrolnih vzorcev

Za pozitivni kontrolni vzorec je treba uporabiti cimetov aldehid (št. CAS 104-55-2; s prehransko stopnjo čistosti $\geq 95\%$) v koncentraciji 100 mM v acetonitrilu. Uporabijo se lahko tudi drugi primerni pozitivni kontrolni vzorci, ki po možnosti zagotavljajo srednje vrednosti izgubljanja, če so na voljo podatki iz preteklih preskusov za izpeljavo primerljivih meril za sprejemljivost ponovitev. Poleg tega je treba referenčne kontrolne vzorce (tj. vzorce, ki vsebujejo le peptid, raztopljen v ustreznem topilu) vključiti v zaporedja ponovitev HPLC, ki se uporabijo za preverjanje ustreznosti sistema HPLC pred analizo (referenčni kontrolni vzorci A), stabilnosti referenčnih kontrolnih vzorcev v daljšem časovnem obdobju (referenčni kontrolni vzorci B) ter tega, da topilo, uporabljeno za raztopitev preskusne kemikalije, ne vpliva na odstotno vrednost izgube peptidov (referenčni kontrolni vzorci C) (glej Dodatek 3). Z ustreznimi referenčnimi kontrolnimi vzorci za vsako kemikalijo se izračuna odstotna vrednost izgube peptidov za navedeno kemikalijo (glej odstavek 26). Poleg tega je treba v zaporedje ponovitev za vsako od analiziranih preskusnih kemikalij vključiti koelucijski kontrolni vzorec, sestavljen iz preskusne kemikalije same, da se zazna morebitna koelucija preskusne kemikalije s peptidom, sestavljenim iz lizina, ali peptidom, sestavljenim iz cisteina.

Inkubacija preskusne kemikalije z raztopinama peptidov, sestavljenih iz cisteina in lizina

Raztopino peptida, sestavljenega iz cisteina, je treba inkubirati v steklenih vialah za avtomatski vzorčevalnik s preskusno kemikalijo v razmerju 1: 10, raztopino peptida, sestavljenega iz lizina, pa v razmerju 1: 50. Če je takoj po tem, ko se v raztopino peptida doda raztopina preskusne kemikalije, vidna oborina, ki nastane zaradi slabe topnosti preskusne kemikalije v vodi, ne moremo biti prepričani o tem, koliko preskusne kemikalije je ostalo v raztopini za reagiranje s peptidom. Zato se lahko v takem primeru še vedno uporabi pozitiven rezultat, negativen rezultat pa ni zanesljiv in ga je treba razlagati z ustrežno previdnostjo (glej tudi določbe v odstavku 11 za preskušanje kemikalij, ki do koncentracije 100 mM niso tozne). Reakcijsko raztopino je treba pred izvedbo analize HPLC za 24 ur \pm 2 uri pustiti v temi pri $25 \pm 2,5$ °C. Vsako preskusno kemikalijo je treba analizirati v treh ponovitvah za oba peptida. Vzorce je treba pred analizo HPLC vizualno pregledati. Če se opazi oborina ali ločitev faz, se lahko vzorci centrifugirajo pri nizki hitrosti (100–400 x g), da se oborina izloči na dno vial kot previdnosti ukrep, saj lahko velike količine oborine zamašijo cevi ali kolone za HPLC. Če je oborina ali ločitev faz vidna po obdobju inkubacije, je vrednost izgubljanja peptidov morda podcenjena in v primeru negativnega rezultata ni mogoče dovolj zanesljivo sklepati o pomanjkanju reaktivnosti.

Priprava standardne umeritvene krivulje za HPLC

Za peptide, sestavljene iz cisteina in lizina, je treba izdelati standardno umeritveno krivuljo. Standardno raztopino peptida je treba pripraviti v 20- ali 25-odstotni raztopini acetonitrila in pufru, pri čemer se za peptid, sestavljen iz cisteina, uporabi fosfatni pufer (z vrednostjo pH 7,5), za peptid, sestavljen iz lizina, pa pufer amonijevega acetata (z vrednostjo pH 10,2). Pripraviti je treba 6 raztopin za umerjanje, da se vanje zajame razpon od 0,534 do 0,0167 mM, pri čemer se uporabijo standardi za serije razredčitev osnovne raztopine peptida (0,667 mM). V standardno umeritveno krivuljo je treba vključiti tudi prazen vzorec s pufrom za redčenje. Ustrezne umeritvene krivulje morajo imeti $r^2 > 0,99$.

Priprava in analiza HPLC

Pred izvedbo analize je treba preveriti ustreznost sistema HPLC. Izguba peptidov se nadzoruje s HPLC, ki je povezana z UV-detektorjem (detektor s serijo fotodiod ali detektor absorbance s fiksno valovno dolžino s signalom 220 nm). V sistem HPLC se vstavi ustrezna kolona. V sistemu HPLC, opisanem v validiranem protokolu, je najbolj priporočljiva uporaba kolone Zorbax SB-C-18 2,1 mm \times 100 mm \times 3,5 mikrona. Celotni sistem s kolono za

HPLC z reverzno fazo je treba vsaj 2 uri pred izvedbo uravnovežiti pri 30 °C s 50 % faze A (0,1 vol. % trifluorocetne kisline v vodi) in 50 % faze B (0,085 vol. % trifluorocetne kisline v acetonitrilu). Analizo HPLC je treba izvesti s pretokom 0,35 ml/min in linearnim gradientom od 10 % do 25 % acetonitrila v 10 minutah, čemur sledi hitro povečanje na 90 % acetonitrila, da se odstranijo ostali materiali. Vbrizgati je treba enake volumne standardne raztopine, vzorca in kontrolnega vzorca. Kolono je treba med vbrizgavanji 7 minut ponovno uravnoveževati v začetnih pogojih. Če se uporabi druga kolona HPLC z reverzno fazo, je treba prilagoditi opisane parametre sistema, da se zagotovi ustrezno eluiranje in združevanje peptidov, sestavljenih iz cisteina in lizina, vključno z injekcijskim volumnom, ki se lahko spreminja glede na uporabljeni sistem (običajno v razponu 3 do 10 µl). Pomembno je, da se v primeru uporabe drugega sistema HPLC prikaže, da je enakovreden opisanemu validiranemu sistemu (npr. s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 2). Absorbanca se nadzoruje pri 220 nm. Če se uporablja detektor s serijo fotodiod, je treba zabeležiti tudi absorbanco pri 258 nm. Opozoriti je treba, da imajo lahko nekatere pošiljke acetonitrila negativen učinek na stabilnost peptidov, kar je treba oceniti, ko se uporabi nova serija acetonitrila. Kot kazalnik koelucije se lahko uporabi razmerje med površinama vrha pri 220 in 258. Za vsak vzorec je razmerje v razponu 90 % < srednja ⁽¹⁾ vrednost razmerja kontrolnih vzorcev < 100 % dober znak, da ni prišlo do koelucije.

Obstajajo preskusne kemikalije, ki lahko spodbujajo oksidacijo peptidov, sestavljenih iz cisteina. Vrh dimeriziranih peptidov, sestavljenih iz cisteina, se lahko vizualno nadzoruje. Če se pojavi dimerizacija, je treba to zabeležiti, saj se lahko odstotna vrednost izgube peptidov preceni, kar povzroči lažno pozitivne napovedi in/ali razvrstitev v višji razred reaktivnosti (glej odstavek 29 in 30).

Analizo HPLC za peptide, sestavljene iz cisteina in lizina, se lahko izvede na isti (če sta na voljo dva sistema HPLC) ali na drug dan. Če se analiza ne izvede na isti dan, je treba vsak dan sveže pripraviti vse raztopine preskusnih kemikalij za oba preskusa. Pri analizi je treba meriti čas, da se zagotovi, da se vbrizgavanje prvega vzorca začne 22 do 26 ur po tem, ko je bila preskusna kemikalija zmešana z raztopino peptidov. Določiti je treba zaporedje ponovitev HPLC, da analiza HPLC ne traja dlje kot 30 ur. Pri sistemu HPLC, uporabljenem v tej validacijski študiji in opisanem v tej preskusni metodi, je mogoče v eno samo ponovitev HPLC vključiti do 26 vzorcev analize (glej tudi odstavek 17). Primer zaporedja analize HPLC je naveden v Dodatku 3.

PODATKI IN POROČANJE

Ocenjevanje podatkov

Koncentracija peptidov, sestavljenih iz cisteina ali lizina, se v vsakem vzorcu fotometrično določi pri 220 nm tako, da se izmeri površina vrha (površina pod krivuljo – PPK) ustreznih vrhov in izračuna koncentracija peptidov z uporabo linearne umeritvene krivulje, izpeljane iz standardnih raztopin.

Odstotna vrednost izgube peptidov se v vsakem vzorcu določi tako, da se izmeri površina vrha, ki se nato deli s srednjo vrednostjo površine vrha ustreznih referenčnih kontrolnih vzorcev C (glej Dodatek 3) v skladu s formulo, navedeno v nadaljevanju.

$$\text{Odstotna vrednost izgube peptidov} = \left[1 - \left(\frac{\text{površina vrha peptida pri ponovnem vbrizganju}}{\text{srednja vrednost površine vrha peptida v ref.kontrolah C}} \right) \right] \times 100$$

Merila za sprejemljivost

Da se ponovitev šteje za veljavno, morajo biti izpolnjena naslednja merila:

- ustrezne umeritvene krivulje imajo $r^2 > 0,99$;

⁽¹⁾ Srednja vrednost v celotnem dokumentu pomeni aritmetično sredino.

- b) srednja odstotna vrednost izgube peptidov za tri ponovljene pozitivne kontrolne vzorce s cimetovim aldehidom se mora za peptide, sestavljene iz cisteina, gibati v razponu od 60,8 % do 100 %, za peptide, sestavljene iz lizina, pa v razponu od 40,2 % do 69,0 %, pri čemer je najvišji standardni odklon (SO) za ponovljene pozitivne kontrolne vzorce < 14,9 % za odstotek izgube cisteina in < 11,6 % za odstotek izgube lizina;
- c) srednja vrednost koncentracije referenčnih kontrolnih vzorcev A mora znašati $0,50 \pm 0,05$ mM, koeficient variacije (KV) površine vrha peptidov za devet referenčnih kontrolnih vzorcev B in C v acetonitrilu pa < 15,0 %.

Če eno ali več teh meril ni izpoljenih, je treba ponovitev izvesti še enkrat.

Da se rezultati preskusne kemikalije štejejo za veljavne, morajo biti izpolnjena naslednja merila:

- a) najvišji standardni odklon za ponovljene vzorce preskusne kemikalije mora biti < 14,9 % za odstotek izgube cisteina in < 11,6 % za odstotek izgube lizina;
- b) srednja vrednost koncentracije peptidov treh referenčnih kontrolnih vzorcev C v ustreznem topilu mora biti $0,50 \pm 0,05$ mM. Če ta merila niso izpolnjena, je treba podatke zavrniti in ponovitev za navedeno posebno preskusno kemikalijo izvesti še enkrat.

Napovedni model

Za vsako preskusno kemikalijo se izračuna srednja odstotna vrednost izgube cisteina in lizina. Negativa izguba se pri izračunu srednje vrednosti šteje kot „0“. Če se uporablja napovedni model v razmerju 1: 10 za cistein in v razmerju 1: 50 za lizin iz preglednice 1, je treba v podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, v okviru IATA uporabiti prag v višini 6,38 % srednje izgube peptidov. Uporaba napovednega modela za razvrstitev preskusne kemikalije v enega od razredov reaktivnosti (tj. nizka, zmerna in visoka reaktivnost) se lahko včasih izkaže za uporabno pri oblikovanju ocene moči v okviru IATA.

Preglednica 1

Napovedni model v razmerju 1: 10 za cistein/ 1: 50 za lizin ⁽¹⁾

Srednja odstotna vrednost izgube cisteina in lizina	Razred reaktivnosti	Napoved DPRA ⁽²⁾
$0 \% \leq$ srednja odstotna vrednost izgube $\leq 6,38 \%$	brez reaktivnosti ali minimalna reaktivnost	negativna
$6,38 \% <$ srednja odstotna vrednost izgube $\leq 22,62 \%$	nizka reaktivnost	pozitivna
$22,62 \% <$ srednja odstotna vrednost izgube $\leq 42,47 \%$	zmerna reaktivnost	
$42,47 \% <$ srednja odstotna vrednost izgube $\leq 100 \%$	visoka reaktivnost	

⁽¹⁾ Podatki se nanašajo na statistično pridobljene mejne vrednosti in niso povezani z natančnostjo meritve.

⁽²⁾ Napoved DPRA je treba obravnavati v okviru IATA ter v skladu z določbami iz odstavkov 9 in 12.

Lahko se pojavijo primeri, ko preskusna kemikalija (snov ali ena ali več sestavin snovi z več sestavinami ali zmesi) pri 220 nm močno absorbira in ima isti retencijski čas kot peptidi (koelucija). Koelucija se lahko odpravi z manjšo prilagoditvijo sistema HPLC, da se nadalje loči elucijski čas preskusne kemikalije in peptidov. Če se poskuša koelucija odpraviti z uporabo drugega sistema HPLC, je treba prikazati, da je enakovreden validiranemu sistemu (npr. s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 2). Ko pride do koelucije, vrha peptidov ni mogoče vključiti in izračun odstotne vrednosti izgube peptidov ni mogoč. Če pride do koelucije takih preskusnih kemikalij s peptidi, sestavljenimi iz cisteina in lizina, je treba poročati, da je analiza „pomanjkljiva“. Če pride do koelucije le s peptidi, sestavljenimi iz lizina, se lahko uporabi napovedni model v razmerju 1: 10 za cistein, o katerem se poroča v preglednici 2.

Preglednica 2

Napovedni model v razmerju 1: 10 za cistein ⁽¹⁾

Odstotna vrednost izgube cisteina	Razred reaktivnosti	Napoved DPRA ⁽²⁾
0 % ≤ odstotna vrednost izgube cisteina ≤ 13,89 %	brez reaktivnosti ali minimalna reaktivnost	negativna
13,89 % < odstotna vrednost izgube cisteina ≤ 23,09 %	nizka reaktivnost	pozitivna
23,09 % < odstotna vrednost izgube cisteina ≤ 98,24 %	zmerna reaktivnost	
98,24 % < odstotna vrednost izgube cisteina ≤ 100 %	visoka reaktivnost	

⁽¹⁾ Podatki se nanašajo na statistično pridobljene mejne vrednosti in niso povezani z natančnostjo meritve.

⁽²⁾ Napoved DPRA je treba obravnavati v okviru IATA ter v skladu z določbami iz odstavkov 9 in 12.

Obstajajo lahko tudi drugi primeri, pri katerih prihaja do prekrivanja retencijskega časa med preskusno kemikalijo in je kateri koli od peptidov nepopoln. V takih primerih se lahko odstotne vrednosti izgube peptidov ocenijo in uporabijo v napovednem modelu, pri katerem je cistein v razmerju 1: 10, lizin pa v razmerju 1: 50, vendar preskusne kemikalije ni mogoče natančno razvrstiti v enega od razredov reaktivnosti.

Kadar je rezultat nedvoumen, za preskusno kemikalijo zadostuje ena sama analiza HPLC za peptide, sestavljene iz cisteina in lizina. Kadar pa so rezultati blizu mejne vrednosti, ki se uporablja za razlikovanje med pozitivnimi in negativnimi rezultati (tj. so rezultati mejni), je potrebno dodatno preskušanje. V primerih, ko se srednja odstotna vrednost izgube pri napovednem modelu, pri katerem je cistein v razmerju 1: 10, lizin pa v razmerju 1: 50, giblje v razponu od 3 % do 10 % ali se odstotne vrednosti izgube cisteina pri modelu za napovedovanje, pri katerem je cistein v razmerju 1: 10, gibljejo v razponu od 9 % do 17 %, je treba razmisliti o drugi ponovitvi, v primeru neskladnih rezultatov med prvima dvema ponovitvama pa tudi o tretji.

Poročilo o preskusu

V poročilo o preskusu se vključijo naslednji podatki:

Preskusna kemikalija

— Snov iz ene sestavine:

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;

- fizični videz, topnost v vodi, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo;
 - čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
 - obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
 - preskušene koncentracije;
 - pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo.
- Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:
- čim obsežnejša opredelitev lastnosti, na primer s kemijsko identiteto (glej zgoraj), čistostjo, kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi (glej zgoraj) sestavin, če so na voljo;
 - fizični videz, topnost v vodi in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo;
 - molekulska masa ali navidezna molekulska masa v primeru zmesi/polimerov z znano sestavo ali drugi podatki, pomembni za izvedbo študije;
 - obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
 - preskušene koncentracije;
 - pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo.

Kontrole

- Pozitivna kontrola:
- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;
 - fizični videz, topnost v vodi, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo;
 - čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
 - obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
 - preskušene koncentracije;
 - pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;
 - sklicevanje na rezultate pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov, ki kažejo ustrezna merila za sprejemljivost ponovitev, če je to ustrezno.
- Topilo/vehikel:
- uporabljeno topilo/vehikel in razmerja sestavin, če so na voljo;
 - kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS in/ali drugi identifikatorji;
 - čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
 - fizični videz, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če se uporabijo druga topila/vehikli razen tistih, ki so navedeni pri tej preskusni metodi, in če so na voljo;
 - pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;

- utemeljitev izbire topila za vsako preskusno kemikalijo;
- za acetonitril – rezultati testa učinka na stabilnost peptida.

Priprava peptidov, pozitivne kontrole in preskusne kemikalije:

- opredelitev značilnosti raztopine peptidov (dobavitelj, serija, natančna teža peptidov, volumen, ki se doda za osnovno raztopino);
- opredelitev značilnosti pozitivne kontrole (natančna teža snovi za pozitivno kontrolo, volumen, ki se doda za preskusno raztopino);
- opredelitev značilnosti raztopin s preskusno kemikalijo (natančna teža preskusne kemikalije, volumen, ki se doda za preskusno raztopino).

Nastavitve in analiza instrumenta za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)

- vrsta instrumenta za HPLC, kolone za HPLC in predkolone, detektor, avtomatski vzorčevalnik;
- parametri, ki so pomembni za analizo HPLC, kot so temperatura kolone, injekcijski volumen, pretok in gradient.

Ustreznost sistema:

- površina vrha peptida pri 220 nm v vsaki standardni raztopini in ponovljenem referenčnem kontrolnem vzorcu A;
- grafično prikazana linearna umeritvena krivulja in vrednost r^2 , o kateri se je poročalo;
- koncentracija peptida v vsakem ponovljenem referenčnem kontrolnem vzorcu A;
- srednja vrednost koncentracije (v mM) peptida v treh referenčnih kontrolnih vzorcih A, SD in CV;
- koncentracija peptida v referenčnih kontrolnih vzorcih A in C.

Potek analize:

- za referenčne kontrolne vzorce:
 - površina vrha peptida pri 220 nm v vsakem ponovljenem kontrolnem vzorcu B in C;
 - srednja vrednost površine vrha peptida pri 220 nm v devetih referenčnih kontrolnih vzorcih B in C v acetonitrilu, SD in CV (za stabilnost referenčnih kontrolnih vzorcev med trajanjem analize);
 - za vsako uporabljeno topilo: srednja vrednost površine vrha peptida pri 220 nm v treh ustreznih referenčnih kontrolnih vzorcih C (za izračun odstotne vrednosti izgube peptidov);
 - za vsako uporabljeno topilo: koncentracija peptida (v mM) v treh ustreznih referenčnih kontrolnih vzorcih C;
 - za vsako uporabljeno topilo: srednja vrednost koncentracije peptida (v mM) v treh ustreznih referenčnih kontrolnih vzorcih C, SD in CV;
- za pozitivni kontrolni vzorec:
 - površina vrha peptida pri 220 nm za vsak ponovljeni vzorec;
 - odstotna vrednost izgube peptidov za vsak ponovljeni vzorec;
 - srednja odstotna vrednost izgube peptidov za tri ponovljene vzorce, SD in CV;
- za vsako preskusno kemikalijo:
 - videz oborine v reakcijski zmesi ob koncu časa inkubacije, če je opažena ter navedba o tem, ali se je oborina ponovno raztopila ali centrifugirala;

- prisotnost koelucije;
- opis kakršnih koli drugih pomembnih opažanj, če je ustrezno;
- površina vrha peptida pri 220 nm za vsak ponovljeni vzorec;
- odstotna vrednost izgube peptidov za vsak ponovljeni vzorec;
- srednja odstotna vrednost izgube peptidov v treh ponovljenih vzorcih, SD in CV;
- srednje odstotne vrednosti izgube cisteina in lizina;
- uporabljeni napovedni model in napoved DPRA.

Preskušanje usposobljenosti:

- če je ustrezno, postopek, uporabljen za dokazovanje usposobljenosti laboratorija v zvezi z izvedbo preskusne metode (npr. s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti) ali za prikaz ponovljivosti izvedbe preskusne metode v daljšem časovnem obdobju.

Razprava o rezultatih:

- razprava o rezultatih, pridobljenih s preskusno metodo DPRA;
- razprava o rezultatih preskusne metode v okviru IATA, če so na voljo drugi pomembni podatki.

Sklepne ugotovitve

VIRI

- (1) Združeni narodi (ZN) (2013). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS): peta prenovljena izdaja, ZN New York in Ženeva, 2013. Na voljo na: 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. Series on Testing and Assessment št. 168, OECD, Pariz.
- (3) Poglavje B.6 te priloge: Senzibilizacija kože.
- (4) Poglavje B.42 te priloge: Lokalna analiza bezgavk.
- (5) Poglavje B.50 te priloge: Preobčutljivost kože: lokalna analiza bezgavk: DA.
- (6) Poglavje B.51 te priloge: Preobčutljivost kože: lokalna analiza bezgavk: BrdU-ELISA.
- (7) Adler idr. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85: 367–485.
- (8) Gerberick idr. (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicological Sciences 81: 332–343.
- (9) Gerberick idr. (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. Toxicological Sciences 97: 417–427.
- (10) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Na voljo na: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra>.
- (11) Jaworska idr. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. Journal of Applied Toxicology, spletna različica, 14. maj 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.

- (12) Bauch idr. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 63: str. 489–504.
- (13) Nukada idr. (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: 609–618.
- (14) Gerberick idr. (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 in Jacobs. (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *Journal of Experimental Medicine* 64: 625–639.
- (16) Dupuis in Benezra. (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.
- (17) Lepoittevin idr. (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.
- (18) EC EURL ECVAM (2012). Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report, str. 74. Na voljo na: 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 idr. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, spletna različica, 9. april 2013, DOI:10.1002/jat.2868.
- (20) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing, str. 17. Na voljo na: <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. OECD Series on Testing and Assessment, št. 34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Pariz, Francija.
- (22) FDA (Food and Drug Administration) (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation str. 22. Na voljo na: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf – 138.
- (23) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
-

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Točnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov „ustreznosti“. Ta izraz in izraz „skladnost“ se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusne metode (21).

Potek neželenega izida (Adverse Outcome Pathway – AOP): zaporedje dogodkov od kemijske strukture ciljne kemikalije ali skupine podobnih kemikalij prek začetnega dogodka na molekulski ravni do preiskovanega rezultata *in vivo* (2).

Umeritvena krivulja: razmerje med vrednostjo odziva med preskusom in analitsko koncentracijo (imenovana tudi *standardna krivulja*) znane snovi.

Kemikalija: snov ali zmes.

Koeficient variacije: merilo variabilnosti, ki se za skupino podatkov za ponovljene vzorce izračuna tako, da se standardni odklon deli s srednjo vrednostjo. Lahko se pomnoži s 100, da se izrazi v odstotkih.

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

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

Začetni dogodek na molekulski ravni: kemijsko povzročena sprememba biološkega sistema na molekulski ravni, ki se v poteku neželenega izida opredeli kot začetni dogodek.

Zmes: zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi, ki v njej ne reagirajo (1).

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

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

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

Referenčna kontrola: netretiran vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema, vključno s topilom ali vehiklom, ki se obdela s kontrolnimi vzorci, tretiranimi s preskusno kemikalijo, in drugimi kontrolnimi vzorci, da se določi izhodiščni odziv za vzorce, tretirane s preskusno kemikalijo, raztopljeno v istem topilu ali vehiklu. Pri preskušanju s sočasno negativno kontrolo ta vzorec tudi pokaže, ali topilo ali vehikel reagira s preskusnim sistemom.

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

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

Obnovljivost: ujemanje rezultatov, pridobljenih s preskušanjem iste kemikalije in uporabo istega preskusnega protokola (glej zanesljivost) (21).

Občutljivost: delež vseh pozitivnih/aktivnih kemikalij, ki se s preskusno metodo pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (21).

Specifičnost: delež vseh negativnih/neaktivnih preskusnih kemikalij, ki se s preskusno metodo pravilno razvrstijo. To je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in je pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode. (21).

Snov: kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo (1).

Ustreznost sistema: določitev učinkovitosti delovanja instrumenta (npr. občutljivost) z analizo referenčnega standarda pred izvedbo analitske serije (22).

Preskusna kemikalija: pojem „preskusna kemikalija“ se uporablja za opisovanje tega, kar se preskuša.

Globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudi (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (1).

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

Veljavna preskusna metoda: preskusna metoda, ki se obravnava kot dovolj ustrezna in zanesljiva za določeni namen ter temelji na znanstveno utemeljenih načelih. Preskusna metoda ni nikoli veljavna v absolutnem smislu, ampak samo v zvezi z opredeljenim namenom (21).

Dodatek 2

SNOVI ZA PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI

Preobčutljivost kože *in chemico*: neposredni preskus reaktivnosti peptidov (DPRA)

Pred redno uporabo te preskusne metode morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost tako, da pri preskusu DPRA pridobijo pravilne rezultate napovedi, pričakovane za 10 snovi za preverjanje usposobljenosti, ki so priporočene v preglednici 1, ter da pri vsaj 8 od 10 snovi za preverjanje usposobljenosti pridobijo vrednosti izgube cisteina oziroma lizina v ustreznem referenčnem območju za vsak peptid. Te snovi za preverjanje usposobljenosti so bile izbrane, ker predstavljajo celoten razpon odzivov pri nevarnostih v zvezi s povzročanjem preobčutljivosti kože. Druga merila za izbiro so bila razpoložljivost kemikalij na trgu, razpoložljivost visokokakovostnih referenčnih podatkov *in vivo* in razpoložljivost visokokakovostnih podatkov *in vitro* za preskus DPRA ter uporaba v validacijski študiji, ki jo usklajuje EURL ECVAM za prikaz uspešne izvedbe preskusne metode v laboratorijih, ki sodelujejo v študiji.

Preglednica 1

Priporočene snovi za dokazovanje tehnične usposobljenosti za neposredni preskus reaktivnosti peptidov

Snovi za preverjanje usposobljenosti	Št. CAS	Agregatno stanje	Napoved <i>in vivo</i> (1)	Napoved DPRA (2)	Razpon (3) odstotne vrednosti izgube peptida, sestavljenega iz cisteina	Razpon (3) odstotne vrednosti izgube peptida, sestavljenega iz lizina
2,4-dinitroklorobenzen	97-00-7	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (izjemno močan)	pozitivna	90–100	15–45
oksalolon	15646-46-5	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (izjemno močan)	pozitivna	60–80	10–55
formaldehid	50-00-0	tekočina	povzročitelj preobčutljivosti (močan)	pozitivna	30–60	0–24
benzilidenaceton	122-57-6	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (zmeren)	pozitivna	80–100	0–7
farnezal	19317-11-4	tekočina	povzročitelj preobčutljivosti (šibek)	pozitivna	15–55	0–25
2,3-butandion	431-03-8	tekočina	povzročitelj preobčutljivosti (šibek)	pozitivna	60–100	10–45
1-butanol	71-36-3	tekočina	snov, ki ni povzročitelj preobčutljivosti	negativna	0–7	0–5,5
6-metilkumarin	92-48-8	trdna snov	snov, ki ni povzročitelj preobčutljivosti	negativna	0–7	0–5,5

Snovi za preverjanje usposobljenosti	Št. CAS	Agregatno stanje	Napoved <i>in vivo</i> ⁽¹⁾	Napoved DPRA ⁽²⁾	Razpon ⁽³⁾ odstotne vrednosti izgube peptida, sestavljenega iz cisteina	Razpon ⁽³⁾ odstotne vrednosti izgube peptida, sestavljenega iz lizina
mlečna kislina	50-21-5	tekočina	snov, ki ni povzročitelj preobčutljivosti	negativna	0–7	0–5,5
4-metoksiacetofenon	100-06-1	trdna snov	snov, ki ni povzročitelj preobčutljivosti	negativna	0–7	0–5,5

⁽¹⁾ Napovedi nevarnosti (in moči) *in vivo* temeljijo na podatkih za preskus LLNA (19). Moč *in vivo* se izpelje s pomočjo meril, ki jih je predlagal ECETOC (23).

⁽²⁾ Napoved preskusa DPRA je treba proučiti v okviru IATA ter v skladu z določbami odstavkov 9 in 11.

⁽³⁾ Razponi, določeni na podlagi vsaj 10 vrednosti izgube, ki jih je pridobilo 6 neodvisnih laboratorijev.

Dodatek 3

PRIMERI POTEKA ANALIZE

Standardi za umerjanje in referenčni kontrolni vzorci	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 pufer za redčenje referenčni kontrolni vzorec A, 1. ponov. referenčni kontrolni vzorec A, 2. ponov. referenčni kontrolni vzorec A, 3. ponov.
Koelucijski kontrolni vzorci	koelucijski kontrolni vzorec 1 za 1. preskusno kemikalijo koelucijski kontrolni vzorec 2 za 2. preskusno kemikalijo
Referenčni kontrolni vzorci	referenčni kontrolni vzorec B, 1. ponov. referenčni kontrolni vzorec B, 2. ponov. referenčni kontrolni vzorec B, 3. ponov.
Prvi sklop ponovljenih vzorcev	referenčni kontrolni vzorec C, 1. ponov. cimetov aldehyd, 1. ponov. vzorec 1, 1. ponov. vzorec 2, 1. ponov.
Drugi sklop ponovljenih vzorcev	referenčni kontrolni vzorec C, 2. ponov. cimetov aldehyd, 2. ponov. vzorec 1, 2. ponov. vzorec 2, 2. ponov.
Tretji sklop ponovljenih vzorcev	referenčni kontrolni vzorec C, 3. ponov. cimetov aldehyd, 3. ponov. vzorec 1, 3. ponov. vzorec 2, 3. ponov.
Referenčni kontrolni vzorci	referenčni kontrolni vzorec B, 4. ponov. referenčni kontrolni vzorec B, 5. ponov. referenčni kontrolni vzorec B, 6. ponov.

V analizo zaporedja je treba vključiti tri sklope referenčnih kontrolnih vzorcev (tj. vzorcev, sestavljenih le iz peptida, raztopljenega v ustreznem topilu):

Referenčni kontrolni vzorec A: se uporablja za preverjanje ustreznosti sistema HPLC.

Referenčni kontrolni vzorec B: je vključen na začetku in koncu analize zaporedja, da se preveri stabilnost referenčnih kontrolnih vzorcev prek celotnega trajanja analize.

Referenčni kontrolni vzorec C: je vključen v potek analize, da se preveri, da topilo, ki se uporablja za raztapljanje preskusne kemikalije, ne vpliva na odstotno vrednost izgube peptidov.

B.60 Preobčutljivost kože *in vitro*: luciferazna preskusna metoda z ARE-Nrf2

UVOD

Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD (TG) 442D (2015). Povzročitelj preobčutljivosti kože je snov, ki povzroči alergijski odziv po stiku s kožo, kot je opredeljeno v globalno usklajenem sistemu Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN) (1) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (uredbo CLP) ⁽¹⁾. Pri tej preskusni metodi se izvede postopek *in vitro* (luciferazni preskus z ARE-Nrf2) v podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, v skladu z GHS ZN (1) in uredbo CLP.

Obstaja splošno soglasje glede ključnih bioloških dogodkov, ki so osnova za preobčutljivost kože. Obstoječe znanje o kemijskih in bioloških mehanizmih, povezanih s preobčutljivostjo kože, je povzeto v obliki poteka neželenega izida (Adverse Outcome Pathway – AOP) (2) od začetnega dogodka na molekularni ravni prek vmesnih dogodkov do škodljivega učinka, tj. alergijskega kontaktnega dermatitisa pri ljudeh ali kontaktne preobčutljivosti pri glodalcih (2) (3). Začetni dogodek na molekularni ravni je kovalentna vezava elektrofilnih snovi na nukleofilne centre v beljakovinah kože. Drugi ključni dogodek v tem poteku neželenega izida se odvija v keratinocitih in vključuje vnetni odziv ter izražanje genov, povezano s posebnimi potmi celičnega signaliziranja, kot so poti, odvisne od odzivnega elementa za antioksidante/elektrofile (ARE). Tretji ključni dogodek je aktivacija dendritskih celic, ki se običajno ocenjujejo z izražanjem posebnih označevalcev celične površine, tj. kemokinov in citokinov. Četrti ključni dogodek je proliferacija celic T, kar se posredno ocenjuje pri lokalni analizi bezgavk pri miših (4).

Ocena preobčutljivosti kože se je običajno izvajala z uporabo laboratorijskih živali. Pri klasični metodi, ki temelji na morskih prašičkih, tj. Magnusson–Kligmanovem maksimizacijskem preskusu na morskih prašičkih (preskus GMPT) in Buehlerjevem preskusu (PM B.6 (5)), se proučuje preobčutljivost kože v fazah indukcije in elicitacije. Lokalna analiza bezgavk pri miših (Local Lymph Node Assay – LLNA, PM B.42 (4)) in njeni dve neradioaktivni prilagoditvi, tj. LLNA: DA (PM B.50 (6)) in LLNA: BrdU-ELISA (PM B.51 (7)), ki vse ocenjujejo le indukcijski odziv, so bile prav tako sprejete, saj je njihova prednost v primerjavi s preskusi pa morskih prašičkih v tem, da upoštevajo dobrobit živali in zagotavljajo objektivne meritve v fazi indukcije preobčutljivosti kože.

Pred kratkim pa sta se kot znanstveno veljavni za ocenjevanje nevarnosti kemikalij za preobčutljivost kože začeli šteti preskusni metodi *in chemico* ter *in vitro*, ki temeljita na mehanističnih merilih. Da bi bilo mogoče v celoti nadomestiti testiranja na živalih, ki se trenutno uporabljajo, pa bodo potrebne kombinacije metod, ki se ne izvajajo na živalih (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*) v okviru celostnih pristopov k testiranju in ocenjevanju (Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA)), pri čemer se upošteva omejeno mehanistično kritje poteka neželenega izida pri vsaki od trenutno razpoložljivih preskusnih metod, ki se ne izvajajo na živalih (2) (3).

Predlagano je, da bi ta preskusna metoda (luciferazni preskus z ARE-Nrf2) obravnavala drugi ključni dogodek, pojasnjen v odstavku 2. Poročalo se je, da povzročitelji preobčutljivosti kože povzročajo nastanek genov, ki jih urejajo odzivni elementi za antioksidante (ARE) (8) (9). Majhne elektrofilne snovi, kot so povzročitelji preobčutljivosti kože, lahko delujejo kot senzorska beljakovina Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), npr. s kovalentno spremembo ostanka cisteina, zaradi česar se disociira od transkripcijskega dejavnika Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 – jedrni dejavnik, povezan z eritroidom 2). Ta disociirani dejavnik Nrf2 lahko nato aktivira gene, odvisne od odzivnih elementov za antioksidante, kot so geni, ki kodirajo razstrupljevalne encime v fazi II (8) (10) (11).

Trenutno je edini luciferazni preskus z ARE-Nrf2 *in vitro*, ki ga zajema ta preskusna metoda, preskus KeratinoSens™, za katerega so bile izvedene validacijske študije (9) (12) (13), ki jim je sledil neodvisni medsebojni strokovni pregled, ki ga je izvedel Referenčni laboratorij Evropske unije za alternative testiranju na živalih (EURL ECVAM) (14). Preskus KeratinoSens™ se je štel kot znanstveno veljaven za uporabo v okviru IATA v podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, zaradi razvrstitve glede na nevarnost in označevanje (14). Laboratoriji, ki so preskusno metodo pripravljali izvajati, lahko rekombinantno celično linijo, ki se uporablja v preskus KeratinoSens™, dobijo s sklenitvijo licenčne pogodbe z razvijalcem preskusne metode (15).

⁽¹⁾ Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 31.12.2008, str. 1).

Opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI, UPORABNOST IN OMEJITVE

Ker aktivacija poti Keap1-Nrf2-ARE obravnava le drugi ključni dogodek poteka neželenega izida preobčutljivosti kože, informacije iz preskusnih metod, ki temeljijo na aktivaciji te poti, kot take morda ne zadostujejo za sklep o potencialu kemikalij za povzročanje preobčutljivosti kože. Zato je treba podatke, pridobljene s to preskusno metodo, obravnavati v okviru celostnih pristopov, kot je IATA, in jih združiti z drugimi dopolnilnimi informacijami, ki izhajajo na primer iz poskusov *in vitro*, s katerimi se obravnavajo drugi ključni dogodki poteka neželenega izida preobčutljivosti kože, ter nepreskusnimi metodami, vključno z navzkrižnim branjem pri podobnih kemijskih snoveh. V virih poročajo o tem, kako uporabljati luciferazno preskusno metodo z ARE-Nrf2 v kombinaciji z drugimi informacijami (13) (16) (17) (18) (19).

Ta preskusna metoda se lahko uporabi v podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože (tj. kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP) in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, v okviru IATA. Te preskusne metode ni mogoče uporabiti samostojno niti za razvrstitev povzročiteljev preobčutljivosti kože v podkategoriji 1A in 1B, kot sta opredeljeni v GHS ZN/uredbi CLP, niti za napoved stopnje povzročanja preobčutljivosti v okviru odločanja o oceni varnosti. Vendar pa je, odvisno od regulativnega okvira, pozitiven rezultat kot tak mogoče uporabiti za razvrstitev kemikalije v kategorijo 1 po GHS ZN/uredbi CLP.

Na podlagi zbirke podatkov iz validacijske študije in preskušanja v laboratoriju, ki se uporablja pri neodvisnem medsebojnem strokovnem pregledu preskusne metode, se je pokazalo, da se lahko preskus KeratinoSens™ prenese v laboratorije, ki imajo izkušnje na področju celičnih kultur. Stopnja ponovljivosti napovedi, ki jo je mogoče pričakovati pri preskusni metodi, je v enem in več laboratorijih 85-odstotna (14). V primerjavi z rezultati analize LLNA so bile točnost (77 % – 155/201), občutljivost (78 % – 71/91) in specifičnost (76 % – 84/110) preskusa KeratinoSens™ za razlikovanje med povzročitelji preobčutljivosti kože (npr. kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP) in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, izračunane ob upoštevanju vseh podatkov, poslanih EURL ECVAM za oceno in medsebojni strokovni pregled preskusne metode (14). Ti podatki so podobni nedavno objavljenim podatkom, ki temeljijo na preskušanju približno 145 snovi v laboratoriju (pri čemer je točnost 77-odstotna, občutljivost 79-odstotna in specifičnost 72-odstotna) (13). Pri preskusu KeratinoSens™ je bolj verjetno, da se podceni vrednost kemikalij z nizko do zmerno stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (tj. podkategorija 1B po GHS ZN/uredbi CLP) kot pa kemikalij z visoko stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (tj. podkategorija 1A po GHS ZN/uredbi CLP) (13) (14). Vse te informacije skupaj kažejo, da preskus KeratinoSens™ uporabno prispeva k opredelitvi nevarnosti za povzročanje preobčutljivosti kože. Vendar so tukaj navedene vrednosti točnosti za preskus KeratinoSens™ kot samostojno preskusno metodo zgolj okvirne, saj jo je treba obravnavati skupaj z drugimi viri informacij v okviru IATA in v skladu z določbami odstavka 9. Poleg tega je treba pri ocenjevanju metod za preobčutljivost kože, ki se ne izvajajo na živalih, upoštevati, da preskus LLNA ter druga testiranja na živalih razmer v proučevani vrsti, tj. pri človeku, ne izražajo v celoti.

Pojem „preskusna kemikalija“ se pri tej preskusni metodi nanaša na to, kar se preskuša, in ni povezan z uporabnostjo luciferazne preskusne metode z ARE-Nrf2 za preskušanje snovi in/ali zmesi. Na podlagi trenutno razpoložljivih podatkov se je pokazalo, da se preskus KeratinoSens™ lahko uporablja za preskusne kemikalije, ki zajemajo različne organske funkcionalne skupine, mehanizme reakcije, stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (kot je določena v študijah *in vivo*) ter fizikalno-kemijske lastnosti (9) (12) (13) (14). V glavnem so bile preskušene snovi iz ene sestavine, čeprav obstaja omejena količina podatkov o preskušanju zmesi (20). Preskusna metoda je kljub temu tehnično ustrezna tudi za preskušanje snovi z več sestavinami in zmesi. Preden se ta preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, pa je treba proučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni. Poleg tega je treba pri preskušanju snovi z več sestavinami ali zmesi upoštevati morebitno interferenco citotoksičnih sestavin z opaženimi odzivi. Preskusna metoda se uporablja za preskusne kemikalije, ki so topne ali tvorijo stabilno disperzijo (tj. koloid ali suspenzija, v kateri se preskusna kemikalija ne usede ali loči od topila v različne faze), in sicer v vodi ali DMSO (vključno z vsemi sestavinami preskusne kemikalije v primeru preskušanja snovi z več sestavinami ali zmesi). Preskusne kemikalije, ki ne izpolnjujejo teh pogojev pri najvišji

končni zahtevani koncentraciji v višini 2 000 μM (prim. odstavek 22), se lahko še vedno preskusijo pri nižjih koncentracijah. V takem primeru se lahko za opredelitev preskusne kemikalije kot povzročiteljice preobčutljivosti kože še vedno uporabijo rezultati, ki izpolnjujejo merila za pozitivnost, opisana v odstavku 39, medtem ko je treba negativen rezultat, pridobljen pri koncentracijah, manjših od 1 000 μM , obravnavati kot nedokončen (glej napovedni model v odstavku 39). V splošnem so bile uspešno preskušene snovi z logP do 5, medtem ko so bile izredno hidrofobne snovi z logP nad 7 zunaj znane uporabnosti preskusne metode (14). Za snovi, pri katerih se logP giblje v razponu od 5 do 7, so na voljo le omejeni podatki.

Negativne rezultate je treba razlagati previdno, saj se lahko s preskusno metodo odkrije, da so snovi, ki so reaktivne izključno z lizinskimi ostanki, negativne. Poleg tega se lahko zaradi omejene presnovne zmogljivosti uporabljene celične linije (21) ter preskusnih pogojev pri pro-haptenih (tj. kemikalijah, ki potrebujejo encimsko aktivacijo, na primer z encimi P450) in pre-haptenih (tj. kemikalijah, aktiviranih z avtooksidacijo), zlasti pri tistih s počasno oksidacijo, pojavijo negativni rezultati. Po drugi strani pa se lahko pri preskusnih kemikalijah, ki ne delujejo kot povzročitelji preobčutljivosti, temveč so vseeno kemični stresorji, pojavijo lažno pozitivni rezultati (14). Močno citotoksičnih preskusnih kemikalij prav tako ni mogoče vedno zanesljivo oceniti. Preskusne kemikalije, ki motijo luciferazne encime, lahko motijo dejavnost luciferaze v preskusih na osnovi celic in povzročajo bodisi očitno zaviranje bodisi povečano luminiscenco (22). Poročalo se je na primer o tem, da koncentracije fitoestrogena, višje od 1 μM , motijo luminiscenčne signale v drugih preskusih na luciferaznem poročevalskem genu zaradi prevelike aktivacije luciferaznega poročevalskega gena (23). Izražanje luciferaze, pridobljeno pri visokih koncentracijah fitoestrogenov ali podobnih kemikalij, ki domnevno povzročajo fitoestrogenu podobno preveliko aktivacijo luciferaznega poročevalskega gena, je treba pazljivo proučiti (23). Kadar se lahko dokaže, da preskusne metode ni mogoče uporabljati za druge specifične kategorije preskusnih kemikalij, se ta preskusna metoda zanje ne sme uporabiti.

Poleg tega, da preskus KeratinoSens™ podpira razlikovanje med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, zagotavlja tudi podatke o razmerju med koncentracijo in odzivom, ki lahko potencialno prispevajo k oceni stopnje povzročanja preobčutljivosti, kadar se uporabljajo v celostnih pristopih, kot je IATA (19). Vendar je potrebno nadaljnje delo, ki po možnosti temelji na zanesljivih podatkih za ljudi, da se določi, kako bi rezultati preskusa KeratinoSens™ lahko prispevali k oceni stopnje povzročanja preobčutljivosti (24) in razvrstitvi povzročiteljev preobčutljivosti v podkategorije po GHS ZN/uredbi CLP.

NAČELO PRESKUSA

Pri luciferazni preskusni metodi z ARE-Nrf2 se uporabljajo nesmrtna celična linija, pridobljena iz človeških keratinocitov HaCaT, ki so predmet stabilne transfekcije z izbirnim plazmidom. Celična linija vsebuje luciferazni gen, ki je pod transkripcijsko kontrolo konstitutivnega promotora, združenega z elementom ARE, iz gena, za katerega je znano, da ga povzročitelji preobčutljivosti kože regulirajo navzgor (25) (26). Iz luciferaznega signala je razvidno, da so ga aktivirali povzročitelji preobčutljivosti endogenih od dejavnika Nrf2 odvisnih genov in da je odvisen od luciferaznega signala v rekombinantni celični liniji na dejavniku Nrf2 (27). To omogoča kvantitativno merjenje (z zaznavanjem luminiscence) indukcije luciferaznega gena, pri čemer se kot kazalniki dejavnosti transkripcijskega dejavnika Nrf2 v celicah, po tem ko so izpostavljene elektrofilnim snovem, uporabijo dobro vzpostavljeni luciferazni substrati, ki oddajajo svetlobo.

Šteje se, da so preskusne kemikalije pri preskusu KeratinoSens™ pozitivne, če povzročajo statistično značilno indukcijo luciferazne dejavnosti nad danim pragovno vrednostjo (tj. > 1,5 krat ali 50-odstotno povečanje), pod opredeljeno koncentracijo, ki ne vpliva bistveno na viabilnost celic (tj. pod 1 000 μM in pri koncentraciji, pri kateri je viabilnost celic višja od 70 % (9) (12)). Zato se določi najvišje razmerje indukcije luciferazne dejavnosti v kontroli s topilom (negativni kontroli) (I_{max}). Ker so celice izpostavljene seriji koncentracij preskusnih kemikalij, je treba koncentracijo, potrebno za statistično značilno indukcijo luciferazne dejavnosti nad pragovno vrednostjo (tj. vrednostjo $EC_{1,5}$), interpolirati iz krivulje odziva na odmerek (za izračune glej odstavek 32). Nazadnje je treba opraviti vzoredne meritve citotoksičnosti, da se oceni, ali se ravni indukcije luciferazne dejavnosti pojavijo pri subcitotoksičnih koncentracijah.

Pred redno uporabo luciferaznega preskusa z ARE-Nrf2, ki izpolnjuje zahteve te preskusne metode, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost, tako da uporabijo deset snovi za preverjanje usposobljenosti, navedenih v Dodatku 2.

Standardi izvajanja (SI) (28), ki so na voljo, omogočajo poenostavitev validacije novih ali prilagojenih luciferaznih preskusnih metod z ARE-Nrf2 *in vitro*, ki so podobne preskusu KeratinoSens™, ter pravočasno spremembo te preskusne metode za njihovo vključitev. Medsebojno priznavanje podatkov v skladu s sporazumom OECD bo zagotovljeno le za preskusne metode, validirane v skladu z SI, če je te preskusne metode pregledala OECD in jih vključila v ustrezno preskusno smernico.

POSTOPEK

Trenutno je edina metoda, ki jo zajema ta preskusna metoda, znanstveno veljavni preskus KeratinoSens™ (9) (12) (13) (14). Na voljo so standardni delovni postopki za preskus KeratinoSens™, ki jih je treba uporabljati pri izvajanju in uporabi preskusne metode v laboratoriju (15). Laboratoriji, ki želijo izvajati to preskusno metodo, lahko rekombinantno celično linijo, ki se uporablja pri preskusu KeratinoSens™, dobijo s sklenitvijo licenčne pogodbe z razvijalcem preskusne metode. V naslednjih odstavkih so opisani glavne sestavine in postopki luciferazne preskusne metode z ARE-Nrf2.

Priprava keratinocitnih kultur

Uporabiti je treba transgensko celično linijo s stabilno vstavitvijo luciferaznega poročevalskega gena pod kontrolo elementa ARE (npr. celično linijo KeratinoSens™). Celice se po prejemu namnožijo (npr. 2 do 4 pasaže) in shranijo zamrznjene kot homogena zaloga. Celice iz originalne zaloge se lahko namnožijo do največjega števila pasaž (npr. 25 v primeru KeratinoSens™) in se uporabijo pri rednem preskušanju z uporabo ustreznega vzdrževalnega gojišča (v primeru KeratinoSens™ to pomeni DMEM, ki vsebuje serum in Geneticin).

Za preskušanje mora biti konfluenta celic 80–90-odstotna in zagotoviti je treba, da se celice nikoli ne gojijo do popolne konfluente. Celice je treba odvzeti en dan pred preskušanjem in razdeliti v 96-jamične mikrotitrne plošče (10 000 celic na jamico v primeru KeratinoSens™). Pozornost je treba posvetiti temu, da se med nasaditvijo izognemo sedimentaciji celic, tako da je število celic homogeno porazdeljeno med jamicami. V nasprotnem primeru lahko pri tem koraku nastane visoka variabilnost med posameznimi celicami. Pri vsaki ponovitvi se za meritev luciferazne dejavnosti uporabijo trije ponovljeni vzorci ter en vzporeden ponovljen vzorec za preskus viabilnosti celic.

Priprava preskusne kemikalije in kontrolnih snovi

Preskusna kemikalija in kontrolne snovi se pripravijo na dan preskusa. Za preskus KeratinoSens™ se preskusne kemikalije raztopijo v dimetil sulfoksidu (DMSO) do končne zelene koncentracije (npr. 200 mM). Za raztopine DMSO se lahko šteje, da se same sterilizirajo, zato sterilna filtracija ni potrebna. Preskusna kemikalija, ki ni topna v DMSO, se raztopi v sterilni vodi ali gojišču, raztopine pa se sterilizirajo, npr. s filtracijo. Za preskusne kemikalije brez določene molekulske mase (MM) se pripravi osnovna raztopina do privzete koncentracije (40 mg/ml ali 4 % (m/v)) v preskusu KeratinoSens™. Če se uporabljajo druga topila kot DMSO, voda ali gojišče, jih je treba zadostno znanstveno utemeljiti.

Iz osnovnih raztopin preskusne kemikalije v DMSO se pripravijo zaporedne razredčitve, pri čemer se uporabi DMSO, da se pridobi 12 izhodiščnih koncentracij kemikalije, ki se preskuša (od 0,098 do 200 mM v preskusu KeratinoSens™). Pri preskusnih kemikalijah, ki niso topne v DMSO, se razredčine za pridobitev izhodiščnih koncentracij pripravijo s sterilno vodo ali sterilnim gojiščem. Izhodiščne koncentracije se neodvisno od uporabljenega topila nato nadalje 25-kratno razredčijo v gojišču, ki vsebuje serum, nazadnje pa končno uporabijo za tretiranje z nadaljnjim 4-kratnim faktorjem razredčenja, tako da se v preskusu KeratinoSens™ končne koncentracije preskušene kemikalije gibljejo v razponu od 0,98 do 2 000 µM. Če se uporabljajo druge koncentracije, jih je treba utemeljiti (npr. v primeru citotoksičnosti ali slabe topnosti).

Negativna kontrola (kontrola s topilom), uporabljena pri preskusu KeratinoSens™, je DMSO (št. CAS 67-68-5, s čistostjo $\geq 99\%$) in zanjo se pripravi šest jamic na pladenj. Ta kontrola se razredči tako kot izhodiščne koncentracije, kar je opisano v odstavku 22, tako da je končna koncentracija negativne kontrole (kontrola s topilom), za katero je znano, da ne vpliva na viabilnost celic, ter ki ustreza enaki koncentraciji DMSO, najdeni v preskusni kemikaliji in pozitivni kontroli, enaka 1 %. Za preskusno kemikalijo, ki ni topna v DMSO, za katero so bile pripravljene razredčitve v vodi, je treba stopnjo DMSO v končni preskusni raztopini prilagoditi na 1 %, kot pri ostalih preskusnih kemikalijah in kontrolnih snoveh.

Pozitivna kontrola, uporabljena v primeru preskusa KeratinoSens™, je cimetov aldehid (št. CAS 14371-10-9, s čistostjo $\geq 98\%$) in zanjo se pripravi sklop 5 izhodiščnih koncentracij, ki se gibljejo v razponu od 0,4 do 6,4 mM, v DMSO (iz 6,4 mM osnovne raztopine), ki se razredčijo, kot je za izhodiščne koncentracije opisano v odstavku 22, tako da se končna koncentracija pozitivne kontrole giblje v razponu od 4 do 64 µM. Če so na voljo podatki iz preteklih preskusov za pridobitev primerljivih meril za sprejemljivost ponovitev, se lahko uporabijo druge ustrezne pozitivne kontrole, s katerimi se po možnosti zagotavljajo vrednosti $EC_{1,5}$ v sredini območja.

Nanos preskusne kemikalije in kontrolnih snovi

Za vsako preskusno kemikalijo in pozitivno kontrolno snov je potreben en poskus za izpeljavo napovedi (pozitivne ali negativne), ki mora biti sestavljen iz vsaj dveh neodvisnih ponovitev, ki vsebujeta vsaka po tri ponovljene vzorce (tj. $n = 6$). Če rezultati dveh neodvisnih ponovitev niso skladni, je treba izvesti tretjo ponovitev, ki vsebuje tri ponovljene vzorce (tj. $n = 9$). Vsaka neodvisna ponovitev se izvede na drug dan s svežo osnovno raztopino preskusnih kemikalij in neodvisno odvzetimi celicami. Vendar lahko celice izhajajo iz iste pasaže.

Po nasaditvi, kot je opisano v odstavku 20, se celice gojijo 24 ur v 96-jamičnih mikrotitrskih ploščah. Medij se nato odstrani in zamenja s svežim gojiščem (150 µl gojišča, ki vsebuje serum, vendar v primeru KeratinoSens™ brez Geneticina), v katerega se doda 50 µl 25-kratno razredčene preskusne kemikalije in kontrolnih snovi. Vsaj eno jamico na pladenj je treba pustiti prazno (brez celic in obdelave) zaradi ocene vrednosti v ozadju.

Obdelani pladnji se nato v preskusu KeratinoSens™ inkubirajo za približno 48 ur pri 37 ± 1 °C v prisotnosti 5 % CO_2 . Paziti je treba, da hlapne preskusne kemikalije ne izhlapijo in da ne pride do navzkrižne kontaminacije med jamicami s preskusno kemikalijo, npr. s prekrivanjem pladnjev s folijo pred inkubacijo s preskusnimi kemikalijami.

Meritve luciferazne dejavnosti

Pri zagotavljanju ustreznih odčitavanj luminiscence so ključni trije dejavniki:

- izbira občutljivega luminometra,
- izbira dovolj visokega pladnja, da se prepreči majhna navzkrižna kontaminacija s svetlobo, in
- uporaba substrata luciferaze z ustrežno izhodno svetlobo, da se zagotovi ustrezna občutljivost in majhna variabilnost.

Pred preskušanjem je treba izvesti poskusni kontrolni sistem, kot je opisano v Dodatku 3, s čimer se zagotovi, da so izpolnjene te tri točke.

Celice se po 48-urni izpostavljenosti preskusni kemikaliji in kontrolnim snovem v preskusu KeratinoSens™ sperejo s fosfatnim pufrom s soljo, v vsako jamico pa se za 20 min pri sobni temperaturi doda ustrezní lizni pufer za odčitavanje luminiscence.

Pladnji s celičnim lizatom se nato vstavijo v luminometer za odčitavanje, ki je v preskusu KeratinoSens™ programiran tako, da (i) se v vsako jamico doda luciferazni substrat (tj. 50 µl), (ii) počaka 1 sekundo in (iii) za 2 sekundi vključi luciferazna dejavnost. Če se uporabijo drugačne nastavitve, npr. glede na uporabljeni model luminometra, jih je treba utemeljiti. Poleg tega se lahko uporabi tudi substrat, ki oddaja svetlobo, če je poskus za nadzor kakovosti iz Dodatka 3 uspešno izveden.

Ocena citotoksičnosti

Pri preskusu viabilnosti celic KeratinoSens™ se medij po 48-urni izpostavljenosti zamenja s svežim medijem, ki vsebuje MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid, tiazolil modro tetrazol bromid, št. CAS 298-93-1), celice pa se za 4 ure inkubirajo pri 37 °C v prisotnosti 5 % CO₂. Medij MTT se nato odstrani in celice se čez noč lizirajo (npr. z dodatkom 10-odstotne raztopine natrijevega dodecil sulfata (SDS) v vsako jamico). Po stresanju se s fotometrom izmeri absorpcija pri 600 nm.

PODATKI IN POROČANJE

Ocenjevanje podatkov

Pri preskusu KeratinoSens™ se izračunajo naslednji parametri:

- vrednost najvišjega povprečnega razmerja indukcije luciferazne dejavnosti (I_{max}), opažena pri kateri koli koncentraciji preskusne kemikalije in pozitivni kontroli;
- vrednost EC_{1,5}, ki pomeni koncentracijo, pri kateri indukcija luciferazne dejavnosti preseže 1,5-kratno pragovno vrednost (tj. se luciferazna dejavnost poveča za 50 %); ter
- vrednosti koncentracij IC₅₀ in IC₃₀ pri 50-odstotnem in 30-odstotnem zmanjšanju viabilnosti celic.
- Z enačbo 1 se izračuna razmerje indukcije luciferazne dejavnosti, skupno najvišje razmerje indukcije (I_{max}) pa se izračuna kot povprečje posameznih ponovitev.

Enačba 1:

$$\text{razmerje indukcije} = \frac{(L_{\text{vzorec}} - L_{\text{prazno}})}{(L_{\text{topilo}} - L_{\text{prazno}})}$$

pri čemer je:

L_{vzorec} odčitek luminiscence v jamici s preskusno kemikalijo;

L_{prazno} odčitek luminiscence v prazni jamici, ki ne vsebuje celic in ni obdelana;

L_{topilo} odčitek povprečne luminiscence v jamicah, ki vsebujejo celice in kontrolo s topilom (negativno kontrolo).

Vrednost EC_{1,5} se v skladu z enačbo 2 izračuna z linearno interpolacijo, skupna vrednost EC_{1,5} pa se izračuna kot geometrijska sredina posameznih ponovitev.

Enačba 2:

$$EC_{1,5} = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1,5 - I_a}{I_b - I_a} \right) + C_a$$

pri čemer je:

C_a najnižja koncentracija v μM z razmerjem indukcije $> 1,5$;

C_b najvišja koncentracija v μM z razmerjem indukcije $< 1,5$;

I_a razmerje indukcije, izmerjeno pri najnižji koncentraciji z razmerjem indukcije $> 1,5$ (srednja vrednost treh jamic s ponovljenimi vzorci);

I_b razmerje indukcije, izmerjeno pri najvišji koncentraciji z razmerjem indukcije $< 1,5$ (srednja vrednost treh jamic s ponovljenimi vzorci).

Viabilnost se izračuna z enačbo 3:

Enačba 3:

$$\text{Viabilnost} = \frac{(V_{\text{vzorec}} - V_{\text{prazno}})}{V_{\text{topilo}} - V_{\text{prazno}}} \times 100$$

pri čemer je:

V_{vzorec} odčitek absorbance MTT v jamici s preskusno kemikalijo;

V_{prazno} odčitek absorbance MTT v prazni jamici, ki ne vsebuje celic in ni obdelana;

V_{topilo} odčitek povprečne absorbance MTT v jamicah, ki vsebujejo celice in kontrolo s topilom (negativno kontrolo).

Vrednosti IC_{50} in IC_{30} se izračunata z linearno interpolacijo v skladu z enačbo 4, skupni vrednosti IC_{50} in IC_{30} pa se izračunata kot geometrijska sredina posameznih ponovitev.

Enačba 4:

$$IC_x = (C_b - C_a) \times \left(\frac{(100 - x) - V_a}{V_b - V_a} \right) + C_a$$

pri čemer je:

X zmanjšanje koncentracije, ki jo je treba izračunati, v % (50 oz. 30 za IC_{50} oz. IC_{30});

C_a najnižja koncentracija v μM z zmanjšanjem viabilnosti $> x$ %;

C_b najvišja koncentracija v μM z zmanjšanjem viabilnosti $< x$ %;

V_a viabilnost v % pri najnižji koncentraciji z zmanjšanjem viabilnosti $> x$ %;

V_b viabilnost v % pri najvišji koncentraciji z zmanjšanjem viabilnosti $< x$ %.

Pri vsaki koncentraciji, pri kateri se pokaže razmerje indukcije luciferazne dejavnosti $> 1,5$, se izračuna statistična značilnost (npr. z dvodelnim Studentovim t-testom), pri čemer se primerjajo vrednosti luminiscence za tri ponovljene vzorce z vrednostmi luminiscence v jamicah s kontrolo s topilom (negativna kontrola), da se določi, ali je indukcija luciferazne dejavnosti statistično značilna ($p < 0,05$). Najnižja koncentracija z razmerjem indukcije luciferazne dejavnosti $> 1,5$ je vrednost, ki določa vrednost $EC_{1,5}$. V vsakem primeru se preveri, ali je ta vrednost nižja od vrednosti IC_{30} , kar pomeni manj kot 30-odstotno zmanjšanje viabilnosti celic pri koncentraciji, s katero se določa $EC_{1,5}$.

Priporočeno je, da se podatki vizualno pregledajo z grafi. Če ni opaziti jasne krivulje odziva na odmere ali če je krivulja odziva na odmerek bifazna (kar pomeni, da dvakrat prečka mejno vrednost 1,5), je treba poskus ponoviti, da se preveri, ali je to specifično za preskusno kemikalijo ali posledica poskusnega artefakta. Če je bifazni odziv mogoče ponoviti v neodvisnem poskusu, je treba poročati o nižji vrednosti $EC_{1,5}$ (koncentracija, pri kateri je mejna vrednost 1,5 presežena prvič).

V redkih primerih, ko je opaziti statistično neznačilno razmerje indukcije nad 1,5, ki ji sledi višja koncentracija s statistično značilno indukcijo, se rezultati iz te ponovitve štejejo kot veljavni in pozitivni le, če je bilo za necitotoksično koncentracijo pridobljeno statistično značilno razmerje indukcije nad pragovno vrednostjo 1,5.

Pri preskusnih kemikalijah, pri katerih se že pri najnižji preskusni koncentraciji, ki je $0,98 \mu\text{M}$, ustvari razmerje indukcije v višini 1,5 ali več, se vrednost $EC_{1,5} < 0,98$ določi na podlagi vizualnega pregleda krivulje odziva na odmerek.

Merila za sprejemljivost

Pri uporabi preskusa KeratinoSens™ morajo biti izpolnjena naslednja merila za sprejemljivost. Indukcija luciferazne dejavnosti, pridobljena s pozitivno kontrolo, tj. cimetovim aldehydom, mora v vsaj eni od preskušanih koncentracij (od 4 do $64 \mu\text{M}$) statistično značilno presežati pragovno vrednost v višini 1,5 (npr. z uporabo t-preskusa).

Vrednost $EC_{1,5}$ mora biti znotraj dveh standardnih odklonov srednje vrednosti preskusnega laboratorija iz preteklih preskusov (tj. med $7 \mu\text{M}$ in $30 \mu\text{M}$ na podlagi validacijske zbirke podatkov), ki jo je treba redno posodabljati. Poleg tega se mora povprečna indukcija treh ponovljenih vzorcev s cimetovim aldehydom pri $64 \mu\text{M}$ gibati v razponu od 2 do 8. Če slednje merilo ni izpolnjeno, je treba pazljivo preveriti razmerje med odmerkom in odzivom cimetovega aldehyda, preskusi pa so sprejemljivi le, če obstaja jasno razmerje med odmerkom in odzivom z naraščajočo indukcijo luciferazne dejavnosti pri večjih koncentracijah za pozitivno kontrolo.

Povprečni koeficient variacije odčitkov luminiscence za negativno kontrolo (kontrolno s topilom) v DMSO ne sme presežati 20 % pri vsaki ponovitvi, ki je sestavljena iz 6 jamic, preskušanih v treh ponovitvah. Če je variabilnost višja, je treba rezultate zavreči.

Razlaga rezultatov in napovedni model

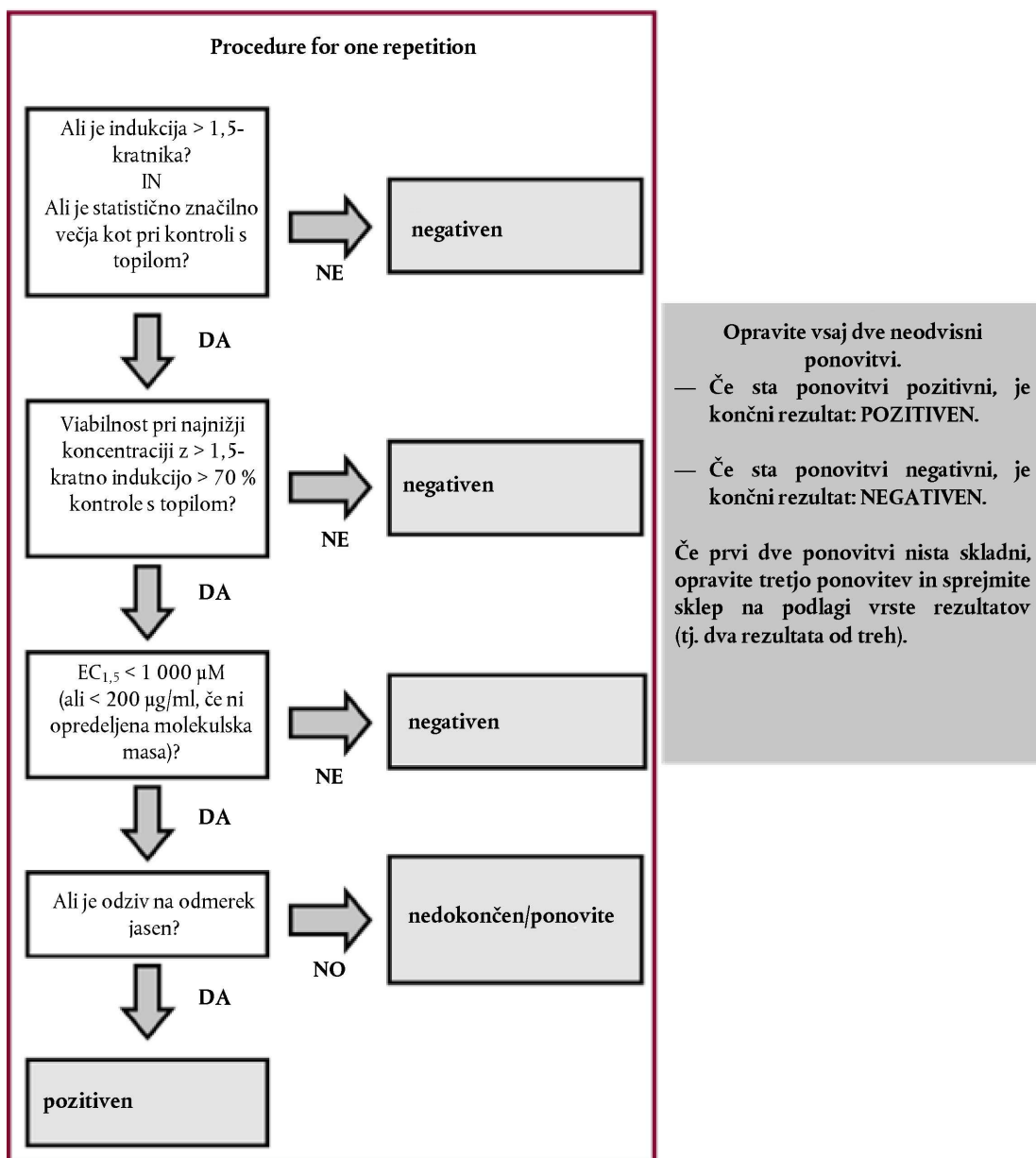
Napoved KeratinoSens™ se obravnava kot pozitivna, če so izpolnjeni vsi naslednji štiri pogoji v dveh od dveh ponovitev ali v enakih dveh od treh ponovitev, v nasprotnem primeru se napoved KeratinoSens™ obravnava kot negativna (slika 1):

1. I_{max} je višja od (>) 1,5-kratne in statistično značilno drugačna kot pri kontrolnem vzorcu s topilom (negativni kontroli) (kot je ugotovljeno z dvostranskim, neparnim Studentovim t-testom);
2. viabilnost celic je višja od (>) 70 % pri najnižji koncentraciji z indukcijo dejavnosti luciferaze, ki presega 1,5-kratno (tj. pri koncentraciji za določanje $EC_{1,5}$);
3. vrednost $EC_{1,5}$ je manjša od (<) $1\ 000 \mu\text{M}$ (ali $< 200 \mu\text{g/ml}$ za preskusne kemikalije brez opredeljene molekulske mase);
4. za indukcijo luciferaze obstaja očiten splošen odziv na odmerek (ali dvofazen odziv, kot je omenjeno v odstavku 33).

Če so v dani ponovitvi izpolnjeni vsi prvi trije pogoji, ni pa mogoče ugotoviti jasnega odziva na odmerek za indukcijo luciferaze, je treba rezultat te ponovitve obravnavati kot nedokončen in morda bodo potrebni nadaljnji preskusi (slika 1). Poleg tega je treba kot nedokončnega obravnavati tudi negativen rezultat, pridobljen s koncentracijami $< 1\ 000 \mu\text{M}$ (ali $< 200 \mu\text{g/ml}$ za preskusne kemikalije brez opredeljene molekulske mase) (glej odstavek 11).

Slika 1

Napovedni model, uporabljen v preskus KeratinoSens™. Napoved KeratinoSens™ je treba obravnavati v okviru IATA ter v skladu z določbami iz odstavkov 9 in 11.



V redkih primerih so lahko preskusne kemikalije, ki povzročijo dejavnost luciferaze zelo blizu citotoksičnih ravni, pozitivne v nekaterih ponovitvah na necitotoksičnih ravneh (tj. koncentracija za določanje $EC_{1,5}$ je nižja od (\leq) IC_{30}), v drugih ponovitvah pa samo na citotoksičnih ravneh (tj. koncentracija za določanje $EC_{1,5}$ je višja od ($>$) IC_{30}). Take preskusne kemikalije je treba ponovno preskusiti z ožjo analizo odziva na odmerek, pri čemer se uporabi nižji faktor razredčenja (npr. 1,33- ali Ö2 (= 1,41)-kratno razredčenje med jamicami), da se ugotovi, ali je do indukcije prišlo na citotoksičnih ravneh ali ne (9).

Poročilo o preskusu

V poročilo o preskusu se vključijo naslednji podatki:

Preskusna kemikalija:

— snov iz ene sestavine:

- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;

- fizični videz, topnost v vodi, topnost v DMSO, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo;
- čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
- preskušene koncentracije;
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;
- snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:
 - čim obsežnejša opredelitev lastnosti, na primer s kemijsko identiteto (glej zgoraj), čistostjo, kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi (glej zgoraj) sestavin, če so na voljo;
 - fizični videz, topnost v vodi, topnost v DMSO in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo;
 - molekulska masa ali navidezna molekulska masa v primeru zmesi/polimerov z znano sestavo ali drugi podatki, pomembni za izvedbo študije;
 - obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
 - preskušene koncentracije;
 - pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo.

Kontrole:

- pozitivna kontrola:
 - kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;
 - fizični videz, topnost v vodi, topnost v DMSO, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo in če je ustrezno;
 - čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
 - obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
 - preskušene koncentracije;
 - pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;
 - sklicevanje na rezultate pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov, ki kažejo ustrezna merila za sprejemljivost ponovitev, če je to ustrezno;
- negativna kontrola (z vehiklom):
 - kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS in/ali drugi identifikatorji;
 - čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
 - fizični videz, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če se uporabijo druge negativne kontrole/vehikli razen tistih, ki so navedeni pri tej preskusni metodi, in če so na voljo;
 - pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;
 - utemeljitev izbire topila za vsako preskusno kemikalijo.

Pogoji preskusne metode:

- ime in naslov naročnika, preskuševalnega laboratorija in vodje študije;
- opis uporabljene preskusne metode;
- uporabljena celična linija, pogoji njenega hranjenja in vir (npr. laboratorij, ki jo je zagotovil);
- število pasaž in stopnja konfluente celic, uporabljenih za preskušanje;
- metoda štetja celic, uporabljena za nasaditev pred preskušanjem, in ukrepi, sprejeti za zagotovitev homogene porazdelitve števila celic (glej tudi odstavke 20);
- uporabljeni luminometer (npr. model), vključno z nastavitvami instrumenta, uporabljenim substratom luciferaze in prikazom ustreznih meritev luminiscence, ki temeljijo na kontrolnem preskusu, opisanem v Dodatku 3;
- postopek, uporabljen za dokazovanje usposobljenosti laboratorija v zvezi z izvedbo preskusne metode (npr. s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti) ali za prikaz ponovljivosti izvedbe preskusne metode v daljšem časovnem obdobju.

Preskusni postopek:

- uporabljeno število ponovitev in ponovljenih vzorcev;
- uporabljene koncentracije preskusnih kemikalij, postopek dodajanja in čas izpostavljenosti (če je drugačen od priporočenega);
- opis uporabljenih meril za ocenjevanje in odločitve;
- opis uporabljenih meril za sprejemljivost študije;
- opis vseh prilagoditev preskusnega postopka.

Rezultati:

- Preglednice z vrednostmi I_{max} , $EC_{1.5}$ in vrednostmi viabilnosti (tj. IC_{50} , IC_{30}), ki so bile pridobljene za preskusno kemikalijo in pozitivno kontrolo za vsako ponovitev, ter srednje vrednosti (I_{max} : povprečje; $EC_{1.5}$ in vrednosti viabilnosti: geometrijska sredina) in standardni odklon (SD), izračunan na podlagi podatkov iz vseh posameznih ponovitev, ter indikacija ocene preskusne kemikalije glede na napovedni model;
- koeficient variacije, pridobljen z meritvami luminiscence za negativno kontrolo za vsak poskus;
- graf, ki prikazuje krivulje odziva na odmerek za indukcijo dejavnosti luciferaze in viabilnost;
- opis kakršnih koli drugih pomembnih opažanj, če je ustrezno.

Razprava o rezultatih:

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

Sklepne ugotovitve

VIRI

- (1) Združeni narodi (ZN) (2013). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS), peta revidirana izdaja, ZN New York in Ženeva, 2013. Na voljo na: 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. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Pariz.

- (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., Felner 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, 367–485.
- (4) Poglavje B.42 te priloge: Preobčutljivost kože: lokalna analiza bezgavk.
- (5) Poglavje B.6 te priloge: Senzibilizacija kože.
- (6) Poglavje B.50 te priloge: Preobčutljivost kože: lokalna analiza bezgavk: DA.
- (7) Poglavje B.51 te priloge: Preobčutljivost kože: lokalna analiza bezgavk: 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, 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, 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, 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), 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, 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, 1337–1352.
- (14) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 str. Na voljo na: 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 str. Na voljo na: <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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 646–657.
 - (23) OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. OECD, Pariz.
 - (24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 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, 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, 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, 2225–2232.
 - (28) OECD (2015). Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No 213, OECD, Pariz.
 - (29) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Pariz.
 - (30) NAFTA (Sporazum o severnoameriškem prosto-trgovinskem območju) (2012). Technical Working Group on Pesticides – (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 str. <http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf>.
-

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Točnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov „ustreznosti“. Ta izraz in izraz „skladnost“ se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusne metode (29).

Potek neželenega izida (Adverse Outcome Pathway – AOP): zaporedje dogodkov od kemijske strukture ciljne kemikalije ali skupine podobnih kemikalij prek začetnega dogodka na molekularni ravni do preiskovanega rezultata *in vivo* (2).

ARE (element antioksidativnega odziva – antioxidant response element): (imenuje se tudi EpRE oziroma element elektrofilnega odziva) je element odziva v zgornji promotorski regiji mnogih genov za zaščito celic in genov faze II. Ko se aktivira z Nrf2, posreduje v transkripcijski indukciji teh genov.

Kemikalija: snov ali zmes.

Koeficient variacije: merilo variabilnosti, ki se za skupino podatkov za ponovljene vzorce izračuna tako, da se standardni odklon deli s srednjo vrednostjo. Lahko se pomnoži s 100, da se izrazi v odstotkih.

EC_{1,5}: interpolirana koncentracija za 1,5-kratno indukcijo luciferaze.

IC₃₀: koncentracija, ki vpliva na zmanjšanje viabilnosti celic za 30 %.

IC₅₀: koncentracija, ki vpliva na zmanjšanje viabilnosti celic za 50 %.

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

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

I_{max}: največji faktor indukcije luciferazne dejavnosti v primerjavi s kontrolnim vzorcem s topilom (negativno kontrolo), ki se meri za vse koncentracije preskusnih kemikalij.

Keap1: „Kelch-like ECH-associated protein 1“ je senzorska beljakovina, ki lahko uravnava dejavnost Nrf2. V neinduciranih pogojih je senzorska beljakovina Keap1 ciljno usmerjena v transkripcijski dejavnik Nrf2 za ubikvitinacijo in proteolitsko razgradnjo v proteasomu. Kovalentna modifikacija reaktivnih cisteinskih ostankov beljakovine Keap1 z majhnimi molekulami lahko povzroči disociacijo Nrf2 od beljakovine Keap1 (8) (10) (11).

Zmes: zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi, ki v njej ne reagirajo (1).

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

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

Nrf2: jedrni faktor (izpeljan iz eritroblasta 2)-kot 2 je transkripcijski dejavnik, ki sodeluje pri poteku antioksidativnega odziva. Ko Nrf2 ni ubikvitiniran, se nakopiči v citoplazmi in premakne v jedro, kjer se združi z ARE v zgornji promotorski regiji mnogih genov za zaščito celic ter s tem začne njihovo transkripcijo (8) (10) (11).

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

Ustreznost: opis razmerja med preskusom in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere preskus pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Ustreznost upošteva tudi točnost (skladnost) preskusne metode (29).

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusne metode v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih in interne laboratorijske ponovljivosti (29).

Obnovljivost: ujemanje rezultatov, pridobljenih s preskušanjem iste kemikalije in uporabo istega preskusnega protokola (glej zanesljivost) (29).

Občutljivost: delež vseh pozitivnih/aktivnih kemikalij, ki se s preskusno metodo pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (29).

Kontrola s topilom/vehiklom: ponovljen vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema razen preskusne kemikalije, vključuje pa topilo, ki se uporabi. Uporablja se za določanje izhodiščnega odziva za vzorce, tretirane s preskusno kemikalijo, raztopljeno v istem topilu.

Specifičnost: delež vseh negativnih/neaktivnih kemikalij, ki se s preskusno metodo pravilno razvrstijo. To je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in je pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (29).

Snov: kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo (1).

Preskusna kemikalija: pojem „preskusna kemikalija“ se uporablja za opisovanje tega, kar se preskuša.

Globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudje (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (1).

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

Veljavna preskusna metoda: preskusna metoda, ki se obravnava kot dovolj ustrezna in zanesljiva za določeni namen ter temelji na znanstveno utemeljenih načelih. Preskusna metoda ni nikoli veljavna v absolutnem smislu, ampak samo v zvezi z opredeljenim namenom (29).

Dodatek 2

SNOVI ZA PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI

Preobčutljivost kože *in vitro*: luciferazna preskusna metoda z ARE-Nrf2

Pred redno uporabo te preskusne metode morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost tako, da pravilno pridobijo napovedi KeratinoSens™, pričakovane za 10 snovi za preverjanje usposobljenosti, ki so priporočene v preglednici 1, ter vrednosti EC_{1,5} in IC₅₀, ki so za vsaj 8 od 10 snovi za preverjanje usposobljenosti v ustreznem referenčnem območju. Te snovi za preverjanje usposobljenosti so bile izbrane, ker predstavljajo celoten razpon odzivov pri nevarnostih v zvezi s povzročanjem preobčutljivosti kože. Druga merila za izbiro so bila dostopnost na trgu, dostopnost visokokakovostne reference *in vivo* in dostopnost visokokakovostnih podatkov *in vitro* iz preskusa KeratinoSens™.

Preglednica 1

Priporočene snovi za dokazovanje tehnične usposobljenosti za preskus KeratinoSens™

Snovi za preverjanje tehnične usposobljenosti	Št. CAS	Agregatno stanje	Napoved <i>in vivo</i> (1)	Napoved KeratinoSens™ (2)	Referenčno območje EC _{1,5} (μM) (3)	Referenčno območje IC ₅₀ (μM) (3)
izopropanol	67-63-0	tekočina	ne povzroča preobčutljivosti	negativna	> 1 000	> 1 000
salicilna kislina	69-72-7	trdna snov	ne povzroča preobčutljivosti	negativna	> 1 000	> 1 000
mlečna kislina	50-21-5	tekočina	ne povzroča preobčutljivosti	negativna	> 1 000	> 1 000
glicerol	56-81-5	tekočina	ne povzroča preobčutljivosti	negativna	> 1 000	> 1 000
cinamil alkohol	104-54-1	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (šibek)	pozitivna	25–175	> 1 000
etilen glikol dime-takrilat	97-90-5	tekočina	povzročitelj preobčutljivosti (šibek)	pozitivna	5–125	> 500
2-merkaptobenzo-tiazol	149-30-4	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (zmeren)	pozitivna	25–250	> 500
metildibromo glu-taronitril	35691-65-7	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (močan)	pozitivna	< 20	20–100
4-metilaminofenol sulfat	55-55-0	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (močan)	pozitivna	< 12,5	20–200
2,4-dinitro-kloro-benzen	97-00-7	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (izjemno močan)	pozitivna	< 12,5	5–20

(1) Napovedi nevarnosti (in moči) *in vivo* temeljijo na podatkih LLNA (13). Moč *in vivo* se izpelje s pomočjo meril, ki jih je predlagal ECETOC (24).

(2) Napoved KeratinoSens™ je treba obravnavati v okviru IATA ter v skladu z določbami iz odstavkov 9 in 11 te preskusne metode.

(3) Na podlagi ugotovljenih vrednostih iz preteklih preskusov (12).

Dodatek 3

KONTROLA KAKOVOSTI ZA MERITVE LUMINISCENCE**Osnovni preskus za zagotavljanje optimalnih meritev luminiscence pri preskusu KeratinoSens™**

Naslednji trije parametri so ključni za zagotavljanje zanesljivih rezultatov z luminometrom:

- zadostna občutljivost, ki omogoča stabilno ozadje v jamicah s kontrolnim vzorcem;
- ni razlik preko plošče zaradi dolgega odčitavanja in
- ni svetlobnega onesnaženja v jamicah poleg močno aktivnih jamic.

Pred preskušanjem je priporočeno, da se zagotovijo ustrezne meritve luminiscence s preskušanjem postavitve kontrolne plošče, kot je opisano spodaj (tri analize).

Postavitev plošče za prvi kontrolni poskus

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	EGDM-A 0,98	EGDM-A 1,95	EGDM-A 3,9	EGDM-A 7,8	EGDM-A 15,6	EGDM-A 31,25	EGDM-A 62,5	EGDM-A 125	EGDM-A 250	EGDM-A 500	EGDM-A 1 000	EGDM-A 2 000
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	CA 4	CA 8	CA 16	CA 32	CA 64	slepa kontrola

EGDMA = etilen glikol dimetakrilat (št. CAS: 97-90-5), kemikalija z močnimi učinki

CA = cimetov aldehyd, pozitivna referenčna kemikalija (št. CAS: 104-55-2)

Analiza kontrole kakovosti bi morala pokazati:

- jasen odziv na odmerek v vrstici D, z vrednostjo $I_{\max} > 20$ -krat večja od ozadja (v večini primerov se dosežejo vrednosti I_{\max} med 100 in 300);

-
- ni odziva na odmere v vrsticah C in E (nobena indukcijska vrednost ni višja od 1,5 (v najboljšem primeru ni višja od 1,3) zaradi morebitnega svetlobnega onesnaženja, zlasti poleg močno aktivnih jamic v vrstici EGDMA;
 - ni statistično značilnih razlik med vrsticami A, B, C, E, F in G. (tj. brez razlik preko plošče); in
 - variabilnost v kateri koli od vrstic A, B, C, E, F in G ter v jamicah z DMSO v vrstici H bi morala biti manjša od 20 % (tj. stabilno ozadje).
-

B.61 Preskusna metoda uhajanja fluoresceina za opredeljevanje jedkih in zelo dražilnih snovi za oči

UVOD

Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD (TG) 460 (2012). Preskusna metoda uhajanja fluoresceina (ang. *Fluorescein Leakage*, FL) je preskusna metoda *in vitro*, ki se lahko uporabi v določenih okoliščinah in s posebnimi omejitvami za razvrstitev kemikalij (snovi in zmesi) med jedke in zelo dražilne snovi za oči, kakor to opredeljujejo Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS) Združenih narodov (ZN) (kategorija 1), Uredba (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (CLP) ⁽¹⁾ (kategorija 1) in Agencija ZDA za varstvo okolja (US EPA) (kategorija I) (1) (2). Za namen te preskusne metode so zelo dražilne snovi za oči opredeljene kot kemikalije, ki po dajanju preskusne kemikalije povzročijo poškodbo očesnega tkiva, ki ni popravljiva v roku 21 dni, ali povzročijo resno fizično okvaro vida, jedke snovi za oči pa so kemikalije, ki povzročijo nepopravljivo poškodbo očesnega tkiva. Te kemikalije so razvrščene v kategorijo 1 po GHS ZN, kategorijo 1 po CLP EU ali kategorijo I po US EPA.

Čeprav se preskusna metoda FL ne obravnava kot veljaven in celovit nadomestek za očesno študijo *in vivo* na kuncih, se vseeno priporoča za uporabo kot del večstopenjske strategije preskušanja za regulativno razvrščanje in označevanje. Priporoča se torej kot prvi korak v okviru pristopa od zgoraj navzdol, da se opredelijo jedke/zelo dražilne snovi za oči, zlasti za omejene vrste kemikalij (tj. vodotopne snovi in zmesi) (3) (4).

Zdaj na splošno velja, da v bližnji prihodnosti noben preskus draženja oči *in vitro* ne bo mogel nadomestiti očesne študije *in vivo* (PM B.5 (5)) za napovedi o celotnem razponu dražilnih učinkov za različne kemijske razrede. Strateške kombinacije več alternativnih preskusnih metod v okviru (večstopenjske) strategije preskušanja pa bi morda lahko nadomestile očesno študijo *in vivo* (4). Pristop od zgoraj navzdol (4) je zasnovan za uporabo takrat, ko se na podlagi obstoječih informacij pričakuje, da bo imela kemikalija visok potencial draženja.

Na podlagi napovednega modela, podrobno opisanega v odstavku 35, se s preskusno metodo FL lahko opredelijo kemikalije v okviru omejenega področja uporabe kot jedke/zelo dražilne snovi za oči (kategorija 1 po GHS ZN; kategorija 1 po CLP EU; kategorija I po US EPA) brez kakršnega koli nadaljnega preskušanja. Enako se domneva za zmesi, čeprav te niso bile uporabljene pri validaciji. Preskusna metoda FL se torej lahko uporabi za določanje dražilnosti/jedkosti kemikalij za oči v okviru zaporedne strategije preskušanja PM B.5 (5). Vendar če se s preskusno metodo FL za kemikalijo ne predvidi, da je jedka ali zelo dražilna snov za oči, bi bilo to kemikalijo treba preskusiti z eno ali več dodatnimi preskusnimi metodami (*in vitro* in/ali *in vivo*), s katerimi se lahko točno opredelijo i) kemikalije, ki so *in vitro* lažno negativne jedke/zelo dražilne snovi za oči na podlagi preskusne metode FL (kategorija 1 po GHS ZN; kategorija 1 po CLP EU; kategorija I po US EPA); ii) kemikalije, ki niso razvrščene med jedke/dražilne snovi za oči (brez kategorije po GHS ZN; brez kategorije po CLP EU; kategorija IV po US EPA); in/ali iii) kemikalije, ki so zmerne/blage dražilne snovi za oči (kategoriji 2A in 2B po GHS ZN; kategorija 2 po CLP EU; kategoriji II in III po US EPA).

Namen te preskusne metode je opisati postopke za oceno potencialne jedkosti in močne dražilnosti preskusne snovi za oči glede na njeno sposobnost, da poškoduje neprepusten, konfluenten, epitelijski monosloj. Celovitost transepitelijske prepustnosti je glavna funkcija epitelijskega monosloja, na primer v veznicah in roženici. Transepitelijska prepustnost nadzira več tesnih stikov. Dokazano je bilo, da je povečanje prepustnosti epitelijske roženice *in vivo* povezano s stopnjo vnetja in površinskih poškodb, opaženih, ko pride do draženja oči.

S preskusno metodo FL se po kratkem času izpostavljenosti preskusni kemikaliji toksični učinki merijo na podlagi povečanja prepustnosti natrijevega fluoresceina skozi epitelijski monosloj v celicah pasjih ledvic MDCK (ang. Madin-Darby Canine Kidney), ki se gojijo na prepustnih vstavkih. Količina uhajanja fluoresceina, ki se pojavi, je sorazmerna s kemijsko induciranimi poškodbami tesnih stikov, dezmosomskih stikov in celičnih membran ter jo lahko uporabi za oceno potenciala toksičnosti preskusne kemikalije za oči. V Dodatku 1 je diagram celic MDCK, ki se gojijo na membrani vstavka za preskusno metodo FL.

⁽¹⁾ Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 31.12.2008, str. 1).

Opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 2.

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

Ta preskusna metoda temelji na protokolu INVITTOX št. 71 (6), ki je bila ocenjen v mednarodni validacijski študiji Evropskega centra za validacijo alternativnih metod (ECVAM) v sodelovanju z Medagencijskim koordinacijskim odborom ZDA za validacijo alternativnih metod (ICCVAM) in Japonskim centrom za validacijo alternativnih metod (JaCVAM).

Preskusna metoda FL se ne priporoča za opredeljevanje kemikalij, ki bi morale biti razvrščene med blage/zmerne dražilne snovi za oči, ali kemikalij, ki ne bi smele biti razvrščene med dražilne za oči (snovi in zmesi) (tj. kategorija 2A/2B, brez kategorije po GHS; kategorija 2, brez kategorije po CLP EU; kategorija II/III/IV po US EPA), kot je bilo dokazano v validacijski študiji (3) (7).

Ta preskusna metoda je ustrezna samo za vodotopne kemikalije (snovi in zmesi). Potencial zelo močne dražilnosti snovi za oči za kemikalije, ki so topne v vodi in/ali pri katerih razredčenje ne vpliva toksični učinek, se na splošno lahko točno napove z uporabo preskusne metode FL (7). Za razvrstitev kemikalije kot vodotopne v preskusnih pogojih, bi ta morala biti topna v sterilni Hankovi uravnoteženi raztopini soli (ang. Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)) s koncentracijo ≥ 250 mg/ml (ena doza nad mejno vrednostjo 100 mg/ml), ki vsebuje kalcij (s koncentracijo 1,0–1,8 mM) in ne vsebuje fenol rdečega. Če pa je preskusna kemikalija topna pri koncentraciji, nižji od 100 mg/ml, vendar že pri tej koncentraciji povzroči 20-odstotno indukcijo FL (torej, $FL_{20} < 100$ mg/ml), se še vedno lahko razvrsti v kategorijo 1 po GHS ali kategorijo I po EPA.

Omejitve, opredeljene za to preskusno metodo, s področja uporabe izključujejo močne kisline in baze, fiksirne raztopine za celice in lahko hlapne kemikalije. Za te kemikalije so značilni mehanizmi, ki se ne merijo s preskusno metodo FL, npr. močno strjevanje krvi, umiljenje ali specifične reaktivne kemijske lastnosti. Druge opredeljene omejitve za to metodo temeljijo na rezultatih v zvezi z napovedovalno zmogljivostjo za obarvano in viskozno preskusno kemikalijo (7). Obe vrsti kemikalij naj bi bilo po kratkem obdobju izpostavljenosti težko odstraniti iz monosloja, napovedno zmogljivost preskusne metode pa bi bilo mogoče izboljšati, če bi bilo uporabljenih več korakov spiranja. Trdne kemikalije, suspendirane v tekočini, so nagnjene k obarvanju, in včasih je težko določiti končno koncentracijo glede na celice. Če se kemikalije iz teh kemijskih in fizikalnih razredov izključijo iz zbirke podatkov, se točnost FL v sistemih za razvrščanje EU, EPA in GHS bistveno izboljša (7).

Na podlagi namena te preskusne metode (tj. opredeliti samo jedke/zelo dražilne snovi za oči) delež lažno negativnih rezultatov (glej odstavek 13) ni ključen, saj bi bile take kemikalije posledično preskušene z drugimi, ustrezno potrjenimi preskusi *in vitro* ali na kuncih ob upoštevanju regulativnih zahtev in uporabi večstopenjske strategije preskušanja v okviru pristopa, ki temelji na zanesljivosti dokazov (5) (glej tudi odstavka 3 in 4).

Druge opredeljene omejitve preskusne metode FL temeljijo na deležih lažno negativnih in lažno pozitivnih rezultatov. Če se je preskusna metoda FL uporabila kot prvi korak v okviru pristopa od zgoraj navzdol, da bi se opredelile jedke/zelo dražilne snovi in zmesi za oči, ki so topne v vodi (kategorija 1 po GHS ZN; kategorija 1 po CLP EU; kategorija I po US EPA), je delež lažno pozitivnih rezultatov za to metodo znašal od 7 % (7/103; GHS ZN in CLP EU) do 9 % (9/99; US EPA), delež lažno negativnih rezultatov pa od 54 % (15/28; US EPA) do 56 % (27/48; GHS ZN in CLP EU) v primerjavi z rezultati *in vivo*. Kemijske skupine, ki s preskusno metodo FL pokažejo lažno pozitivne in/ali lažno negativne rezultate, tukaj niso opredeljene.

Določene tehnične omejitve so posebej značilne za celično kulturo MDCK. Tesni stiki, ki preprečujejo prehajanje barvila natrijevega fluoresceina skozi monosloj, so z naraščanjem števila pasaj celic vedno bolj ogroženi. Nepopolno nastajanje tesnih stikov pomeni večje FL v netretiranih kontrolnih vzorcih. Torej je pomembno opredeliti največje dopustno uhajanje v netretiranih kontrolnih vzorcih (glej odstavek 38: 0-odstotno uhajanje). Kot pri vseh preskusih *in vitro* se lahko celice sčasoma spremenijo, zato je ključnega pomena navesti območja števila pasaj za analize.

V nekaterih primerih se bo morda trenutno področje uporabe razširilo, vendar samo po analizi obširnejše zbirke podatkov proučenih preskusnih kemikalij, po možnosti pridobljenih na podlagi preskušanja (3). Ta preskusna metoda bo ustrezno posodobljena ob upoštevanju novih informacij in podatkov.

Vsak laboratorij, ki ta preskus opravlja prvič, mora uporabiti kemikalije za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 3. Laboratorij lahko te kemikalije uporabi, da dokaže svojo tehnično usposobljenost za izvajanje preskusne metode FL, preden podatke preskusa FL predloži za namene regulativne razvrstitve glede na nevarnosti.

NAČELO PRESKUSA

Preskusna metoda FL je preskus *in vitro*, ki temelji na citotoksičnosti in funkciji celic, izvaja pa se jo na konfluentnem monosloju cevastih epitelijskih celic MDCK CB997, ki se gojijo na polprepustnih vstavkih in so model za nemnožeče se stanje epitelijske roženice *in vivo*. Celična linija MDCK je dobro uveljavljena ter tvori tesne stike in dezmosomske stike, podobne tistim na apikalni strani epitelijske roženice. Tesni in dezmosomski stiki *in vivo* preprečujejo, da bi topljenci in tujski prodrli v epitelij roženice. Izguba transepiteljske neprepustnosti zaradi poškodovanih tesnih stikov in dezmosomskih stikov je eden od zgodnjih dogodkov pri kemijsko induciranim draženju oči.

Preskusna kemikalija se doda na konfluentno plast celic, ki se gojijo na apikalni strani vstavka. Običajno se uporablja kratka, enominutna izpostavljenost, ki upošteva normalno stopnjo očiščena za izpostavljenost pri ljudeh. Prednost kratkega obdobja izpostavljenosti je možnost preskušanja čistih snovi in zmesi, topnih v vodi, če jih je mogoče po obdobju izpostavljenosti enostavno odstraniti. To omogoča bolj neposredno primerjavo rezultatov s kemičnimi učinki pri ljudeh. Preskusna kemikalija se nato odstrani, na apikalno stran monosloja pa se za 30 minut doda netoksično, zelo fluorescentno barvilo natrijevega fluoresceina. Škoda, ki jo preskusna kemikalija povzroči na tesnih stikih, se določi glede na količino fluoresceina, ki uide skozi celično plast v opredeljenem časovnem obdobju.

Količina barvila natrijevega fluoresceina, ki prodre skozi monosloj in membrano vstavka v določeno prostornino raztopine v jamici (v katero uhaja barvilo natrijevega fluoresceina), se določi s spektrofluorimetričnim merjenjem koncentracije fluoresceina v jamici. Obseg uhajanja fluoresceina (FL) se izračuna z upoštevanjem meritev intenzitete fluorescence (FI) v dveh kontrolnih vzorcih: slepi kontrolni vzorec in kontrolni vzorec z največjim uhajanjem. Odstotek uhajanja in s tem obseg škode na tesnih stikih se glede na te kontrolne vzorce izrazi za vse določene koncentracije preskusne kemikalije. Nato se izračuna FL₂₀ (tj. koncentracija, ki povzroči 20-odstotno FL glede na vrednost, zabeleženo pri netretiranem konfluentnem monosloju in vstavkih brez celic). Vrednost FL₂₀ (mg/ml) se uporabi v napovednem modelu za opredelitev jedkih in zelo dražilnih snovi za oči (glej odstavek 35).

Izkoristek je pomemben del toksičnih lastnosti preskusne kemikalije, ki se tudi oceni s preskusom draženja oči *in vivo*. Predhodne analize so pokazale, da bi lahko podatki o izkoristku (do 72 ur po izpostavljenosti kemikaliji) morda povečali napovedovalna zmogljivost protokola INVITTOX št. 71, vendar so potrebne nadaljnje ocene in dodatni podatki, po možnosti pridobljeni z nadaljnjim preskušanjem (6). Ta preskusna metoda bo ustrezno posodobljena ob upoštevanju novih informacij in podatkov.

POSTOPEK

Priprava celičnega monosloja

Monosloj celic MDCK CB997 se pripravi z uporabo subkonfluentnih celic, ki se gojijo v bučkah s celično kulturo v zmesi gojišča DMEM/zmesi hranil F12 (1-kratni koncentrat z L-glutaminom, 15 mM pufra HEPES, kalcij (s koncentracijo 1,0–1,8 mM) in 10-odstotni, toplotno inaktivirani FCS/FBS). Pomembno je, da morajo vsi mediji/raztopine, ki se uporabljajo pri preskusu FL, vsebovati kalcij s koncentracijo med 1,8 mM (200 mg/l) in 1,0 mM (111 mg/l), da se zagotovi nastajanje in celovitost tesnih stikov. Območje števila pasaž celic bi se moralo nadzorovati, da se zagotovi enakomerno in ponovljivo nastajanje tesnih stikov. Po možnosti bi morale biti celice znotraj območja pasaž 3–30 od odtajanja, saj majo celice znotraj tega območja podobno funkcionalnost, kar pripomore k ponovljivosti rezultatov preskusa.

Pred izvedbo preskusne metode FL se celice ločijo od bučke s tripsinizacijo, centrifugirajo in ustrezno število celic se nasadi v vstavke v ploščah s 24 jamicami (glej Dodatek 1). Za nasaditev celic se morajo uporabiti vstavki s premerom dvanajst mm, membrano iz mešanih celuloznih estrov, debelino 80–150 μm in velikostjo pore 0,45 μm . V validacijski študiji so bili uporabljeni 12 mm vstavki Millicell-HA. Lastnosti vstavka in vrste membrane so pomembni, saj lahko vplivajo na rast celic in vezavo kemikalije. Določene vrste kemikalij se morda vežejo z membrano vstavka Millicell-HA, kar bi lahko vplivalo na razlago rezultatov. Če se uporabijo druge membrane, se morajo za dokazovanje enakovrednosti uporabiti kemikalije za preverjanje usposobljenosti (glej Dodatek 3).

Vezava kemikalije na membrano vstavka je pogostejša pri kationskih kemikalijah, na primer benzalkonijevem kloridu, saj jih privlači membrana z nabojem (7). Vezava kemikalije na membrano vstavka lahko podaljša obdobje izpostavljenosti kemikaliji, kar lahko vodi v precenitev potenciala toksičnosti kemikalije, lahko pa tudi fizično zmanjša uhajanje fluoresceina skozi vstavke zaradi vezave barvila na kationsko kemikalijo, ki se veže na membrano vstavka, kar lahko vodi v podcenitev potenciala toksičnosti kemikalije. To se lahko enostavno spremlja tako, da se najvišji koncentraciji preiskovane kemikalije izpostavi samo membrana, nato pa se za standardni čas doda barvilo natrijevega fluoresceina z normalno koncentracijo (kontrola brez celic). Če pride do vezave barvila natrijevega fluoresceina, je po spiranju preskusnega materiala membrana vstavka videti rumena. Zato je bistvenega pomena poznati vezivne lastnosti preskusne kemikalije, da se lahko razloži učinek kemikalije na celice.

Ob nasaditvi celic v vstavke bi moral med izpostavljenostjo kemikaliji nastati konfluentni monosloj. Dodati je treba $1,6 \times 10^5$ celic na vstavke (400 μl celične suspenzije z gostoto 4×10^5 celic/ml). Pod temi pogoji običajno po 96 urah v kulturi nastane konfluentni monosloj. Vstavke je treba pred nasaditvijo vizualno pregledati in zagotoviti, da so kakršne koli poškodbe, ki so bile zabeležene med vizualno kontrolo, opisano v odstavku 30, nastale zaradi ravnanja.

Celične kulture MDCK se morajo hraniti v inkubatorjih z navlaženo atmosfero pri $5\% \pm 1\% \text{ CO}_2$ in $37 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$. Celice ne smejo biti kontaminirane z bakterijami, virusi, mikoplazmo ali glivami.

Dodajanje preskusnih in kontrolnih kemikalij

Za vsako ponovitev preskusa je treba pripraviti svežo osnovno raztopino s preskusno kemikalijo in jo porabiti v 30 minutah od priprave. Preskusne kemikalije je treba pripraviti v Hankovi uravnoveženi solni raztopini (HBSS) s kalcijem (s koncentracijo 1,0–1,8 mM) in brez fenol rdečega, da se prepreči vezava na serumske beljakovine. Pred preskušanjem je treba oceniti topnost kemikalije pri 250 mg/ml v HBSS. Če pri tej koncentraciji v 30 minutah kemikalija tvori stabilno suspenzijo ali emulzijo (tj. ohrani enakomernost ter se ne usede ali loči v več faz), se HBSS še vedno lahko uporabi kot topilo. Če pa se za kemikalijo ugotovi, da pri tej koncentraciji ni topna v HBSS, je treba razmisliti o uporabi drugih preskusnih metod namesto FL. V primerih, ko se ugotovi, da kemikalija ni topna v HBSS, je treba tehtno razmisliti o uporabi lahkega mineralnega olja kot topila, saj ni na voljo dovolj podatkov, da bi se dokončno ugotovila učinkovitost preskusa FL v takih pogojih.

Vse kemikalije, ki bodo preskušene, se pripravijo v sterilni HBSS iz osnovne raztopine s kalcijem (s koncentracijo 1,0–1,8 mM) in brez fenol rdečega, in sicer pri petih nespremenljivih koncentracijah, razredčenih na podlagi teže na prostornino: 1, 25, 100, 250 mg/ml in čista ali nasičena raztopina. Ob preskušanju trdne kemikalije je treba vključiti zelo visoko koncentracijo 750 mg/ml. To koncentracijo kemikalije bo morda treba na celice dodati z uporabo pipete za neposredno izpodrivanje tlaka. Če se ugotovi, da toksičnost znaša med 25 in 100 mg/ml, je treba dvakrat preskusiti naslednje dodatne koncentracije: 1, 25, 50, 75, 100 mg/ml. Če so bila izpolnjena merila za sprejemljivost, je treba iz teh koncentracij izpeljati vrednost FL_{20} .

Preskusne kemikalije se dodajo na konfluentne celične monosloje po odstranitvi gojišča celične kulture ter dvakratnem spiranju s sterilno, toplo (37 °C) HBSS s kalcijem (s koncentracijo 1,0–1,8 mM) in brez fenol rdečega. Pred tem se vizualno preveri filtre za kakršne koli predhodne poškodbe, ki bi se lahko zmotno pripisale morebitni nezdružljivosti s preskusnimi kemikalijami. Za vsako koncentracijo preskusne kemikalije in kontrolne vzorce se morajo za vsako ponovitev uporabiti vsaj trije ponovljeni vzorci. Po 1 minuti izpostavljenosti pri sobni temperaturi je treba previdno odstraniti preskusno kemikalijo z aspiracijo, monosloj je treba dvakrat sprati s sterilno, toplo (37 °C) HBSS s kalcijem (s koncentracijo 1,0–1,8 mM) in brez fenol rdečega ter takoj je treba izmeriti uhajanje fluoresceina.

V vsaki ponovitvi je treba uporabiti sočasno negativno (NK) in pozitivno kontrolo (PK), da se dokaže, da sta celovitost monosloja (NK) in občutljivost celic (PK) v okviru opredeljenega območja sprejemljivosti iz preteklih preskusov. Predlagana kemikalija PK je Brij 35 (št. CAS 9002-92-0) pri 100 mg/ml. Pri tej koncentraciji bi se moralo ugotoviti približno 30-odstotno uhajanje fluoresceina (sprejemljivo območje uhajanja fluoresceina, tj. poškodovanosti celične plasti, je 20–40 %). Predlagana kemikalija NK je HBSS s kalcijem (s koncentracijo 1,0–1,8 mM) in brez fenol rdečega (netretirani, slepi kontrolni vzorec). Za izračun vrednosti FL₂₀ bi vsaka ponovitev morala vključevati tudi kontrolni vzorec z največjim uhajanjem. Največje uhajanje se določi z uporabo kontrolnih vstavkov brez celic.

Določanje stopnje prepuščanja fluoresceina

Takoj po odstranitvi preskusnih in kontrolnih kemikalij se v vstavke (npr. Millicell-HA) doda 400 µl 0,1 mg/ml raztopine natrijevega fluoresceina (0,01 % (m/v) v HBSS s kalcijem [s koncentracijo 1,0–1,8 mM] in brez fenol rdečega). Kulture se pustijo 30 minut pri sobni temperaturi. Ob koncu inkubacije s fluoresceinom se vstavki previdno odstranijo iz vsake jamice. Vsak filter se vizualno pregleda in zabeleži se kakršna koli poškodba, ki je morda nastala med uporabo.

Količina fluoresceina, ki je prodrla skozi monosloj in vstavek, se količinsko opredeli v raztopini, ki je ostala v jamicah po odstranitvi vstavkov. Meritve se opravijo s spektrofleurimetrom pri valovni dolžini ekscitacije in emisije, ki znaša 485 nm oziroma 530 nm. Občutljivost spektrofleurimetra mora biti nastavljena tako, da je najvišja številčna razlika med največjo FL (vstavki brez celic) in najmanjšo FL (vstavek s konfluentnim monoslojem, tretiran z NK). Zaradi razlik v uporabljenem spektrofleurimetru bi se morala uporabiti občutljivost, ki bo zaznala intenziteto fluorescence > 4 000 pri kontrolnem vzorcu z največjim uhajanjem fluoresceina. Največja vrednost FL ne bi smela biti višja od 9 999. Največja intenziteta uhajanja fluoresceina bi morala biti v linearnem območju uporabljenega spektrofleurimetra.

Razlaga rezultatov in napovedni model

Količina FL je sorazmerna s kemijsko induciranimi poškodbami tesnih stikov. Odstotek FL za vsako preskušeno koncentracijo kemikalije se izračuna iz vrednosti FL, ki so bile pridobljene za preskusno kemikalijo z upoštevanjem vrednosti FL iz NK (meritev iz konfluentnega monosloja celic, tretiranega z NK) in kontrolni vzorec z največjim uhajanjem (meritev za količino FL skozi vstavek brez celic).

Srednja vrednost intenzitete fluorescence pri največjem uhajanju = x

Srednja vrednost intenzitete fluorescence pri 0-odstotnem uhajanju (NK) = y

Srednja vrednost 100-odstotnega uhajanja se izračuna tako, da se od srednje vrednosti pri največjem uhajanju odšteje srednja vrednost pri 0-odstotnem uhajanju,

tj. $x - y = z$.

Odstotek uhajanja za vsak nespremenljivi odmerek se izračuna tako, da se od srednje vrednosti intenzitete fluorescence za meritve treh ponovljenih vzorcev (m) odšteje vrednost pri 0-odstotnem uhajanju, ta vrednost pa nato deli z vrednostjo pri 100-odstotnem uhajanju, tj. $\% FL = [(m - y) / z] \times 100 \%$, pri čemer je:

m = srednja vrednost intenzitete fluorescence za tri ponovljene meritve za določeno koncentracijo

% FL = odstotek fluoresceina, ki preide skozi celično plast

Uporabiti je treba naslednjo enačbo za izračun koncentracije kemikalije, ki povzroči 20 % FL:

$$FL_D = [(A - B) / (C - B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

pri čemer je:

D = % inhibicije

A = % poškodb (20 % uhajanje fluoresceina)

B = % uhajanja fluoresceina < A

C = % uhajanja fluoresceina > A

M_C = koncentracija (mg/ml) C

M_B = koncentracija (mg/ml) B

V nadaljevanju je navedena mejna vrednost FL₂₀, s katero se kemikalije predvidijo kot jedke/zelo dražilne snovi za oči:

FL ₂₀ (mg/ml)	R in O GHS ZN	R in O CLP EU	R in O US EPA
≤ 100	kategorija 1	kategorija 1	kategorija I

R in O: razvrstitev in označevanje

Preskusna metoda FL se priporoča samo za opredeljevanje vodotopnih jedkih in zelo dražilnih snovi za oči (kategorija 1 po GHS ZN, kategorija 1 po CLP EU, kategorija I po US EPA) (glej odstavek 1 in 10).

Za opredelitev vodotopnih kemikalij (snovi in zmesi) (3) (6) (7) kot „povzroča hudo poškodbo oči“ (kategorija 1 po GHS ZN/CLP EU) ali „jedka ali zelo dražilna snov za oči“ (kategorija I po US EPA) bi morala preskusna kemikalija pri koncentraciji ≤ 100 mg/ml inducirati vrednost FL₂₀.

Sprejemljivost rezultatov

Srednja vrednost pri največjem uhajanju fluoresceina (x) mora biti višja od 4 000 (glej odstavek 31), srednja vrednost pri 0-odstotnem uhajanju (y) mora biti enaka ali nižja od 300, srednja vrednost pri 100-odstotnem uhajanju (z) pa mora biti med 3 700 in 6 000.

Preskus se obravnava kot sprejemljiv, če je bila pri pozitivni kontroli opažena 20- do 40-odstotna poškodovanost celične plasti (meritev kot % uhajanja fluoresceina).

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

Podatki iz posameznih jamic s ponovljenimi vzorci (npr. vrednosti intenzitete fluorescence in izračunani podatki o odstotku FL za vsako preskusno kemikalijo, vključno z razvrstitvijo) za vsako ponovitev preskusa morajo biti navedeni v obliki preglednice. Poleg tega je treba v poročilu navesti srednje vrednosti ± standardni odklon za posamezne ponovljene meritve v vsaki ponovitvi preskusa.

Poročilo o preskusu

V poročilo o preskusu se vključijo naslednji podatki:

Preskusne in kontrolne kemikalije:

- kemijska imena, na primer strukturno ime, ki ga uporablja Služba za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS), ki jim sledijo druga imena, če so znana;
- številka CAS kemikalije, če je znana;
- čistost in sestava snovi ali zmesi (v masnih deležih), če so te informacije na voljo;
- fizikalno-kemijske lastnosti, pomembne za izvedbo študije (npr. agregatno stanje, hlapnost, vrednost pH, stabilnost, topnost v vodi, kemijski razred);
- obdelava preskusne/kontrolne kemikalije pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
- pogoji shranjevanja.

Utemeljitev preskusne metode in uporabljenega protokola:

- vključevati mora preudarke v zvezi s področjem uporabe in omejitve preskusne metode.

Preskusni pogoji:

- opis uporabljenega celičnega sistema, vključno s potrdilom o avtentičnosti in statusom mikoplazme celične linije;
- podrobnosti o uporabljenem preskusnem postopku;
- uporabljene koncentracije kemikalije;
- trajanje izpostavljenosti preskusni kemikaliji;
- trajanje inkubacije s fluoresceinom;
- opis vseh prilagoditev preskusnega postopka;
- opis uporabljenih meril za ocenjevanje;
- navedba podatkov o modelu iz preteklih preskusov (npr. negativne in pozitivne kontrole, primerjalne kemikalije, če je ustrezno);
- informacije o tehnični usposobljenosti, ki jo je dokazal laboratorij.

Rezultati:

- preglednice s podatki o posameznih preskusnih kemikalijah, kontrolah za vsako ponovitev preskusa in vsako ponovljeno meritev (vključno s posameznimi rezultati, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni);
- izpeljane razvrstitve z navedbo napovednega modela in/ali uporabljenih meril za odločitve;
- opis drugih opaženih učinkov.

Razprava o rezultatih:

- vključevati mora preudarke o nedokončnem rezultatu (odstavek 35: FL₂₀ > 100 mg/ml) in nadaljnjem preskušanju.

Sklepne ugotovitve

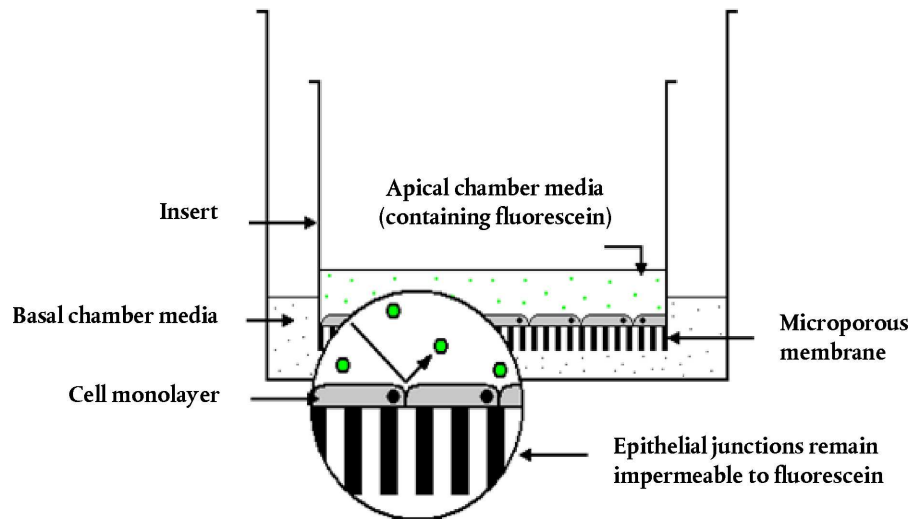
VIRI

- (1) ZN (2009). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS), tretja revidirana izdaja, New York in Ženeva: Publikacije Združenih narodov. ISBN: 978-92-1-117006-1. Na voljo na: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html].
 - (2) US EPA (1996). Label Review Manual: druga izdaja, EPA737-B-96-001, Washington DC: Agencija ZDA za varstvo okolja (US EPA).
 - (3) EC-ECVAM (2009). Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based *in vitro* assays for eye irritation testing.
 - (4) Scott, L. idr. (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.
 - (5) Poglavje B.5 te priloge, *Akutno draženje oči/jedkost za oči*.
 - (6) EC-ECVAM (1999). protokol INVITOX št. 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italy: Evropski center za validacijo alternativnih metod (ECVAM). Na voljo na: [<http://ecvam-dbal.m.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*, OECD Series on Testing and Assessment št. 34. OECD, Pariz.
-

Dodatek 1

DIAGRAM CELIC MDCK, KI SE GOJIJO NA MEMBRANI VSTAVKA ZA PRESKUSNO METODO FL

Konfluentni sloj celic MDCK se goji na polprepustni membrani vstavka. Vstavki se položijo v jamice plošče s 24 jamicami.



Vir slike: Wilkinson, P. J. (2006). Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure. Doktorska disertacija, Univerza v Nottinghamu, Združeno kraljestvo.

Dodatek 2

OPREDELITVE POJMOV

Točnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov „ustreznosti“. Ta izraz in izraz „skladnost“ se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusne metode.

Kemikalija: snov ali zmes.

Kategorija I po EPA: kemikalije, ki so jedke (nepopravljivo uničenje očesnega tkiva) ali vplivajo na roženico oziroma jo dražijo več kot 21 dni (2).

CLP EU (Uredba (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi): v Evropski uniji (EU) izvaja Globalno usklajeni sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) Združenih narodov (GHS ZN).

Delež lažno negativnih rezultatov: delež vseh pozitivnih kemikalij, ki jih preskusna metoda zmotno prikaže kot negativne. To je eden od kazalnikov učinkovitosti preskusne metode.

Delež lažno pozitivnih rezultatov: delež vseh negativnih kemikalij, ki jih preskusna metoda zmotno prikaže kot pozitivne. To je eden od kazalnikov učinkovitosti preskusne metode.

FL₂₀: to vrednost je mogoče oceniti z opredelitvijo koncentracije, pri kateri preskušene kemikalije povzročijo 20-odstotno uhajanje fluoresceina skozi celično plast.

Uhajanje fluoresceina: količina fluoresceina, ki prodre skozi celično plast; izmeri se s spektrofotometrom.

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

Kategorija 1 po GHS: povzročitev poškodbe očesnega tkiva ali resne fizične okvare vida po nanosu preskusne kemikalije na sprednjo površino očesa, ki ni v celoti popravljiva v 21 dneh po nanosu.

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

Zmes: v okviru GHS ZN se uporablja kot zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi, ki v njej ne reagirajo.

Negativna kontrola: netretiran ponovljen vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema. Ta vzorec se obdela z vzorci, tretiranimi s preskusno kemikalijo, ali drugimi kontrolnimi vzorci, da se ugotovi, ali topilo reagira s preskusnim sistemom.

Brez razvrstitve: kemikalije, ki niso razvrščene med dražilne snovi za oči kategorije 1, 2A ali 2B po GHS ZN; kategorije 1 ali 2 po CLP EU; ali kategorije I, II ali III po US EPA.

Jedka snov za oči: (a) kemikalija, ki povzroča nepopravljivo poškodbo očesnega tkiva; (b) kemikalije, ki so razvrščene med dražilne snovi za oči kategorije 1 po GHS ZN; kategorije 1 po CLP EU; ali kategorije I po US EPA.

Dražilna snov za oči: (a) kemikalija, ki po dodajanju na sprednjo površino očesa povzroča popravljivo poškodbo očesa; (b) kemikalije, ki so razvrščene med dražilne snovi za oči kategorije 2A ali 2B po GHS ZN; kategorije 2 po CLP EU; ali kategorije II ali III po US EPA.

Zelo dražilna snov za oči: (a) kemikalija, ki po dodajanju na sprednjo površino očesa povzroči poškodbo očesnega tkiva, ki v 21 dneh po nanosu ne izgine, ali povzroči resno fizično okvaro vida; (b) kemikalije, ki so razvrščene med dražilne snovi za oči kategorije 1 po GHS ZN; kategorije 1 po CLP EU; ali kategorije I po US EPA.

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

Kemikalije za preverjanje usposobljenosti: podskupina seznama referenčnih kemikalij, ki jih lahko uporabi laboratorij, da dokaže usposobljenost za validirano, referenčno preskusno metodo.

Ustreznost: opis razmerja med preskusom in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere preskus pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Ustreznost upošteva tudi točnost (skladnost) preskusne metode (8).

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusne metode v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih in interne laboratorijske ponovljivosti.

Nadomestni preskus: preskus, ki nadomesti preskus, ki se redno uporablja in je uveljavljen za ugotavljanje nevarnosti in/ali oceno tveganja, ter za katerega je bilo ugotovljeno, da v primerjavi z uveljavljenim preskusom v vseh mogočih okoliščinah preskušanja in za vse mogoče preskusne kemikalije zagotavlja enakovredno ali izboljšano varstvo zdravja ljudi ali živali ali okolja, kot se uporablja.

Občutljivost: delež vseh pozitivnih/aktivnih kemikalij, ki se s preskusno metodo pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (8).

Huda poškodba oči: povzročitev poškodbe očesnega tkiva ali resne fizične okvare vida po nanosu preskusne kemikalije na sprednjo površino očesa, ki ni v celoti popravljiva v 21 dneh po nanosu.

Kontrola s topilom/vehiklom: netretiran vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema, vključno s topilom ali vehiklom, ki se obdelata s kontrolnimi vzorci, tretiranimi s preskusno kemikalijo, in drugimi kontrolnimi vzorci, da se določi izhodiščni odziv za vzorce, tretirane s preskusno kemikalijo, raztopljeni v istem topilu ali vehiklu. Pri preskušanju s sočasno negativno kontrolo ta vzorec tudi pokaže, ali topilo ali vehikel reagira s preskusnim sistemom.

Specifičnost: delež vseh negativnih/neaktivnih kemikalij, ki se s tem preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode.

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

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

Večstopenjska strategija preskušanja: stopenjsko preskušanje, pri katerem se v posebnem vrstnem redu pregledajo vsi obstoječi podatki o preskusni kemikaliji, pri čemer se na vsaki stopnji uporabi postopek, ki temelji na zanesljivosti dokazov, da se določi, ali je pred nadaljevanjem na naslednji stopnji na voljo dovolj podatkov za odločitve o razvrstitvi kemikalije glede na nevarnost, ki jo povzroča. Če se za preskusno kemikalijo na podlagi razpoložljivih podatkov lahko določi potencial za draženje, dodatno preskušanje ni potrebno. Če preskusni kemikaliji na podlagi razpoložljivih podatkov ni mogoče določiti potenciala za draženje, se izvede postopno zaporedno testiranje na živalih, dokler kemikalije ni mogoče jasno razvrstiti.

Validirana preskusna metoda: preskusna metoda, za katero sta bili na podlagi izvedenih validacijskih študij določeni ustreznost (vključno s točnostjo) in zanesljivost za določen namen. Opozoriti je treba, da točnost in zanesljivost validirane preskusne metode nista nujno zadostni, da bi bila sprejemljiva za predlagani namen (8).

Zanesljivost dokazov: postopek obravnavanja prednosti in slabosti različnih informacij v okviru sprejemanja in utemeljevanja sklepne ugotovitve glede potenciala nevarnosti kemikalije.

Dodatek 3

KEMIKALIJE ZA PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI ZA PRESKUSNO METODO FL

Pred redno uporabo te preskusne metode morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost tako, da pravilno opredelijo razvrstitev med jedke snovi za oči za 8 kemikalij, ki so priporočene v preglednici 1. Te kemikalije so bile izbrane tako, da predstavljajo vrsto odzivov za lokalno draženje/jedkost za oči, ki temelji na rezultatih očesne študije *in vivo* na kuncih (TG 405, PM B.5(5)) (tj. kategorije 1, 2A in 2B ali brez razvrstitve po GHS ZN). Ob upoštevanju validirane uporabnosti preskusa FL (tj. opredeljevanje samo jedkih/zelo dražilnih snovi za oči) pa za dokaz usposobljenosti obstajata samo dva rezultata preskusa za namene razvrstitve (jedka/zelo dražilna snov za oči ali nejedka/lažje dražilna snov za oči). Druga merila za izbiro so bila dostopnost kemikalij na trgu, razpoložljivost visokokakovostnih referenčnih podatkov *in vivo* in visokokakovostni podatki iz preskusne metode FL. Zato so bile kemikalije za preverjanje usposobljenosti izbrane na podlagi dokumenta „Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing“ (dokument o pregledu ozadja v preskusu uhajanja fluoresceina kot alternativne metode za preskušanje dražilnosti oči) (8), ki je bil uporabljen za retrospektivno validacijo preskusne metode FL.

Preglednica 1

Priporočene kemikalije za dokazovanje tehnične usposobljenosti za FL

Kemikalija	Št. CAS	Kemijski razred (1)	Agregatno stanje	Razvrstitev <i>in vivo</i> (2)	Razvrstitev <i>in vitro</i> (3)
benzalkonijev klorid (5-odstotni)	8001-54-5	onijska spojina	tekočina	kategorija 1	jedka/zelo dražilna snov
prometazin hidroklorid	58-33-3	amin/amidin, heterociklična spojina, organska žveplova spojina	trdna snov	kategorija 1	jedka/zelo dražilna snov
natrijev hidroksid (10 %)	1310-73-2	baza	tekočina	kategorija 1	jedka/zelo dražilna snov
natrijev lavril sulfat (15 %)	151-21-3	karboksilna kislina (sol)	tekočina	kategorija 1	jedka/zelo dražilna snov
4-karboksi-benzaldehid	619-66-9	karboksilna kislina, aldehid	trdna snov	kategorija 2(A)	nejedka/lažje dražilna snov
amonijev nitrat	6484-52-2	anorganska sol	trdna snov	kategorija 2(A)	nejedka/lažje dražilna snov
etil-2-metil acetacetat	609-14-3	keton, ester	tekočina	kategorija 2(B)	nejedka/lažje dražilna snov
glicerol	56-81-5	alkohol	tekočina	brez kategorije	nejedka/lažje dražilna snov

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

(1) Vsaki preskusni kemikaliji so bili dodeljeni kemijski razredi, pri čemer se je uporabil standardni sistem za razvrščanje, ki temelji na sistemu za razvrščanje MeSH (na voljo na <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

(2) Na podlagi rezultatov očesne študije *in vivo* na kuncih (OECD TG 405, PM B.5) in v skladu z GHS ZN in CLP EU.

(3) Na podlagi rezultatov, pridobljenih s FL (protokol INVITTOX št. 71(6)).

B.62 Kometni preskus *in vivo* v alkalnih pogojih pri sesalcih

UVOD

Ta preskusna metoda (PM) je enakovredna Smernici za preskušanje (TG) OECD 489 (2016). Kometni preskus *in vivo* v alkalnih pogojih (gelska elektroforeza posamezne celice; v nadaljnjem besedilu preprosto kometni preskus) se uporablja za zaznavanje prelomov verige DNK v celicah ali jedrih, izoliranih iz več tkiv živali, navadno glodalcev, ki so bili izpostavljeni potencialno genotoksičnim materialom. Več skupin strokovnjakov je proučilo in objavilo priporočila za kometni preskus (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). Ta preskusna metoda je del nabora preskusnih metod v zvezi z genetsko toksikologijo. Pripravljen je dokument OECD, ki zagotavlja jedrnatne informacije o preskušanju v zvezi z genetsko toksikologijo in pregled nedavnih sprememb teh preskusnih smernic (11).

Namen kometnega preskusa je opredeliti kemikalije, ki povzročajo poškodbe DNK. Kometni preskus lahko v alkalnih pogojih (pH > 13) zazna prelome ene in dveh verig, ki na primer izhajajo iz neposrednih interakcij z DNK ali alkalno labilnih mest ali so posledica vmesnih stopenj prelomov verig DNK zaradi popravljanja poškodb DNK z izrezovanjem. Ti prelomi verig se lahko popravijo brez trajnega učinka, so za celico smrtni ali pa se fiksirajo v mutacijo, iz katere nastane stalno spremenjena celica, sposobna preživetja. To lahko povzroči tudi poškodbe kromosomov, ki so povezane z mnogimi boleznimi ljudi, vključno z rakom.

Uradni validacijski preskus kometnega preskusa *in vivo* pri glodalcih je bil izveden v letih 2006–2012, usklajeval pa ga je Japonski center za validacijo alternativnih metod (JaCVAM) v sodelovanju z Evropskim centrom za validacijo alternativnih metod (ECVAM), Medagencijskim koordinacijskim odborom za validacijo alternativnih metod (ICCVAM) in Medagencijskim centrom NTP za ocenjevanje alternativnih toksikoloških metod (NICEATM) (12). Ta preskusna metoda vključuje priporočeno uporabo in omejitve kometnega preskusa ter temelji na končnem protokolu (12), uporabljenem v validacijskem preskusu, ter dodatnih ustreznih objavljenih in neobjavljenih podatkih (ki so v lasti laboratorijev).

Opredelitve ključnih pojmov so navedene v Dodatku 1. Opozoriti je treba, da se za ta preskus lahko uporabi veliko različnih sistemov (mikroskopski preparati, gelski nosilci, 96-jamične mikrotitrne plošče itd.). Zaradi večje pripravnosti se v preostalem dokumentu uporablja izraz „objektno stekelce“ ali „preparat“, ki zajema tudi vse druge sisteme.

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

Kometni preskus je metoda za merjenje prelomov verig DNK v evkariotskih celicah. Posamezne celice/jedra, vstavljene v agarozo na objektnem stekelcu, se lizirajo z detergentom in visoko koncentracijo soli. Med lizo se razgradijo celične in jedrne membrane, pri čemer se odvijajo spiralaste zanke DNK, ki se na splošno imenujejo nukleoidi in fragmenti DNK. Elektroforeza pri visoki vrednosti pH povzroči oblikovanje struktur, podobnih kometom, ki jih je z uporabo ustreznih fluorescentnih barvil mogoče opazovati s fluorescenčno mikroskopijo; fragmenti DNK migrirajo iz „glave“ v „rep“ kometa glede na njihovo velikost, iz intenzivnosti repa kometa glede na skupno intenzivnost (glava in rep) pa je razvidna količina prelomov DNK (13) (14) (15).

Kometni preskus *in vivo* v alkalnih pogojih je zlasti ustrezen za ocenjevanje genotoksičnih lastnosti, saj so rezultati preskusa odvisni od procesov absorpcije, porazdelitve, metabolizma in izločanja (ADME) *in vivo* ter tudi od procesov popravljanja poškodb DNK. Ti se lahko razlikujejo med vrstami, tkivi in vrstami poškodb DNK.

Za izpolnitev zahtev glede dobrobiti živali, zlasti zmanjšanje uporabe živali (načela 3R – nadomestitev, zmanjšanje in izboljšanje, ang. replacement, reduction and refinement), se ta preskus lahko združi s drugimi toksikološkimi študijami, npr. toksikološkimi študijami s ponavljajočim se odmerkom (10) (16) (17), ali pa se končna točka združi z drugimi genotoksičnimi končnimi točkami, na primer *in vivo* preskusom mikronukleusov v eritrocitih sesalcev (18) (19) (20). Kometni preskus se najpogosteje izvaja na glodalcih, čeprav je bil uporabljen tudi pri drugih sesalskih in neselalskih vrstah. Uporaba neglodalskih vrst bi morala biti znanstveno in etično utemeljena za vsak primer posebej in močno se priporoča, da se kometni preskus na neglodalskih vrstah izvede samo v okviru druge študije toksičnosti in ne kot samostojni preskus.

Način izpostavljenosti in tkiva, ki bodo proučevana, je treba izbrati na podlagi vseh razpoložljivih/obstojećih informacij o preskusnih kemikalijah, npr. predvidenega/pričakovanega načina izpostavljenosti pri ljudeh, metabolizma in porazdelitve, potenciala za učinke na mestu stika, opozorilne strukture, druge podatke o genotoksičnosti ali toksičnosti in namena študije. Kadar je to ustrezno, se torej lahko potencial genotoksičnosti preskusnih kemikalij analizira v ciljnih tkivih z rakotvornimi in/ali drugimi toksičnimi učinki. Preskus se obravnava kot uporaben tudi za nadaljnje preiskave genotoksičnosti, ki jo zazna sistem *in vitro*. Izvedba kometnega preskusa *in vivo* na preiskovanem tkivu je primerna, kadar se lahko razumno pričakuje, da bo preiskovano tkivo ustrezno izpostavljeno.

Preskus je bil najboljšeje validiran v somatskih tkivih podgan moškega spola v medlaboratorijskih študijah, kot je poskus JaCVAM (12) in kot je navedeno v Rothfuss idr., 2010 (10). V mednarodnem validacijskem preskusu JaCVAM so bila uporabljena jetra in želodec. Jetra zato, ker so najaktivnejši organ v metabolizmu kemikalij, pogosto pa tudi ciljni organ za rakotvornost. Želodec pa zato, ker je običajno prvo mesto kontakta za kemikalije po oralni izpostavljenosti, čeprav bi se kot tkiva, ki so mesto stika, morala upoštevati tudi druga območja prebavnega trakta, na primer dvanajsternik in tešče črevo, ter bi se lahko obravnavala kot pomembnejša za ljudi kot žlezni želodec glodalcev. Treba je paziti, da se zagotovi, da takšna tkiva niso izpostavljena previsokim koncentracijam preskusne kemikalije (21). Ta tehnika se načeloma lahko uporabi za katero koli tkivo, iz katerega je mogoče pripraviti suspenzijo s posameznimi celicami/jedri, ki jo je mogoče analizirati. Iz podatkov, ki so v lasti več laboratorijev, je razvidna uspešna uporaba te tehnike na več različnih tkivih in mnoge publikacije so prikazale njeno uporabnost ne samo na jetrih in želodcu, ampak tudi na drugih organih ali tkivih, npr. teščem črevu (22), ledvicah (23) (24), koži (25) (26) ali mehurju (27) (28), pljučnih celicah in celicah bronhoalveolarnega izpirka (pomembno za študije kemikalij, ki se vdihavajo) (29) (30), preskusi pa so bili izvedeni tudi na več organih (31) (32).

Čeprav morda obstaja zanimanje za genotoksične učinke v zarodnih celicah, je treba opozoriti, da se standardni kometni preskus v alkalnih pogojih, kot je opisan v tej preskusni metodi, ne obravnava kot ustrezen za merjenje prelomov verig DNK v zrelih zarodnih celicah. Ker so bile v pregledu virov o uporabi kometnega preskusa za genotoksičnost za zarodne celice (33) navedene visoke in spremenljive ravni ozadja pri poškodbah DNK, bi bilo treba spremeniti protokol ter izboljšati standardizacijo in validacijske študije, preden se lahko kometni preskus na zrelih zarodnih celicah (npr. semenčicah) vključi v preskusno metodo. Poleg tega priporočeni režim izpostavljenosti, opisan v tej preskusni metodi, ni optimalen in bi bila za smiselno analizo prelomov DNK v zrelih semenčicah potrebna daljša izpostavljenost ali vzorčenje. Genotoksični učinki, kot so bili izmerjeni s kometnim preskusom na celicah mod v različnih fazah razločevanja, so bili opisani v virih (34) (35). Treba pa je opozoriti, da spolne žleze vsebujejo mešanico somatskih in zarodnih celic. Zato iz pozitivnih rezultatov za celotno spolno žlezo (modo) ni nujno mogoče sklepati tudi na poškodbe zarodnih celic. Kažejo pa, da so preskušene kemikalije in/ali njihovi metaboliti dosegli spolno žlezo.

S standardnimi preskusnimi pogoji kometnega preskusa ni mogoče zanesljivo zaznati navzkrižnih povezav. V določenih prilagojenih preskusnih pogojih se lahko zaznajo navzkrižne povezave DNK-DNK in DNK-beljakovina ter druge spremembe baz, na primer oksidirane baze (23) (36) (37) (38) (39). Vendar je za ustrezno opredelitev potrebnih prilagoditev protokola potrebno nadaljnje delo. Zaznavanje navzkrižnih povezovalcev ni glavni namen preskusa, kot je opisan v tem dokumentu. Preskus kljub prilagoditvam ni primeren za zaznavanje anejenov.

V okviru trenutnega znanja je s kometnim preskusom *in vivo* povezanih več dodatnih omejitev (glej Dodatek 3). Preskusna metoda se bo v prihodnosti predvidoma pregledala in po potrebi revidirala glede na pridobljene izkušnje.

Pred uporabo te preskusne metode za preskušanje zmesi in pridobivanje podatkov za predvideni regulativni namen bi bilo treba proučiti, ali bo zagotovila sprejemljive rezultate za navedeni namen in, če jih bo, zakaj. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni.

NAČELO METODE

Živali se primerno izpostavijo preskusni kemikaliji. Podroben opis odmerjanja in vzorčenja je naveden v odstavkih 36 do 40. Ob izbranih časih vzorčenja se secirajo preiskovana tkiva in pripravijo suspenzije s posameznimi celicami/jedri (lahko se izvede perfuzija *in situ*, kadar velja za uporabno, npr. na jetrih), ki se nato vstavijo v mehki agar, da se lahko nanesejo na objektna stekelca. Celice/jedra se obdelajo z liznim pufrom, da se odstranijo celične in/ali jedrne membrane, in izpostavijo močnim alkalijam, npr. $\text{pH} \geq 13$, kar povzroči odvitje DNK ter sprostitve sproščenih zank in fragmentov DNK. Jedrna DNK v agarju se nato izpostavi elektroforezi. Normalne, nefragmentirane molekule DNK ostanejo v položaju, v katerem so bile, ko je bila jedrna DNK v agarju, kakršna koli fragmentirana DNK in sproščene zanke DNK pa migrirajo proti anodi. Po elektroforezi se DNK vizualizira s pomočjo ustreznega fluorescentnega barvila. Preparate je treba analizirati z mikroskopom in popolnoma avtomatiziranimi ali polavtomatiziranimi sistemi za analizo slik. Iz obsega DNK, ki je migrirala med elektroforezo, in razdalje migracije sta razvidna količina in velikost fragmentov DNK. Za kometni preskus obstaja več končnih točk. Za oceno poškodb je priporočena vsebnost DNK v repu (odstotek DNK v repu ali odstotna intenzivnost repa) (12) (40) (41) (42). Po analizi zadostnega števila jeder se podatki analizirajo z ustreznimi metodami, da se ocenijo rezultati preskusa.

Opozoriti je treba, da je bilo spreminjanje različnih vidikov metodologije, vključno s pripravo vzorca, pogoji elektroforeze, parametri vizualne analize (npr. intenzivnost barvila, intenzivnost svetlobe mikroskopske žarnice ter uporaba mikroskopskih filtrov in dinamike kamere) in okoljskimi pogoji (npr. osvetlitev ozadja), raziskano ter da lahko vpliva na migracijo DNK (43) (44) (45) (46).

PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI LABORATORIJA

Vsak laboratorij mora dokazati usposobljenost za izvajanje kometnega preskusa, tako da pokaže, da lahko pridobi suspenzije s posameznimi celicami/jedri, ki so ustrezne kakovosti za vsako ciljno tkivo vsake uporabljene vrste. Kakovost preparatov bo najprej ocenjena z odstotkom DNK v repu za živali, tretirane z vehiklom, ki se uvrstijo v ponovljivo nizko območje. Iz trenutnih podatkov je razvidno, da skupinska srednja vrednost odstotka DNK v repu (ki temelji na srednji vrednosti median – glej odstavek 57 za podrobnosti o teh pojmi) pri jetrih podgan načeloma ne bi smela presežati 6 %, kar ustreza vrednostim iz validacijskega preskusa JaCVAM (12) ter drugih objavljenih podatkov in podatkov, ki so v lasti laboratorijev. Za priporočila o optimalnih ali sprejemljivih območjih za druga tkiva trenutno ni dovolj podatkov. To ne izključuje uporabe drugih tkiv, če je ta utemeljena. Poročilo o preskusu bi moralo zagotoviti ustrezen pregled uspešnosti kometnega preskusa teh tkiv glede na objavljeno literaturo ali podatke, ki so v lasti laboratorijev. Predvsem je zaželeno nizko območje odstotka DNK v repu v kontrolah, da se zagotovi zadostno dinamično območje za zaznavanje pozitivnega učinka. Poleg tega pa mora vsak laboratorij biti zmožen obnoviti pričakovane odzive za neposredne mutagene in promutagene z različnimi načini delovanja, kot je predlagano v preglednici 1 (odstavek 29).

Pozitivne snovi se lahko na primer izberejo iz validacijskega preskusa JaCVAM (12) ali drugih objavljenih podatkov (glej odstavek 9), kadar je to ustrezno in utemeljeno ter če povzročajo jasne pozitivne odzive v preiskovanih tkivih. Treba je dokazati tudi sposobnost zaznavanja šibkih učinkov znanih mutagenov, npr. EMS, pri nizkih odmerkih, na primer z določanjem razmerja med odzivom in odmerkom z ustreznimi številkami in razporeditvami odmerkov. Laboratorij bi se moral najprej usmeriti v dokazovanje usposobljenosti z najpogosteje uporabljenimi tkivi, npr. jetri glodalcev, pri čemer se lahko izvedejo primerjave z obstoječimi podatki in pričakovanimi rezultati (12). Istočasno se lahko zberejo podatki o drugih tkivih, npr. želodcu/dvanajsterniku/teščem črevu, krvi itd. Laboratorij mora dokazati usposobljenost za vsako posamezno tkivo vsake vrste, ki jo namerava proučiti, in prikazati, da se s tem tkivom lahko pridobi sprejemljiv pozitiven odziv z znanim mutagenom (npr. EMS).

Zbrati je treba podatke o negativnih kontrolnih vzorcih/kontrolnih vzorcih z vehiklom, da se lahko prikaže obnovljivost negativnih odzivov in zagotovi, da so bili tehnični vidiki preskusa ustrezno nadzorovani, ali ugotovi potreba po ponovni določitvi kontrolnih območij iz preteklih preskusov (glej odstavek 22).

Opozoriti je treba, da je sicer mogoče zbrati več tkiv ob obdukciji in jih obdelati za kometni preskus, vendar mora biti laboratorij usposobljen za odvzem več tkiv ene živali, s čimer zagotovi, da ni izgubljena nobena morebitna poškodba DNK in da kometni preskus ni ogrožen. Čas od evtanazije do odstranitve tkiv za tretiranje je lahko ključen (glej odstavek 44).

Med pripravami na usposobljenost za ta preskus je treba poskrbeti za dobrobit živali, zato se lahko med pripravami na usposobljenost za različne vidike preskusa uporabijo tkiva živali, ki so bile uporabljene v drugih preskusih. Poleg tega med fazami vzpostavljanja nove preskusne metode v laboratoriju morda ne bo treba izvesti celotne študije, med pridobivanjem zahtevanih spretnosti pa se lahko uporabi manj živali ali preskusnih koncentracij.

Podatki o kontrolah iz preteklih preskusov

Med preverjanjem usposobljenosti bi moral laboratorij ustvariti zbirko podatkov iz preteklih preskusov, da lahko določi območja ter porazdelitve pozitivnih in negativnih kontrol za ustrezna tkiva in vrste. Priporočila o tem, kako zbrati in uporabiti podatke iz preteklih preskusov (tj. merila za vključitev in izključitev podatkov v podatke iz preteklih preskusov ter merila za sprejemljivost danega preskusa), so navedena v virih (47). Na podlagi različnih tkiv in vrst ter različnih vehiklov in načinov dajanja kemikalije se lahko pridobijo različne vrednosti odstotka DNK v repu v negativnih kontrolah. Zato je pomembno določiti območja negativnih kontrol za vsako tkivo in vrsto. Laboratoriji morajo uporabljati metode nadzora kakovosti, kot so kontrolne karte (npr. c-karte ali „X-črta“ karte (48)), da opredelijo, kako variabilni so njihovi podatki, in pokažejo, da je metodologija v njihovem laboratoriju „pod nadzorom“. Morda bo treba optimizirati tudi izbiro ustreznih snovi za pozitivno kontrolo, območij odmerkov in preskusnih pogojev (npr. pogojev elektroforeze) za zaznavanje šibkih učinkov (glej odstavek 17).

Vsako spremembo v protokolu preskusa je treba proučiti glede na skladnost z obstoječimi zbirkami podatkov laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov. Če se pojavijo večje neskladnosti, je treba ustvariti novo zbirko podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov.

OPIS METODE

Priprave

Izbira živalske vrste

Navadno se uporabijo običajni laboratorijski sevi zdravih mladih odraslih glodalcev (stari 6 do 10 tednov ob začetku tretiranja, čeprav so sprejemljive tudi rahlo starejše živali). Izbira vrste glodalcev mora temeljiti na (i) vrstah, uporabljenih v drugih študijah toksičnosti (da se lahko primerjajo podatki in izvajajo celovite študije), (ii) vrstah, pri katerih so v študijah rakotvornosti nastali tumorji (med raziskavami mehanizmov razvoja raka), ali (iii) vrstah z metabolizmom, ki najbolj ustreza človeškemu, če so znane. Pri tem preskusu se običajno uporabljajo podgane. Uporabijo pa se lahko tudi druge vrste, če je to etično in znanstveno utemeljeno.

Pogoji nastanitve in hranjenja živali

Pri glodalcih mora temperatura prostora s poskusnimi živalmi načeloma znašati 22 °C (\pm 3 °C). Relativna vlažnost mora načeloma znašati 50–60 % oziroma vsaj 30 % in po možnosti ne sme presegati 70 %, razen med čiščenjem prostora. Osvetlitev mora biti umetna, pri čemer je zaporedje 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja običajna laboratorijska hrana z neomejeno količino pitne vode. Na izbiro hrane lahko vpliva potreba po zagotovitvi ustrezne mešanice preskusne kemikalije, kadar se daje na ta način. Če se ne pričakuje agresivno vedenje, je treba glodalce namestiti v majhnih skupinah (običajno po največ pet živali) istega spola. Živali so lahko nastanjene posamično le, če je to znanstveno utemeljeno. Če je mogoče, je treba uporabiti trdna tla, saj lahko mrežasta tla povzročijo resne poškodbe (49). Okolje je treba ustrezno obogatiti.

Priprava živali

Živali se naključno dodelijo kontrolnim in tretiranim skupinam. Živali se označijo z edinstvenimi oznakami in vsaj pet dni pred začetkom tretiranja se morajo aklimatizirati na laboratorijske pogoje. Uporabiti je treba najmanj invazivno metodo označevanja živali z edinstvenimi oznakami. Ustrezne metode vključujejo namestitve obročkov ali trakov, vsaditev mikročipa ali biometrično identifikacijo. V teh preskusih zarezovanje ušesa ali prsta ni znanstveno utemeljeno. Kletke je treba razporediti tako, da se čim bolj zmanjšajo morebitni učinki, ki nastanejo zaradi razporeditve kletk. Ob začetku študije mora biti razlika med težami živali čim manjša in ne sme presežati $\pm 20\%$.

Priprava odmerkov

Trdne preskusne kemikalije je treba pred odmerjanjem živalim raztopiti ali suspendirati v ustreznih vehiklih ali primešati hrani ali pitni vodi. Tekoče preskusne kemikalije se lahko odmerijo neposredno ali pa se pred odmerjanjem razredčijo. Pri izpostavljenosti z vdihavanjem se lahko preskusne kemikalije glede na njihove fizikalno-kemijskih lastnosti dajejo v obliki plina, pare ali trdnega/tekočega aerosola (50) (51).

Uporabiti je treba sveže pripravljene preskusne kemikalije, razen če je iz podatkov o stabilnosti razvidno, da je shranjevanje sprejemljivo, in so v njih opredeljeni ustrezni pogoji shranjevanja.

Preskusni pogoji

Vehikel

Vehikel pri uporabljenih količinah odmerkov ne sme imeti toksičnih učinkov in ne sme zbudati suma, da lahko kemično reagira s preskusnimi kemikalijami. Če se uporabijo manj znani vehikli, je treba njihovo uporabo podpreti z referenčnimi podatki, ki dokazujejo njihovo združljivost s poskusnimi živalmi, načinom dajanja in končno točko. Priporočljivo je, da se, kadar koli je to mogoče, najprej razmisli o uporabi vodnega topila/vehikla. Opozoriti je treba, da lahko nekateri vehikli (zlasti viskozni) povzročijo vnetje in povečajo ravni ozadja za prelome verig DNK na mestu kontakta, zlasti pri večkratnem dajanju.

Kontrole

Pozitivne kontrole

V tej fazi mora biti v vsak preskus običajno vključena skupina z najmanj tremi živalmi, ki jih je mogoče analizirati, istega spola ali obeh spolov, če se uporabi oba (glej odstavek 32), tretirana s snovjo za pozitivno kontrolo. V prihodnje bo morda mogoče dokazati ustrezno usposobljenost, da se zmanjša potreba po pozitivnih kontrolah. Če se uporabi več vzorčenj (npr. pri protokolu enkratnega dajanja), je treba vključiti pozitivne kontrole samo ob enem vzorčenju, vendar je treba zagotoviti uravnoteženo zasnovo (glej odstavek 48). Snovi za sočasno pozitivno kontrolo ni treba dajati na isti način kot preskusno kemikalijo, pomembno pa je, da se uporabi isti način za merjenje učinkov na mestu stika. Snovi za pozitivno kontrolo morajo pokazati, da povzročijo prelome verig DNK v vseh preiskovanih tkivih za preskusno kemikalijo, EMS pa bo verjetno najpogosteje izbrana pozitivna kontrola, saj je povzročila prelome verig DNK v vseh tkivih, ki so bila proučena. Odmerki snovi za pozitivno kontrolo morajo biti izbrani tako, da povzročajo zmerne učinke, ki kritično ocenijo uspešnost in občutljivost preskusa, ter lahko bi temeljili na krivuljah odziva na odmerek, ki jih je laboratorij določil med dokazovanjem usposobljenosti. Odstotek DNK v repu za živali sočasne pozitivne kontrole mora biti skladen s predhodno določenim območjem laboratorija za vsako posamezno tkivo in vzorčenje za to vrsto (glej odstavek 16). Primeri snovi za pozitivno kontrolo in nekatera njihova ciljna tkiva (pri glodalcih) so navedeni v preglednici 1. Snovi, ki niso navedene v preglednici 1, se lahko izberejo, če je to znanstveno utemeljeno.

Preglednica 1

Primeri snovi za pozitivno kontrolo in nekatera njihova ciljna tkiva

Snovi in št. CAS
etil metansulfonat (št. CAS 62-50-0) za katero koli tkivo
etil nitrozo-sečnina (št. CAS 759-73-9) za jetra in želodec, dvanajsternik ali tešče črevo
metil metansulfonat (št. CAS 66-27-3) za jetra, želodec, dvanajsternik ali tešče črevo, pljučne celice ali celice bronhoalveolarnega izpirka (BAL), ledvice, mehur, pljuča, modo in kostni mozeg/kri
N-metil-N'-nitro-N-nitrozogvanidin (št. CAS 70-25-7) za želodec, dvanajsternik ali tešče črevo
1,2-dimetilhidrazin 2HCl (št. CAS 306-37-6) za jetra in črevo
N-metil-N-nitrozo-sečnina (št. CAS 684-93-5) za jetra, kostni mozeg, kri, ledvice, želodec, tešče črevo in možgane

Negativne kontrole

Skupino živali negativne kontrole, tretirano samo z vehiklom, drugače pa tretirano enako kot tretirane skupine, je treba vključiti v vsak preskus za vsak čas vzorčenja in vsako tkivo. Odstotek DNK v repu pri živalih negativne kontrole mora biti v predhodno določenem območju ozadja laboratorija za vsako posamezno tkivo in vsak čas vzorčenja za to vrsto (glej odstavek 16). Če podatki iz preteklih preskusov ali objavljeni podatki o kontrolah ne kažejo, da izbrani vehikel, število odmerkov ali način dajanja ne povzroča nobenih škodljivih ali genotoksičnih učinkov, je treba pred izvedbo celotne študije izvesti predhodne študije, da se določi sprejemljivost kontrole z vehiklom.

POSTOPEK

Število in spol živali

Čeprav je malo podatkov o živalih ženskega spola, ki bi omogočili primerjavo med spoloma v okviru kometnega preskusa, so si drugi genotoksični odzivi *in vivo* med živalmi moškega in ženskega spola v splošnem podobni, zato se lahko večino študij izvede na obeh spolih. Podatki, ki kažejo pomembne razlike med samci in samicami (npr. razlike v sistemski toksičnosti, metabolizmu, biološki dostopnosti itd., vključno v npr. študiji za določanje območja), spodbujajo uporabo obeh spolov. V tem primeru je morda ustrezno izvesti študijo na obeh spolih, npr. kot del toksikološke študije s ponavljajočim se odmerkom. V primeru uporabe obeh spolov je primerno uporabiti zasnovno preskusa z več dejavniki. Podrobnosti o tem, kako analizirati podatke z uporabo te zasnove, so navedene v Dodatku 2.

Velikosti skupine ob začetku študije (in med preverjanjem usposobljenosti) je treba določiti z namenom, da se zagotovi vsaj 5 živali, ki jih je mogoče analizirati, enega spola ali vsakega od spolov, če se uporabi oba, na skupino (manj za skupino sočasne pozitivne kontrole – glej odstavek 29). Kadar bi bila lahko izpostavljenost ljudi kemikalijam omejena na en spol, na primer pri nekaterih farmacevtskih izdelkih, je treba preskus opraviti na živalih ustreznega spola. Na podlagi zahtev za največje število živali je za študijo, izvedeno v skladu s parametri iz odstavka 33 s tremi skupinami, ki prejemajo odmerke, ter sočasno negativno in pozitivno kontrolo (pri čemer je vsaka skupina sestavljena iz petih živali enega spola) običajno potrebnih od 25 do 35 živali.

ČASOVNI RAZPORED TRETIRANJA

Živalim je treba dati odmerke vsak dan v obdobju dveh ali več dni (tj. dva ali več odmerkov na približno 24 ur) in vzorce je treba odvzeti enkrat na 2 do 6 ur (ali ob T_{max}) po zadnjem odmerku (12). Vzorci iz daljših časovnih razporedov odmerjanja (npr. 28-dnevno vsakodnevno dajanje odmerkov) so sprejemljivi. Dokazana je bila uspešna kombinacija kometnega preskusa in preskusa mikronukleusov v eritrocitih sesalcev (10) (19). Vendar je treba skrbno obravnavati logistiko v zvezi z vzorčenjem tkiv za kometni preskus, skupaj z zahtevami za vzorčenje tkiv za drugimi vrstami toksikoloških ocen. Odvzem 24 ur po zadnjem odmerku, kar je značilno za splošno študijo toksičnosti, v večini primerov ni ustrezen (glej odstavek 40 o času vzorčenja). Uporaba drugih časovnih razporedov tretiranja in vzorčenja mora biti utemeljena (glej Dodatek 3). Lahko se na primer uporabi enkratni odmerek z večkratnimi vzorčenji, treba pa je opozoriti, da bo za študijo z enkratnim odmerkom treba zagotoviti več živali, saj je potrebno večkratno vzorčenje, vendar je včasih to bolj zaželeno, npr. ko preskusna kemikalija povzroči prekomerno toksičnost po ponavljajočih se odmerkih.

Ne glede na način izvedbe preskusa je ta sprejemljiv, če preskusna kemikalija povzroči pozitiven odziv, v primeru negativne študije pa je sprejemljiv, če so bili zbrani posredni ali neposredni dokazi za izpostavljenost ciljnih tkiv ali toksičnost za ta tkiva ali če je bil dosežen mejni odmerek (glej odstavek 36).

Preskusne kemikalije se lahko dajo tudi v razdeljenem odmerku, tj. v dveh tretiranjih v istem dnevu, ne več kot 2–3 ure narazen, za lažje dajanje večjih odmerkov. Pod temi pogoji je treba vzorčenje načrtovati glede na čas dajanja zadnjega odmerka (glej odstavek 40).

Velikost odmerkov

Če se izvede predhodna študija za določanje območja, ker ustrezni podatki iz drugih pomembnih študij, ki bi bili v pomoč pri izbiri odmerkov, niso na voljo, jo je treba izvesti v istem laboratoriju ter uporabiti isto vrsto, sev, spol in režim tretiranja kot v glavni študiji, v skladu s trenutnimi pristopi za izvajanje študij za določanje območja. S študijo je treba določiti največji tolerančni odmerek (MTD), ki je opredeljen kot odmerek, ki povzroči blage toksične učinke, povezane s trajanjem študije (na primer jasne klinične znake, kot so nenormalno vedenje ali odzivi, manjša upočasnitev pridobivanja telesne teže ali citotoksičnost za ciljno tkivo), ne pa smrti ali znakov bolečine, trpljenja ali stiske, zaradi katerih je potrebna evtanazija. Za netoksično preskusno kemikalijo z obdobjem odmerjanja, ki traja 14 dni ali več, znaša največji (mejni) odmerek 1 000 mg/kg telesne teže/dan. Za obdobja odmerjanja, krajša od 14 dni, znaša največji (mejni) odmerek 2 000 mg/kg telesne teže/dan. Te omejitve so lahko drugačne za določene vrste preskusnih kemikalij (npr. farmacevtske izdelke za ljudi), za katere veljajo posebni predpisi.

Kemikalije, ki kažejo nasičenost toksikokinetičnih lastnosti ali povzročajo procese razstrupljanja, zaradi katerih se lahko po dolgotrajnem tretiranju zmanjša izpostavljenost, so lahko izjeme pri merilih za določanje odmerkov in treba jih je oceniti za vsak primer posebej.

Za akutno in subakutno različico kometnega preskusa je poleg največjega odmerka (MTD, največji izvedljiv odmerek, največja izpostavljenost ali mejni odmerek) treba izbrati tudi padajoče zaporedje vsaj dveh dodatnih, ustreznih razporejenih velikosti odmerkov (po možnosti ločeni za manj kot 10) za vsako vzorčenje, da se dokaže z odmerkom povezane odzive. Uporabljene velikosti odmerkov pa bi morale načeloma zajeti tudi območje od največje do majhne toksičnosti ali netoksičnosti. Kadar se opazi toksičnost za ciljno tkivo pri vseh preskušanih velikostih odmerkov, je priporočena nadaljnja študija z netoksičnimi odmerki (glej odstavek 54 in 55). Študije, ki nameravajo bolj poglobljeno raziskati obliko krivulje odziva na odmerek, bodo morda zahtevale dodatne skupine, ki prejemajo odmerke.

Dajanje odmerkov

Pri načrtovanju preskusa je treba upoštevati predvideni način izpostavljenosti pri ljudeh. Zato se lahko ob ustrezni utemeljitvi izberejo načini izpostavljenosti, kot so s prehrano, pitno vodo, topično podkožno, intravenozno, oralno (z gavažo), z vdihavanjem, intratrahealno ali z vsadkom. V vsakem primeru pa je treba način izbrati tako, da zagotovi ustrezna izpostavljenost ciljnih tkiv. Dajanje z intraperitonealno injekcijo na splošno ni priporočljivo, saj to ni značilen in pomemben način izpostavljenosti ljudi, in se lahko uporabi samo na podlagi posebne utemeljitve (npr. za nekatere snovi za pozitivno kontrolo, namene preiskovanja ali nekatere droge, ki se dajejo intraperitonealno). Največja količina tekočine, ki se lahko da naenkrat z gavažo ali injekcijo, je odvisna od velikosti poskusne živali. Količina ne sme presežati 1 ml/100 g telesne teže, razen v primeru vodnih raztopin, za katere se lahko uporabi 2 ml/100 g telesne teže. Uporabo večjih količin (če to dovoljuje zakonodaja o dobrobiti živali) je treba utemeljiti. Kadar koli je to mogoče, je treba doseči različne velikosti odmerkov s prilagajanjem koncentracije sestave odmerka, da se zagotovi konstanten volumen glede na telesno težo pri vseh velikostih odmerkov.

Čas vzorčenja

Čas vzorčenja je ključna spremenljivka, saj je določen z obdobjem, ki je potrebno, da preskusne kemikalije dosežejo najvišjo koncentracijo v ciljnem tkivu in da pride do prelomov verig DNK, ampak preden se ti prelomi odstranijo, popravijo ali vodijo v celično smrt. Obstočnost nekaterih poškodb, ki povzročijo prelome verig DNK, ki jih zazna kometni preskus, je lahko zelo kratka, vsaj pri nekaterih kemikalijah, preskušanih *in vitro* (52) (53). Če obstaja sum takšnih prehodnih poškodb DNK, je treba v skladu s tem sprejeti ukrepe za zmanjšanje izgub teh poškodb, tako da se zagotovi, da so vzorci tkiv odvzeti dovolj zgodaj, po možnosti pred privzetimi časi, ki so navedeni spodaj. Optimalni časi vzorčenja so lahko odvisni od kemikalije ali načina dajanja, kar na primer pomeni hitro izpostavljenost tkiva z intravenoznim dajanjem kemikalije ali izpostavljenost z vdihavanjem. V skladu s tem in kadar je to mogoče, je treba čas vzorčenja določiti na podlagi kinetičnih podatkov (npr. čas (T_{max}), ko je dosežena najvišja koncentracija v plazmi ali tkivu (C_{max}), ali stabilno stanje pri večkratnih odmerkih). Če kinetični podatki niso na voljo, je ustrezen kompromis za merjenje genotoksičnosti odvzem vzorca 2–6 ur po zadnjem odmerku pri dveh ali več odmerkih ali 2–6 ur in 16–26 ur po enkratnem odmerku, čeprav je treba paziti, da se nekropsija na vseh živalih opravi ob istem času po zadnjem (ali edinem) odmerku. Za izbiro ustreznih časov vzorčenja se lahko uporabijo tudi informacije o pojavljanju toksičnih učinkov v ciljnih organih (če so na voljo).

Opazovanja

Splošna klinična opazovanja, povezana z zdravjem živali, je treba opraviti in zabeležiti vsaj enkrat dnevno, po možnosti vsak dan ob istem času in ob upoštevanju obdobja največje intenzivnosti pričakovanih učinkov po odmerjanju (54). Vse živali je treba opazovati vsaj dvakrat na dan, da se ugotovita obolevnost in smrtnost. Pri daljših študijah je treba vse živali stehtati vsaj enkrat na teden in ob koncu preskusnega obdobja. Porabo hrane je treba meriti ob vsaki menjavi hrane in vsaj tedensko. Če se preskusna kemikalija daje s pitno vodo, je treba izmeriti porabo vode ob vsaki menjavi vode in vsaj tedensko. Živali, ki kažejo neletalne znake čezmerne toksičnosti, je treba evtanazirati pred koncem preskusnega obdobja in se običajno ne uporabijo za kometno analizo.

Odvzem tkiv

Ker je mogoče proučevati indukcijo prelomov verig DNK (kometov) v skoraj vsakem tkivu, je treba izbiro tkiv, ki bodo odvzeta, jasno opredeliti ter utemeljiti z razlogom za izvedbo študije in kakršnimi koli obstoječimi podatki o procesih absorpcije, porazdelitve, presnove in izločanja (ADME), genotoksičnosti, rakotvornosti ali drugi toksičnosti za preiskovane preskusne kemikalije. Pomembni dejavniki, ki jih je treba upoštevati, morajo zajemati način dajanja (na podlagi najverjetnejših načinov izpostavljenosti ljudi), predvideno porazdelitev in absorpcijo v tkivu, vlogo metabolizma ter možni mehanizem delovanja preskusnih kemikalij. Jetra so najpogosteje proučevano tkivo in zanj obstaja največ podatkov. Če torej ni na voljo nobenih informacij o ozadju in niso

opredeljena nobena posebna preiskovana tkiva, bi bilo vzorčenje jeter utemeljeno, saj so primarno mesto ksenobiotičnega metabolizma in pogosto močno izpostavljene tako matičnim snovem kot tudi metabolitom. V nekaterih primerih bo morda najustrežnejše proučiti mesto neposrednega kontakta (na primer žlezni želodec ali dvanajsternik/tešče črevo za kemikalije, ki se dajejo oralno, ali pljuča za kemikalije, ki se vdihavajo). Izbrati je treba dodatna ali druga tkiva glede na posebne razloge za izvedbo preskusa, morda pa je uporabno proučiti več tkiv istih živali, če je laboratorij dokazal usposobljenost za ta tkiva in hkratno obravnavanje več tkiv.

Priprava vzorcev

Za procese, opisane v naslednjih odstavkih (44–49), je pomembno, da se vse raztopine ali stabilne suspenzije uporabijo do datuma izteka roka njihove uporabnosti ali se po potrebi pripravijo sveže. V naslednjih odstavkih se kot ključne spremenljivke (glej opredelitve pojmov v Dodatku 1) obravnavajo tudi čas, ki je potreben za (i) odstranitev vsakega tkiva po obdukciji, (ii) predelavo vsakega tkiva v suspenzijo s celicami/jedri in (iii) obdelavo suspenzije in pripravo preparatov, sprejemljivo trajanje vsakega od teh korakov pa bi moralo biti določeno med vzpostavljanjem metode in dokazovanjem usposobljenosti.

Živali se evtanazirajo v skladu z veljavno zakonodajo o dobrobiti živali in načeli 3R ob ustreznem času po zadnjem tretiranju s preskusno kemikalijo. Izbrana tkiva se odstranijo in secirajo, en del pa se odvzame za kometni preskus; hkrati je treba odrezati rezino istega dela tkiva in jo vstaviti v formaldehidno raztopino ali ustrezen fiksativ za morebitno histopatološko analizo (glej odstavek 55) v skladu s standardnimi metodami (12). Tkivo za kometni preskus se vstavi v pufer za mletje, spere z zadostno količino hladnega pufru za mletje, da se odstranijo ostanki krvi, in shrani v ledeno mrzlem pufru za mletje do obdelave. Izvede se lahko tudi perfuzija *in situ*, na primer za jetra ali ledvice.

Objavljene so številne metode za izolacijo celic/jeder. Te zajemajo mletje tkiv, kot so jetra in ledvice, postrganje vzorca s sluzničnih površin v primeru prebavnega trakta, homogenizacija in encimska prebava. V validacijskem preskusu JaCVAM so bile proučene samo izolirane celice, zato se v okviru določanja metode in možnosti sklicevanja na podatke preskusa JaCVAM za dokazovanje usposobljenosti priporoča uporaba izoliranih celic. Dokazano pa je bilo, da ni bilo bistvenih razlik v rezultatih preskusa, če so bile uporabljene izolirane celice ali jedra (8). Primerljivi rezultati so bili pridobljeni tudi z različnimi metodami za izolacijo celic/jeder (npr. homogenizacija, mletje, encimska prebava in filtriranje skozi mrežo) (55). Zato se lahko uporabijo izolirane celice ali izolirana jedra. Laboratorij mora skrbno oceniti in validirati metode za izolacijo posameznih celic/jeder, ki se uporabljajo za posamezna tkiva. Kot je navedeno v odstavku 40, je lahko obstojnost nekaterih poškodb, ki vodijo v prelome verig DNK, ki jih zazna kometni preskus, zelo kratka (52) (53). Ne glede na to, katera metoda se uporabi za pripravo suspenzij s posameznimi celicami/jedri, je torej pomembno, da se tkiva obdelajo čim prej po evtanaziji živali in vstavijo v pogoje, ki zmanjšajo odstranjevanje poškodb (npr. hranjenje tkiva pri nizki temperaturi). Suspenzije s celicami se morajo hraniti v ledeno mrzlih pogojih, dokler niso pripravljene za uporabo, zato da se lahko dokažejo kar najmanjše variacije med vzorci ter ustrezni odzivi pozitivnih in negativnih kontrol.

PRIPRAVA PREPARATOV

Preparate je treba pripraviti čim prej (načeloma v roku ene ure) po pripravi posameznih celic/jeder, temperatura in čas med smrtjo živali in pripravo preparata pa morata biti skrbno nadzorovana in validirana v laboratorijskih pogojih. Volumen suspenzije s celicami, ki se jo doda v agarozo z nizkim tališčem (običajno 0,5–1,0 %) za pripravo preparatov, ne sme zmanjšati odstotka agaroze z nizkim tališčem na manj kot 0,45 %. Optimalna gostota celic bo določena na podlagi sistema za analizo slik, ki se uporablja za ocenjevanje kometov.

Liza

Pogoji lize so prav tako ključna spremenljivka in lahko vplivajo na prelome verig, ki so posledica posebnih tipov sprememb DNK (določene alkilacije DNK in adukti baz). Priporoča se torej, da se za vse preparate v preskusu ohranijo čim bolj konstantni pogoji lize. Ko so preparati pripravljene, jih je treba potopiti v ohlajeno lizirno raztopino za vsaj eno uro (ali čez noč) pri približno 2–8 °C in zatemnjenih svetlobnih pogojih, npr. pri rumeni svetlobi (ali povsem zatemnjeno), ki preprečuje, da bi bili izpostavljeni beli svetlobi, ki lahko vsebuje UV-komponente. Po tej inkubacijski dobi je treba preparate sprati, da se odstranijo ostanki detergenta in soli pred korakom odvitja DNK v alkalnih pogojih. To se lahko stori s prečiščeno vodo, nevtralizacijskim pufrom ali fosfatnim pufrom. Uporabi se lahko tudi elektroforezni pufer. V tem primeru se v komori za elektroforezo ohranijo alkalni pogoji.

Odvijanje DNK in elektroforeza

Preparati se naključno položijo na platformo horizontalne enote za elektroforezo, ki vsebuje dovolj elektroforezne raztopine, da so površine preparatov povsem prekrivane (globina pokritja bi morala biti konsistentna v vsaki ponovitvi preskusa). Pri drugem tipu enot za elektroforezo za kometni preskus, tj. z aktivnim hlajenjem, cirkulacijo in visoko zmogljivim napajanjem, bo večje pokritje z raztopino povzročilo večji električni tok pri konstantni napetosti. Uporabiti je treba uravnoteženo zasnovano za namestitev preparatov v elektroforezni bazen, da se zmanjšajo učinki kakršnih koli trendov ali robov v bazenu in variabilnost posameznih serij, tj. v vsaki ponovitvi elektroforeze mora biti enako število preparatov z vzorcem vsake živali v študiji in vključiti je treba vzorce iz različnih skupin, ki prejemajo odmerke, ter pozitivne in negativne kontrole. Preparate je treba pustiti vsaj 20 minut, da se DNK odvijajo, nato pa jih izpostaviti elektroforezi pod nadzorovanimi pogoji, ki kar najbolj povečajo občutljivost in dinamično območje preskusa (tj. omogočajo sprejemljive ravni odstotka DNK v repu za negativne in pozitivne kontrole, s katerimi se kar najbolj poveča občutljivost). Raven migracije DNK je linearno povezana s trajanjem elektroforeze in tudi s potencialom (V/cm). Glede na preskus JaCVAM lahko potencial znaša 0,7 V/cm vsaj 20 minut. Trajanje elektroforeze se obravnava kot ključna spremenljivka in čas elektroforeze mora biti nastavljen tako, da optimizira dinamično območje. Daljša elektroforeza (npr. 30 ali 40 minut, da se kar najbolj poveča občutljivost) običajno povzroči močnejše pozitivne odzive z znanimi mutageni. Vendar pa lahko daljša elektroforeza povzroči tudi prekomerno migracijo v kontrolnih vzorcih. V vsakem preskusu mora biti napetost konstantna, variabilnost drugih parametrov pa mora biti znotraj ozkega in določenega območja, na primer v preskusu JaCVAM je potencial 0,7 V/cm dal začetni tok v višini 300 mA. Globino pufru je treba prilagoditi, da se doseže zahtevane pogoje, in jo vzdrževati ves čas preskusa. Zabeležiti je treba tok ob začetku in koncu elektroforeze. Optimalne pogoje je torej treba določiti med začetnim dokazovanjem usposobljenosti v laboratoriju v zvezi z vsakim preiskovanim tkivom. Temperatura elektroforezne raztopine med odvijanjem DNK in elektroforezo mora biti nizka, običajno 2–10 °C (10). Temperaturo elektroforezne raztopine je treba zabeležiti ob začetku odvijanja ter ob začetku in koncu elektroforeze.

Po koncu elektroforeze je treba preparate potopiti/spirati v nevtralizacijskem pufru vsaj 5 minut. Geli se lahko obarvajo in ocenijo „sveži“ (npr. v roku 1–2 dni) ali pa se dehidrirajo za poznejše ocenjevanje (npr. v roku 1–2 tednov po barvanju) (56). Vendar je treba validirati pogoje med dokazovanjem usposobljenosti ter pridobiti in ohraniti podatke iz preteklih preskusov ločeno za vsakega od teh pogojev. V primeru poznejšega ocenjevanja je treba preparate dehidrirati tako, da se jih potopi v absolutni etanol za vsaj 5 minut, posuši na zraku in nato shrani pri sobni temperaturi ali v posodi v hladilniku do ocenjevanja.

Merilne metode

Komete je treba oceniti količinsko z avtomatiziranim ali polavtomatiziranim sistemom za analizo slik. Preparati se obarvajo z ustreznim fluorescentnim barvilom, npr. SYBR Gold, Green I, propidijevim jodidom ali etidijevim bromidom, ter izmerijo pri ustreznih povečavi (npr. 200-kratni) na epifluorescenčnem mikroskopu z ustreznimi detektorji ali digitalno kamero (npr. naprava CCD).

Celice se lahko razvrstijo v tri kategorije, kot je opisano v atlasu slik kometov (57), in sicer tiste, ki jih je mogoče oceniti, tiste, ki jih ni mogoče oceniti in celice „hedgehog“ (ang. „jež“ oziroma močno poškodovane celice) (glej odstavek 56 za več podrobnosti). Odstotek DNK v repu je treba oceniti samo za celice, ki jih je mogoče oceniti (jasno razločna glava in rep brez motenj zaradi sosednjih celic), da se prepreči izkrivljene rezultate. O pogostosti celic, ki jih ni mogoče oceniti, ni treba poročati. Pogostost močno poškodovanih celic je treba določiti na podlagi vizualnega ocenjevanja (saj analiza slik ne more zlahka zaznati kometov brez jasno razločne glave) pri vsaj 150 celicah na vzorec (glej odstavek 56 za več podrobnosti) in jih ločeno opisati.

Vse preparate za analizo, vključno s tistimi s pozitivnimi in negativnimi kontrolami, je treba neodvisno označiti in oceniti „na slepo“, tako da oseba, ki beleži ugotovitve, ne pozna pogojev tretiranja. Za vsak vzorec (na tkivo na žival) je treba analizirati vsaj 150 celic (kar ne vključuje močno poškodovanih celic – glej odstavek 56). Ocenjevanje 150 celic na žival pri vsaj 5 živalih na odmerek (manj pri sočasni pozitivni kontroli – glej odstavek 29) zagotavlja ustrezno statistično moč glede na analizo, ki so jo opravili Smith idr., 2008 (5). Če se uporabljajo preparati, bi to pomenilo od 2 do 3 ocenjene preparate na vzorec, kadar se uporablja pet živali na skupino. Opazovati je treba več predelov preparata pri gostoti, ki zagotavlja, da se repi ne prekrivajo. Izogniti se je treba ocenjevanju ob robovih preparatov.

Pri kometnem preskusu se lahko prelomi verig DNK merijo z neodvisnimi končnimi točkami, kot so odstotek DNK v repu, dolžina repa in repni moment. Izvedejo se lahko vse tri meritve, če se uporablja ustrezna programska oprema za analizo slik. Za vrednotenje in razlago rezultatov pa se priporoča odstotek DNK v repu (ki mu pravimo tudi odstotna intenzivnost repa) (12) (40) (41) (42), določen pa je z intenzivnostjo fragmentov DNK v repu, ki je izražena kot odstotek skupne intenzivnosti celice (13).

Poškodbe tkiv in citotoksičnost

Pozitivne ugotovitve pri kometnem preskusu morda niso pridobljene samo zaradi genotoksičnosti, saj lahko povečano migracijo DNK povzroči tudi toksičnost za ciljna tkiva (12) (41). Obratno pa je mogoče opaziti nizko ali zmerno citotoksičnost pri znanih genotoksinih (12), kar pomeni, da ni mogoče razlikovati med migracijo DNK, ki jo povzroča genotoksičnost, in tisto, ki jo povzroča citotoksičnost, samo s kometnim preskusom. Vendar če je opažena povečana migracija DNK, je priporočeno, da se prouči enega ali več znakov citotoksičnosti, saj lahko to pripomore k razlagi ugotovitev. Povečano migracijo DNK, če so ugotovljeni jasni dokazi za citotoksičnost, je treba razlagati previdno.

Predlagana so bila številna merila citotoksičnosti in izmed teh se kot pomembno merilo toksičnosti za tkiva obravnavajo histopatološke spremembe. S povečano migracijo DNK so povezana opažanja, kot so vnetje, infiltracija celic, apoptozne ali nekrotične spremembe, toda kot je razvidno iz validacijskega preskusa JaCVAM (12), ni na voljo nobenega dokončnega seznama histopatoloških sprememb, ki so vedno povezane s povečano migracijo DNK. Spremembe v meritvah klinične kemije (npr. AST, ALT) lahko tudi zagotovijo uporabne informacije o poškodbah tkiv, razmisli pa se lahko tudi o uporabi dodatnih kazalnikov, kot so aktivacija kaspaze, barvilo TUNEL, barvilo aneksin V itd. Vendar je število objavljenih podatkov, kjer so bili ti uporabljeni v študijah *in vivo*, omejeno in so nekateri lahko manj zanesljivi kot drugi.

Celice „hedgehog“ (ali „ježi“, oblaki, fantomske celice) so celice, ki kažejo mikroskopsko sliko, na kateri so majhna glava majhna (ali pa je ni) in veliki, razpršeni repi, ter ki se obravnavajo kot močno poškodovane celice, čeprav je etiologija „ježev“ negotova (glej Dodatek 3). Zaradi njihovega videza so meritve odstotka DNK v repu z analizo slike nezanesljive, zato je treba močno poškodovane celice oceniti ločeno. Pojavljanje močno poškodovanih celic je treba zabeležiti in ga navesti v poročilu, kakršno koli pomembno povečanje, za katero se predvideva, da ga je povzročila preskusna kemikalija, pa je treba previdno raziskati in razložiti. K takemu obravnavanju lahko pripomore poznavanje morebitnega načina delovanja preskusnih kemikalij.

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

Preskusna enota je žival, zato je treba podatke o posamezni živali in povzete rezultate predstaviti v obliki preglednice. Zaradi hierarhične narave podatkov je priporočeno, da se določi mediana odstotka DNK v repu za vsak preparat in izračuna srednja vrednost median za vsako žival (12). Nato se določi srednja vrednost srednjih vrednosti za posamezne živali, da se dobi skupinska srednja vrednost. Vse te vrednosti morajo biti vključene v poročilo. Uporabijo se lahko drugi pristopi (glej odstavek 53), če so znanstveno in statistično utemeljeni. Statistična analiza se lahko izvede z različnimi pristopi (58) (59) (60) (61). Pri izbiri statističnih metod, ki bodo uporabljene, je treba obravnavati potrebo po pretvorbi (npr. logaritemski ali s kvadratnim koren) podatkov in/ali prištevanje majhnega števila (npr. 0,001) k vsem vrednostim (tudi tistim, ki niso ničelne), da se zmanjšajo učinki ničelnih vrednosti celic, kot je opisano v že navedenih virih. Podrobnosti analize interakcije tretiranji in spolom, kadar se uporabita oba spola, in posledična analiza podatkov, pri kateri so ugotovljene razlike ali ne, so opisane v Dodatku 2. V poročilu je treba navesti tudi podatke o toksičnosti in kliničnih znakih.

Merila za sprejemljivost

Sprejemljivost preskusa temelji na naslednjih merilih:

- a. podatki o sočasni negativni kontroli se štejejo kot sprejemljivi za vključitev v zbirko podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov, kot je opisano v odstavku 16;
- b. sočasne pozitivne kontrole (glej odstavek 29) morajo povzročiti odzive, skladne z odzivi iz zbirke podatkov o pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov, in statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;
- c. analizirano je bilo ustrezno število celic in odmerkov (odstavki 52 in 36–38);
- d. merila za izbor najvišjega odmerka so skladna z merili, opisanimi v odstavku 36.

Vrednotenje in razlaga rezultatov

Pod pogojem, da so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno pozitivno, če:

- a. se vsaj pri enem od preskusnih odmerkov pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;
- b. je povečanje povezano z odmerkom, kadar se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom;
- c. je kateri koli od rezultatov zunaj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov za dano vrsto, vehikel, način dajanja, tkivo in število odmerkov.

Ko so izpolnjena vsa ta merila, se nato šteje, da lahko preskusna kemikalija povzroči prelome verig DNK v tkivih, preiskovanih s tem preskusnim sistemom. Če je izpolnjeno samo eno od teh meril ali dva, glej odstavke 62.

Pod pogojem, da so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno negativno, če:

- a. se pri nobeni od preskusnih koncentracij ne pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;
- b. se ne pojavi povečanje, povezano s koncentracijo, kadar se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom;
- c. so vsi rezultati znotraj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov za dano vrsto, vehikel, način dajanja, tkivo in število odmerkov;
- d. so pridobljeni neposredni ali posredni dokazi o izpostavljenosti ciljnih tkiv ali toksičnosti za ta tkiva.

Za preskusno kemikalijo se nato šteje, da ne more povzročiti prelomov verig DNK v tkivih, preiskovanih s tem preskusnim sistemom.

Preverjanje jasno pozitivnega ali jasno negativnega odziva ni potrebno.

V primerih, ko odziv ni jasno negativen ali pozitiven (tj. niso izpolnjena vsa merila, navedena v odstavku 59 oziroma 60), in za pomoč pri opredelitvi biološke pomembnosti rezultata, je treba podatke oceniti s strokovno presojo in/ali izvesti nadaljnje preiskave, če je to znanstveno utemeljeno. Uporabno bi lahko bilo ocenjevanje dodatnih celic (kadar je to ustrezno) ali izvajanje ponovitve preskusa, po možnosti z uporabo optimiziranih preskusnih pogojev (npr. razmik med odmerki, drugi načini dajanja, drugi časi vzorčenja ali druga tkiva).

Zbirka podatkov v redkih primerih celo po izvedbi nadaljnjih preiskav onemogoča sprejetje sklepa o pozitivnih ali negativnih rezultatih, zato se zaključí, da je dvoumna.

Za oceno biološke pomembnosti pozitivnega ali dvoumnega rezultata so zahtevane informacije o citotoksičnosti ciljnega tkiva (glej odstavka 54 in 55). Če so pozitivne ali dvoumne ugotovitve opažene samo takrat, ko obstaja jasen dokaz o citotoksičnosti, se za študijo zaključí, da je dvoumna za genotoksičnost, razen če ni na voljo dovolj informacij, ki omogočajo dokončen sklep. Kadar se v primerih negativnega rezultata študije opazijo znaki toksičnosti pri vseh preskušanih velikostih odmerkov, je morda priporočena nadaljnja študija z netoksičnimi odmerki.

Poročilo o preskusu

V poročilo o preskusu se vključijo naslednji podatki:

Preskusna kemikalija:

- vir, številka serije, če je na voljo;
- stabilnost preskusne kemikalije, rok uporabe ali datum za ponovno analizo, če je znan.

Snov iz ene sestavine:

- fizični videz, topnost v vodi in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti;
- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

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

Topilo/vehikel:

- utemeljitev izbire topila/vehikla;
- topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu/vehiklu, če je znana;
- priprava formulacij odmerkov;
- analitsko določanje sestave (npr. stabilnost, homogenost, nominalne koncentracije).

Preskusne živali:

- uporabljena vrsta/sev ter znanstvena in etična utemeljitev izbire;
- število, starost in spol živali;

- izvor, nastanitveni pogoji, prehrana, obogatitev okolja itd.;
- teža posameznih živali ob začetku in koncu preskusa, vključno z razponom, srednjo vrednostjo in standardnim odklonom telesne teže za vsako skupino.

Preskusni pogoji:

- podatki o pozitivnih in negativnih kontrolah (z vehiklom/topilom);
- podatki iz študije za določanje območja (če je bila izvedena);
- utemeljitev izbire velikosti odmerkov;
- podrobnosti o pripravi preskusne kemikalije;
- podrobnosti o dajanju preskusne kemikalije;
- utemeljitev načina dajanja;
- mesto injiciranja (za subkutane ali intravenske študije);
- metode za pripravo vzorca, kadar so na voljo, histopatološke analize, zlasti za kemikalijo s pozitivnim kometnim odzivom;
- utemeljitev izbire tkiva;
- metode za preverjanje, ali je preskusna kemikalija dosegla ciljno tkivo ali krvni obtok, v primeru negativnih rezultatov;
- dejanski odmerek (v mg/kg telesne teže/dan), izračunan glede na koncentracijo preskusne kemikalije (v ppm) v hrani/pitni vodi in porabo hrane/pitne vode,
- če je ustrezno;
- podrobnosti o kakovosti hrane in vode;
- podroben opis časovnih razporedov tretiranja in vzorčenja ter utemeljitev izbir (npr. toksikokinetični podatki, če so na voljo);
- metoda za blažitev bolečin, analgezija;
- metoda za evtanazijo;
- postopki za izolacijo in hrambo tkiv;
- metode za pripravo suspenzije s posameznimi celicami/jedri;
- izvor in številka serij za vse reagente (kadar je to mogoče);
- metode za vrednotenje citotoksičnosti;
- pogoji elektroforeze;
- uporabljene tehnike barvanja ter metode za ocenjevanje in merjenje kometov.

Rezultati:

- splošna klinična opazovanja, če obstajajo, pred in med preskusnim obdobjem za vsako žival;
- dokazi citotoksičnosti, če so bili pridobljeni;
- pri študijah, ki trajajo dlje kot en teden: teža posameznih živali med študijo, vključno z območjem, srednjo vrednostjo in standardnim odklonom telesne teže za vsako skupino; poraba hrane;

- razmerje med odzivom in odmerkom, če je očitno;
- za vsako tkivo/žival odstotek DNK v repu (ali druga merila, če so bila izbrana) in vrednosti mediane na preparat, srednje vrednosti na žival in srednje vrednosti na skupino;
- podatki o sočasni negativni kontroli in negativnih kontrolah iz preteklih preskusov z območji, srednjimi vrednostmi/medianami in standardnimi odkloni za vsako ocenjeno tkivo;
- podatki o sočasni pozitivni kontroli in pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov;
- za tkiva, ki niso jetra, krivulja odziva na odmerek z uporabo pozitivne kontrole. Ta lahko temelji na podatkih, zbranih med dokazovanjem usposobljenosti (glej odstavka 16 in 17), zajemati pa mora tudi utemeljitev s sklicevanjem na najnoveše vire v zvezi s primernostjo stopnje in razpršenostjo odzivov na kontrole za to tkivo;
- uporabljene statistične analize in metode, merila za obravnavanje odziva kot pozitivnega, negativnega ali dvoumnega;
- pogostost celic „hedgehog“ v vsaki skupini in na žival.

Razprava o rezultatih

Sklepne ugotovitve

Viri

VIRI

- (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*, zv. 654/2, str. 114–32.
- (2) Brendler-Schwaab, S. idr. (2005). The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, zv. 20/4, str. 245–54.
- (3) Burlinson, B. idr. (2007). Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, zv. 627/1, str. 31–5.
- (4) Burlinson, B. (2012). The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, zv. 817, str. 143–63.
- (5) Smith, C. C. idr. (2008). Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, zv. 23/3, str. 233–40.
- (6) Hartmann, A. idr. (2003). Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, zv. 18/1, str. 45–51.
- (7) McKelvey-Martin, V. J. idr. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, zv. 288/1, str. 47–63.
- (8) Tice, R. R. idr. (2000). Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 35/3, str. 206–21.
- (9) Singh, N. P. idr. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, zv. 175/1, str. 184–91.
- (10) Rothfuss, A. idr. (2010). Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, zv. 702/1, str. 40–69.
- (11) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, št. 234, OECD, Pariz.

- (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*, Series on Testing and Assessment, št. 195 in 196, OECD Publishing, Pariz.
- (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*, zv. 122/1, str. 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*, zv. 13/1, str. 207–14.
- (15) Collins, A.R. (2004). The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, zv. 26/3, str. 249–61.
- (16) Rothfuss, A. idr. (2011). Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, zv. 723/2, str. 108–20.
- (17) Kushwaha, S. idr. (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*, zv. 58/1, str. 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*, zv. 25/2, str. 187–99.
- (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*, zv. 722/1, str. 7–19.
- (20) Recio, L. idr. (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*, zv. 35/2, str. 149–62.
- (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*, zv. 28/6, str. 621–3.
- (22) Hartmann, A. (2004). **Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations**, *Mutagenesis*, zv. 19/1, str. 51–9.
- (23) Nessler, 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*, zv. 630/1, str. 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*, zv. 393/1–2, str. 175–8.
- (25) Toyozumi, T. idr. (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*, zv. 726/2, str. 175–80.
- (26) Struwe, M. idr. (2008). Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, zv. 7/2, str. 240–9.
- (27) Wada, K. idr. (2012). A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, str. 742/1–2, str. 26–30.
- (28) Wang, A. idr. (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*, zv. 634/ 1–2, str. 51–9.

- (29) Burlinson, B. idr. (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*, zv. 627/1, str. 31–5.
- (30) Jackson, P. idr. (2012). Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, zv. 6/5, str. 486–500.
- (31) Sasaki, Y. F. idr. (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*, zv. 30/6, str. 629–799.
- (32) Sekihashi, K. idr. (2002). Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, zv. 517/1–2, str. 53–74.
- (33) Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009). **The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity**, *Mutation Research*, zv. 681/1, str. 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*, zv. 71/3, str. 275–282.
- (35) Cordelli, E. idr. (2003). Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, zv. 160/4, str. 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*, zv. 33/2, str. 167–72.
- (37) Pfuhrer, S., H. U. Wolf (1996). Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 27/3, str. 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*, zv. 817, str. 165–81.
- (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*, zv. 613, str. 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*, zv. 605(1–2), str. 7–16.
- (41) Burlinson, B. idr. (2007). Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, zv. 627/1, str. 31–5.
- (42) Kumaravel, T. S. idr. (2009). Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, zv. 25/1, str. 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*, zv. 26/6, str. 689–95.
- (44) Møller, P. idr. (2010). Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, zv. 25/2, str. 109–11.
- (45) Forchhammer, L. idr. (2010). Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, zv. 25/2, str. 113–23.
- (46) Azqueta, A. idr. (2011). Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, zv. 724/1–2, str. 41–45.

- (47) Hayashi, M. idr. (2011). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research*, zv. 723/2, str. 87–90.
- (48) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*, John Wiley and Sons, New York, druga izdaja.
- (49) Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS št. 123)
- (50) Poglavje B.8 te priloge: *Subakutna strupenost pri vdihavanju: 28-dnevna študija*.
- (51) Poglavje B.29 te priloge: *Subkronična strupenost pri vdihavanju: 90-dnevna študija*.
- (52) Blakey, D. H., G. R. Douglas (1984). Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, zv. 140/2–3, str. 141–45.
- (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*, zv. 236/1, str. 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, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, št. 19, OECD Publishing, Pariz.
- (55) Nakajima, M. (2012). Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, zv. 34/1, str. 50–4.
- (56) Hartmann, A. idr. (2003). Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, zv. 18/1, str. 45–51.
- (57) Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co., Ltd., Tokio, Japonska.
- (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*, zv. 19/2, str. 109–19.
- (59) Wiklund, S. J., E. Agurell (2003). Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, zv. 18/2, str. 167–75.
- (60) Bright, J. idr. (2011). Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, zv. 10/6, str. 485–93.
- (61) Lovell, D. P., T. Omori (2008). Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, zv. 23/3, str. 171–82.
-

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Gelska elektroforeza posamezne celice v alkalnih pogojih: občutljiva tehnika za zaznavanje poškodb primarne DNK na ravni posamezne celice/jedra.

Kemikalija: snov ali zmes.

Komet: oblika, ki jo zavzamejo nukleoidi, ko so izpostavljeni enemu elektroforeznemu polju, poimenovana zaradi svoje podobnosti kometu: glava je jedro, v repu pa je DNK, ki je v električnem polju migrirala iz jedra.

Ključna spremenljivka/parameter: spremenljivka protokola, ki lahko zaradi majhne spremembe močno vpliva na sklepno ugotovitev preskusa. Ključne spremenljivke so lahko specifične za tkivo. Ključne spremenljivke se ne smejo spreminjati, zlasti v okviru preskusa, ne da bi se pretehtal vpliv takih sprememb na odziv v preskusu, na primer kot to določajo stopnja in variabilnost pozitivnih in negativnih kontrol. V poročilu o preskusu morajo biti navedene spremembe ključnih spremenljivk, izvedene med preskusom ali v primerjavi s standardnim protokolom za laboratorij, in za vsako spremembo je treba podati utemeljitev.

Intenzivnost repa ali odstotek DNK v repu: ustreza intenzivnosti repa kometa glede na skupno intenzivnost (glava in rep). Iz te vrednosti je razvidna količina prelomov DNK, izražena v odstotkih.

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

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

Dodatek 2

ZASNOVA PRESKUSA Z VEČ DEJAVNIKI ZA OPREDELITEV RAZLIK MED SPOLOMA PRI KOMETNEM PRESKUSU IN VIVO**Zasnova preskusa z več dejavniki in analiza v njenem okviru**

Pri tej zasnovi se preskusi vsaj 5 živali moškega in vsaj 5 živali ženskega spola pri vsaki koncentraciji, tako da se uporabi vsaj 40 živali (20 moškega in 20 ženskega spola ter ustrezne pozitivne kontrole).

Ta zasnova, ki je ena enostavnejših zasnov preskusa z več dejavniki, je enakovredna dvosmerni analizi variance, pri čemer sta glavna učinka spol in koncentracija. Podatki se lahko analizirajo z različnimi standardnimi statističnimi programskimi paketi, kot so SPSS, SAS, STATA, Genstat, ter z uporabo programskega jezika R.

Z analizo se variabilnost v naboru podatkov popolnoma razvrsti v variabilnost med spoloma, variabilnost med koncentracijami in variabilnost, povezano z medsebojnim vplivom med spoloma in koncentracijami. Vsak pogoj se preskusi glede na oceno variabilnosti med živalmi iz ponovljenih preskusov v skupinah živali istega spola pri isti koncentraciji. Celotne podrobnosti osnovne metodologije so na voljo v številnih standardnih statističnih učbenikih (glej vire) in pomoči uporabnikom, ki jo zagotavljajo statistični paketi.

Analiza se začne s pregledom pogojev medsebojnega vpliva „spol x koncentracija“ v preglednici z analizo variance⁽¹⁾. Če ni precejšnjega medsebojnega vpliva, zagotavljajo skupne vrednosti za spola ali koncentracije veljavne statistične preskuse med koncentracijami, ki temeljijo na združenem vplivu variabilnosti znotraj skupine v preglednici z analizo variance.

Analiza se nadaljuje s popolno razvrstitvijo ocene med variabilnostjo koncentracij v kontraste, s čimer se zagotovi preskus za linearne in kvadratne kontraste odzivov med različnimi koncentracijami. Če „spol x koncentracija“ kaže znaten medsebojni vpliv, se lahko ta vpliv popolnoma razvrsti v medsebojne vplive „linearni kontrast x spol“ in „kvadratni kontrast x spol“. S temi vplivi se zagotavljajo preskusi tega, ali so odzivi na koncentracije za oba spola vzporedni ali pa so odzivi med spoloma različni.

Ocena združene variabilnosti znotraj skupine se lahko uporabi za pare preskusov v zvezi z razlikami med srednjimi vrednostmi. Te primerjave se lahko naredijo med srednjimi vrednostmi za oba spola in med srednjimi vrednostmi za različne koncentracije, kot na primer za primerjave s stopnjami v negativnih kontrolah. V primerih z znatnim medsebojnim vplivom se lahko primerjajo srednje vrednosti različnih koncentracij pri istem spolu ali srednje vrednosti obeh spolov pri isti koncentraciji.

Viri

Obstajajo številni statistični učbeniki, v katerih se razpravlja o teoriji, zasnovi, metodologiji, analizi in razlagi zasnove preskusov z več dejavniki, ki se gibljejo od najenostavnejših analiz z dvema dejavnikoma do bolj zapletenih oblik, uporabljenih v metodologiji zasnove poskusov. Naslednji seznam ni izčrpen. V nekaterih knjigah so obdelani primeri primerljivih zasnov, ki imajo v nekaterih primerih kodo za izvajanje analize z uporabo različnih programskih paketov.

- (1) Box, G. E. P, Hunter, W. G. in Hunter, J. S. (1978). *Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*. New York: John Wiley & Sons.
- (2) Box, G. E. P. in Draper, N. R. (1987). *Empirical model-building and response surfaces*. John Wiley & Sons Inc.
- (3) Doncaster, C. P. in Davey, A. J. H. (2007). *Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences*. Cambridge University Press.

⁽¹⁾ Statistiki, ki uporabljajo pristop modeliranja, kot so splošni linearni modeli, lahko analizo začnejo na drugačen, a primerljiv način, vendar ne bodo nujno izpeljali običajne preglednice z analizo variance, ki sega v čas algoritemskih pristopov k izračunavanju statističnih podatkov, razvitih v predračunalniški dobi.

- (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 & Hamada, M. S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.
-

Dodatek 3

TRENUTNE OMEJITVE PRESKUSA

V okviru trenutnega znanja je s kometnim preskusom *in vivo* povezanih več omejitev. Te omejitve naj bi se zmanjšale ali ožje opredelile na podlagi vedno več izkušenj z uporabo preskusa za reševanje varnostnih vprašanj v regulativnem okviru.

1. Nekatere vrste poškodb DNK so lahko kratkotrajne, tj. se morda popravijo prehitro, da bi jih bilo mogoče opaziti v 24 urah ali več po zadnjem odmerku. Ne obstaja znan seznam vrst kratkotrajnih poškodb ali kemikalij, ki verjetno povzročajo to vrsto poškodbe, niti ni znano, v kakšnem časovnem obdobju je to vrsto poškodbe mogoče zaznati. Optimalni čas vzorčenja je lahko odvisen tudi specifičen za kemikalijo ali način dajanja in ga je treba določiti na podlagi kinetičnih podatkov (na primer čas T_{max} , ob katerem je dosežena najvišja koncentracija v plazmi ali tkivu), če so taki podatki na voljo. Večina validacijskih študij, ki podpirajo to preskusno metodo, je določilo nekropsijo 2 ali 3 ure po zadnjem odmerku. Večina študij v objavljenih virih opisuje dajanje zadnjega odmerka od 2 do 6 ur pred žrtvovanjem. Te izkušnje so bile torej uporabljene kot podlaga za priporočilo za preskusno metodo, in sicer da je treba zadnji odmerek dati ob določenem času med 2 in 6 urami pred nekropsijo, če ni podatkov, ki bi priporočali drugačen postopek.
2. Ni znanih podatkov študij, ki bi proučile občutljivost preskusa za zaznavanje kratkotrajnih poškodb DNK po dajanju odmerka s hrano ali pitno vodo v primerjavi z dajanjem odmerka z gavažo. Poškodbe DNK so bile ugotovljene po dajanju odmerka s hrano in pitno vodo, je pa sorazmerno malo takih poročil v primerjavi z veliko več izkušnjami z dajanjem odmerka z gavažo in intraperitonealno injekcijo. Zato je občutljivost preskusa morda manjša za kemikalije, ki povzročijo kratkotrajne poškodbe in se dajejo s hrano ali pitno vodo.
3. Medlaboratorijske študije so bile izvedene samo na jetrih in želodcu, na drugih tkivih pa ne, zato niso opredeljena nobena priporočila o tem, kako doseči občutljiv in ponovljiv odziv na drugih tkivih, ne samo na jetrih, kot so na primer pričakovana območja pozitivne in negativne kontrole. Za jetra tudi ni bilo mogoče doseči soglasja o opredelitvi spodnje meje za vrednost negativne kontrole.
4. Čeprav je zavajajoč učinek citotoksičnosti *in vitro* predstavljen v več publikacijah, je zelo malo objavljenih podatkov *in vivo*, zato ni bilo mogoče priporočiti nobenega merila za citotoksičnost. S povečano migracijo DNK so povezane histopatološke spremembe, kot so vnetje, infiltracija celic, apoptozne ali nekrotične spremembe, toda, kot je razvidno iz validacijskega preskusa JaCVAM (OECD 2014), te spremembe ne pomenijo vedno pozitivnih ugotovitev pri kometnem preskusu, zato ni na voljo nobenega dokončnega seznama histopatoloških sprememb, ki so vedno povezane s povečano migracijo DNK. Celice „hedgehog“ (ali „ježi“, oblaki, fantomske celice) so že bili predlagani kot kazalnik citotoksičnosti, vendar je etiologija teh celic negotova. Po nekaterih podatkih jih lahko povzroči citotoksičnost, povezana s kemikalijo, poškodbe zaradi mehanskih ali encimskih postopkov, ki so nastale med pripravo vzorca (Guerard idr., 2014), in/ali bolj skrajni učinek genotoksičnosti preskusne kemikalije. Drugi podatki pa naj bi kazali, da nastanejo zaradi močnih, vendar morda popravljivih, poškodb DNK (Lorenzo idr. 2013).
5. Tkiva ali jedra celic so bila uspešno zamrznjena za poznejšo analizo. To običajno omogoči merljiv učinek na odziv na vehikel in pozitivno kontrolo (Recio idr., 2010; Recio at al., 2012; Jackson at al., 2013). Pri uporabi zamrznitve mora laboratorij dokazati usposobljenost za metodologije zamrzovanja ter potrditi sprejemljiva nizka območja odstotka DNK v repu v ciljnih tkivih živali, tretiranih z vehiklom, in dokazati, da je pozitivne odzive še vedno mogoče zaznati. V virih je opisana zamrznitev tkiv z uporabo različnih metod. Vendar trenutno ni soglasja o tem, kako je najbolje zamrzniti in odtaliti tkiva ter kako oceniti, ali lahko morebiten spremenjen odziv vpliva na občutljivost preskusa.
6. Nedavna raziskovanja kažejo, da naj bi se seznam ključnih spremenljivk še naprej krajšal, parametri ključnih spremenljivk pa natančneje opredelili (Guerard idr. 2014).

Viri

- (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*, zv. 55/2, str. 114–21.
- (2) Jackson, P. idr. (2013). Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, zv. 28/6, str. 699–707.
- (3) Lorenzo, Y. idr. (2013). **The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead**, *Mutagenesis*, zv. 28/4, str. 427–32.
- (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*, Series on Testing and Assessment, št. 195 in 196, OECD Publishing, Pariz.
- (5) Recio L., Hobbs C., Caspary W., Witt K. L. (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*, Vol. 53/2, pp. 101-13.“

(16) V delu C se poglavje C.13 nadomesti z naslednjim:

„C.13 Bioakumulacija v ribah: vodna in prehranska izpostavljenost

UVOD

Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD (TG) 305 (2012). Glavni cilj te revizije preskusne metode zajema dva vidika. Kot prvo je njen namen zajeti preskus prehranske bioakumulacije ⁽¹⁾, ki je primeren za določanje bioakumulacijskega potenciala snovi z zelo nizko topnostjo v vodi. Kot drugo pa je njen namen oblikovati preskusno metodo, ki, kadar je to ustrezno, uporablja manj rib zaradi dobrobiti živali in je bolj stroškovno učinkovita.

V letih po sprejetju enotne preskusne metode C.13 (1) so bile preskušene številne snovi, laboratoriji in regulativni organi pa so pridobili mnoge izkušnje. Na podlagi tega se je oblikovalo prepričanje, da se lahko kompleksnost preskusa zmanjša, če so izpolnjena določena merila (prim. odstavek 88), in da je mogoč stopenjski pristop. Izkušnje tudi kažejo, da lahko biološki dejavniki, kot sta rast in vsebnost lipidov v ribah, močno vplivajo na rezultate in da jih je morda treba upoštevati. Poleg tega je bilo ugotovljeno, da preskušanje zelo slabo topnih snovi v vodi morda ni tehnično izvedljivo. Za snovi z zelo nizko topnostjo v vodi v vodnem okolju ima morda izpostavljenost prek vode tudi omejen pomen v primerjavi s prehransko izpostavljenostjo. Na podlagi tega se je oblikovala preskusna metoda, pri kateri so ribe izpostavljene prek njihove hrane (prim. odstavki 7–14 in od 97 naprej). Validacija (krožni preskus) preskusa prehranske izpostavljenosti je bila izvedena leta 2010 (51).

Glavne spremembe zajemajo:

- preskušanje samo ene preskusne koncentracije se obravnava kot zadostno, če je biokoncentracijski faktor (BKF) najverjetneje neodvisen od preskusne koncentracije;
- minimiziran načrt preskusa vodne izpostavljenosti, pri katerem je mogoče manjše število vzorčnih točk, če so izpolnjena določena merila;

⁽¹⁾ Za opredelitev pojmov in enote glej Dodatek 1.

- vsebnost lipidov v ribah bi bilo treba izmeriti tako, da se lahko BKF izrazi na podlagi 5-odstotne vsebnosti lipidov;
- večji poudarek na oceni kinetičnega BKF (kadar je to mogoče) poleg ocene stacionarnega BKF;
- kadar se preskus prehranske izpostavljenosti obravnava kot ustreznejši od preskusa vodne izpostavljenosti, se predlaga za določene skupine snovi;
- izmeriti je treba težo ribe, zato da se lahko BKF_k popravi glede na razredčitev zaradi rasti.

Pred izvedbo kakršnih koli bioakumulacijskih preskusov morajo biti znane naslednje informacije o preskusni snovi:

- (a) občutljivost analitske tehnike za merjenje koncentracij preskusne snovi in morebitnih metabolitov v tkivu, vodi in hrani (prim. odstavek 65);
- (b) topnost v vodi [TM A.6; (2)]; topnost v vodi je treba določiti v skladu z metodo, ki je ustrezna za (ocenjeno) območje topnosti, da se pridobi zanesljiva vrednost. Za hidrofobne snovi je to običajno metoda z izpiranjem kolone;
- (c) porazdelitveni koeficient n-oktanol/voda, K_{ow} ⁽¹⁾ [TM A.8 (4), A.24 (5), A.23 (6)]; ali druge ustrezne informacije o porazdelitvenem vedenju (npr. sorpcija na lipide, K_{oc}); treba jih je določiti v skladu z metodo, ki je ustrezna za (ocenjeno) območje K_{ow} , da se pridobi zanesljiva vrednost. Za hidrofobne snovi je to običajno metoda počasnega mešanja [TM A.23 (6)];
- (d) obstojnost snovi v vodi (hidroliza [TM C.7 (7)]);
- (e) obstojnost snovi v hrani (zlasti, kadar se izbere pristop s preskusom prehranske izpostavljenosti);
- (f) informacije o fototransformaciji, ki so pomembne za pogoje obsevanja pri preskusu (8);
- (g) površinska napetost (tj. za snovi, za katere ni mogoče določiti $\log K_{ow}$) [TM A.5 (9)];
- (h) parni tlak [TM A.4 (10)];
- (i) kakršne koli informacije o biotski ali abiotski razgradnji v vodi, med drugim na primer o lahki biološki razgradljivosti [TM C.4, deli od II do VII (11), C.29 (12)], kadar je to ustrezno;
- (j) informacije o metabolitih: struktura, $\log K_{ow}$, nastajanje in razgradljivost, kadar je to ustrezno;
- (k) disociacijska konstanta kisline (pK_a) za snovi, ki lahko ionizirajo. Po potrebi je treba prilagoditi pH preskusne vode, da se zagotovi, da je snov v preskusu v neionizirani obliki, če je to združljivo z vrsto rib.

Neodvisno od izbrane metode izpostavljenosti ali sheme vzorčenja ta preskusna metoda opisuje postopek za opredelitev lastnosti bioakumulacijskega potenciala snovi v ribah. Čeprav so najbolj zaželeni režimi pretočnega preskusa, se lahko uporabljajo tudi sistemi polstatičnega preskusa, če so izpolnjena merila za veljavnost (prim. odstavka 24 in 113). Pri načinu prehranske izpostavljenosti za ohranjanje koncentracij preskušane snovi v vodi ni potreben pretočni sistem, vendar slednji pomaga ohraniti ustrezne koncentracije raztopljenega kisika ter zagotoviti čisto vodo in odstraniti različne vplive, npr. produktov izločanja.

⁽¹⁾ Včasih označena s P_{ow} ; določena z metodo stresanja bučke v TM A.8 (4), metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) v TM A.24 (5) in metodo počasnega mešanja v TM A.23 (6). Za določanje $\log K_{ow}$ se občasno uporablja tehnika generator-kolona. Na voljo je omejeno število študij, ki uporabljajo to tehniko, predvsem za klorirane bifenile in dibenzodioksine (npr. Li in Doucette, 1993) (3). Za snovi, ki lahko ionizirajo, se mora $\log K_{ow}$ nanašati na neionizirano obliko.

Neodvisno od izbrane preskusne metode je za to preskusno metodo zagotovljenih dovolj podrobnosti za izvajanje preskusa, hkrati pa ostaja dovolj svobode pri prilagajanju načrta preskusa pogojem v določenih laboratorijih in različnim lastnostim preskusnih snovi. Preskus vodne izpostavljenosti je najustrezneje uporabiti za obstojne organske snovi z vrednostmi $\log K_{OW}$ med 1,5 in 6,0 (13), vendar se lahko še vedno uporabi za močno hidrofobne snovi (z vrednostjo $\log K_{OW} > 6,0$), če je mogoče dokazati obstojno in povsem raztopljeno koncentracijo preskusne snovi v vodi. Če ni mogoče dokazati obstojne koncentracije preskusne snovi v vodi, študija vodne izpostavljenosti ni primerna, zato je za preskušanje snovi pri ribah treba uporabiti prehranski pristop (čeprav je razlaga in uporaba rezultatov prehranskega preskusa morda odvisna od regulativnega okvira). Predhodne ocene biokoncentracijskega faktorja (BKF, ki je včasih označen z K_B) za organske snovi z vrednostmi $\log K_{OW}$ do približno 9,0 je mogoče dobiti z uporabo enačbe iz Bintein idr. (14). Predhodna ocena biokoncentracijskega faktorja za tako močno hidrofobne snovi je morda višja od vrednosti stacionarnega biokoncentracijskega faktorja (BKF_{SS}), ki se pričakuje v laboratorijskih preskusih, zlasti ko se za predhodno oceno uporabi preprost linearni model. Parametri, ki opredeljujejo bioakumulacijski potencial, zajemajo konstanto hitrosti absorpcije (k_1), konstante hitrosti izgube, vključno s konstanto hitrosti očiščenja (k_2), stacionarni biokoncentracijski faktor (BKF_{SS}), kinetični biokoncentracijski faktor (BKF_K) in prehranski biomagnifikacijski faktor (BMF) ⁽¹⁾.

Izotopsko označene preskusne snovi lahko pospešijo analizo vodnih, prehranskih in ribjih vzorcev ter se uporabijo pri odločitvi, ali je treba identificirati in količinsko opredeliti metabolite. Pri merjenju skupnih radioaktivnih ostankov (npr. s sežigom ali solubilizacijo tkiva) temeljita BKF in BMF na skupni vrednosti matične snovi, morebitnih ohranjenih metabolitov in tudi asimiliranega ogljika. Vrednosti BKF in BMF, ki temeljijo na skupnih radioaktivnih ostankih, torej morda niso neposredno primerljive z vrednostmi BKF in BMF, ki so izpeljane z določeno kemijsko analizo zgolj matične snovi. Pred analizo v študijah izotopsko označenih spojin se lahko uporabijo postopki ločevanja, kot so TLC, HPLC ali GC ⁽²⁾, da se določi BKF ali BMF glede na matično snov. Kadar se uporabijo tehnike ločevanja, je treba identificirati ter količinsko opredeliti matično snov in ustrezne metabolite ⁽³⁾ (prim. odstavek 65), če naj bi BKF ali BMF temeljil na koncentraciji matične snovi v ribah, ne pa na skupnih izotopsko označenih ostankih. Študija bioakumulacije se lahko tudi združi s študijo metabolizma rib ali študijo porazdelitve *in vivo* z analizo in identifikacijo ostankov v tkivih. Možnost metabolizma se lahko predvidi z ustreznimi orodji (npr. orodje QSAR OECD (15) in lastniški programi QSAR).

Odločitev o tem, ali naj se izvede preskus vodne ali prehranske izpostavljenosti in kakšen naj bo načrt, mora temeljiti na dejavnikih iz odstavka 3 ob upoštevanju ustreznega regulativnega okvira. Na primer za snovi, ki imajo visoko vrednost $\log K_{OW}$, ampak še vedno kažejo precejšnjo topnost v vodi glede na občutljivost razpoložljivih analitskih tehnik, je treba najprej obravnavati preskus vodne izpostavljenosti. Vendar je mogoče, da informacije o topnosti v vodi niso dokončne za te hidrofobne vrste snovi, zato je treba proučiti možnost priprave obstojnih, merljivih, raztopljenih koncentracij v vodi (obstojne emulzije niso dovoljene), ki se lahko uporabijo za študijo vodne izpostavljenosti, preden se sprejme odločitev o tem, katero preskusno metodo uporabiti (16). Ni mogoče zagotoviti točnih predpisanih smernic o metodi, ki naj se uporabi glede na topnost v vodi in merila za mejno vrednost porazdelitvenega koeficienta n-oktanol/voda, saj lahko imajo drugi dejavniki (analitske tehnike, razgradnja, adsorpcija itd.) opazen vpliv na uporabnost metode zaradi zgoraj opisanih razlogov. Vendar vrednosti $\log K_{OW}$ nad 5 in topnost v vodi pod ~0,01–0,1 mg/l označujejo območje snovi, pri katerih lahko postane preskušanje prek vodne izpostavljenosti vedno težje.

Upoštevati je treba tudi druge dejavnike, ki lahko vplivajo na izbiro preskusa, vključno s potencialom snovi za adsorpcijo v preskusne posode in opremo ter njeno obstojnostjo v vodni raztopini v primerjavi z njeno obstojnostjo v ribji hrani (17), (18) itd.

⁽¹⁾ Za opredelitev pojmov in enote glej Dodatek 1.

⁽²⁾ TLC: tankoplastna kromatografija; HPLC: visokotlačna tekočinska kromatografija; GC: plinska kromatografija.

⁽³⁾ V nekaterih regulativnih okvirih je analiza metabolitov morda obvezna, kadar so izpolnjeni določeni pogoji (prim. odstavek 65).

Informacije o takih praktičnih vidikih so morda na voljo v drugih zaključenih študijah vodne izpostavljenosti. Nadaljnje informacije o vrednotenju vidikov v zvezi z učinkovitostjo bioakumulacijskih študij so na voljo v virih (npr. (19)).

Za snovi, pri katerih topnost ali ohranjanje koncentracije v vodi in analiza teh koncentracij ne predstavljata nobenih omejitev za izvedbo metode vodne izpostavljenosti, se priporoča ta metoda za določanje biokoncentracijskega potenciala snovi. V vsakem primeru je treba preveriti, da so koncentracije vodne izpostavljenosti, ki bodo uporabljene, v območju topnosti v vodi v preskusnih medijih. Uporabijo se lahko različne metode za ohranjanje obstojnih koncentracij raztopljene preskusne snovi, na primer uporaba osnovnih raztopin ali sistemov pasivnega odmerjanja (npr. metoda z izpiranjem kolone), če se lahko dokaže, da se lahko ohranijo obstojne koncentracije in da preskusni mediji niso drugačni od teh, priporočenih v odstavku 27.

Za močno hidrofobne snovi ($\log K_{ow} > 5$ in topnost pod $\sim 0,01\text{--}0,1$ mg/l) lahko postane preskušanje prek vodne izpostavljenosti vedno težje. Razlogi za omejitve lahko zajemajo to, da se koncentracija v vodi ne more ohranjati na ravni, ki se šteje za dovolj konstantno (npr. zaradi sorpcije v steklo posode za izpostavljenost ali hitra absorpcija v ribe), ali da so koncentracije v vodi, ki bodo uporabljene, tako nizke, da so v istem območju ali pod analitsko mejo določljivosti ⁽¹⁾. Za te močno hidrofobne snovi se priporoča prehranski preskus, če je ta preskus skladen z ustreznim regulativnim okvirom in potrebami po oceni tveganja.

Pri površinsko aktivnih snoveh je treba obravnavati, ali je preskus vodne biokoncentracije izvedljiv glede na lastnosti snovi, v nasprotnem primeru je verjetno primernejša prehranska študija. Površinsko aktivne snovi so snovi, aktivne na površini, ki znižujejo medploskovno napetost med dvema tekočinama. Zaradi njihove amfifilne narave (tj. imajo hidrofilni in hidrofobni del) se kopičijo na mejnih ploskvah, kot so mejna ploskev med vodo in zrakom, mejna ploskev med vodo in hrano ter steklena stena, kar ovira določanje njihove koncentracije v vodi.

Prehranski preskus lahko zaobide nekatere vidike izpostavljenosti za kompleksne zmesi s sestavinami, ki imajo različne meje topnosti v vodi, saj je primerljiva izpostavljenost vsem sestavinam zmesi verjetnejša kot pri vodni metodi (prim. (20)).

Opozoriti je treba, da se s prehranskim pristopom dobi prehranski biomagnifikacijski faktor (BMF), ne pa biokoncentracijski faktor (BKF) ⁽²⁾. Na voljo so pristopi za ocenjevanje kinetičnega biokoncentracijskega faktorja (BKF_k) na podlagi podatkov, dobljenih v prehranski študiji (kot je opisano v Dodatku 8, ampak te pristope je treba uporabljati previdno). Na splošno ti pristopi sledijo kinetiki prvega reda in se lahko uporabijo samo za določene skupine spojin. Teh pristopov verjetno ni mogoče uporabiti za površinsko aktivne snovi (glej odstavek 12).

Minimiziran načrt preskusa vodne izpostavljenosti z manjšim številom vzorčnih točk, da se zmanjša število živali in/ali virov (prim. od odstavka 83 naprej), se lahko uporabi samo za tiste snovi, za katere se lahko upravičeno pričakuje, da bosta absorpcija in očiščenje približno sledili kinetiki prvega reda (tj. na splošno neionizirane organske snovi, prim. odstavek 88).

⁽¹⁾ Na splošno bi izmerjene koncentracije v vodi med fazo absorpcije morale biti vsaj en red velikosti nad mejo določljivosti, zato da se lahko med fazo očiščenja v študiji lahko izmeri več razpolovnih dob obremenitve telesa.

⁽²⁾ Za opredelitev pojmov in enote glej Dodatek 1.

C.13 – I: Preskus vodne izpostavljenosti za ugotavljanje biokonzentracije v ribah

NAČELO PRESKUSA

Preskus zajema dve fazi: faza izpostavljenosti (absorpcija) in faza po izpostavljenosti (očiščenje). Med fazo absorpcije je skupina rib ene vrste izpostavljena preskusni snovi pri eni ali več izbranih koncentracijah, kar je odvisno od lastnosti preskusne snovi (prim. odstavek 49). Skupina rib se nato za fazo očiščenja prenese v medij, ki ne vsebuje preskusne snovi. Faza očiščenja je vedno potrebna, razen če je absorpcija snovi med fazo absorpcije zanemarljiva. Koncentracija preskusne snovi v/na ribah (ali določenih tkivih rib) se spremlja v obeh fazah preskusa. Poleg izpostavljene skupine se goji kontrolna skupina rib pod enakimi pogoji, le da ti ne vključujejo preskusne snovi, s čimer se morebitni neželeni učinki, opaženi med biokonzentracijskim preskusom, primerjajo z ustrezno kontrolno skupino, pridobijo pa se tudi koncentracije preskusne snovi v ozadju ⁽¹⁾.

Pri preskusu vodne izpostavljenosti se faza absorpcije običajno izvaja 28 dni. Trajanje se lahko po potrebi podaljša (prim. odstavek 18) ali skrajša, če se dokaže, da je bilo stacionarno stanje doseženo prej (za opredelitev pojmov in enote glej Dodatek 1). Trajanje faze absorpcije in čas, ki je potreben, da se doseže stacionarno stanje, se lahko predvidi z enačbami iz Dodatka 5. Faza očiščenja se nato začne, ko ribe niso več izpostavljene preskusni snovi, tako da se jih prenese v isti medij, vendar v čisto posodo brez preskusne snovi. Kadar je to mogoče, se biokonzentracijski faktor izračuna po možnosti kot razmerje koncentracije v ribah (C_f) in v vodi (C_w) v stacionarnem stanju (BKF_{SS} ; glej Dodatek 1, opredelitev pojmov) in kot kinetični biokonzentracijski faktor (BKF_K ; za opredelitev pojmov in enote glej Dodatek 1), ki se oceni kot razmerje konstante hitrosti absorpcije (k_1) in očiščenja (k_2), ki sledita kinetiki prvega reda ⁽²⁾.

Če se stacionarno stanje ne doseže v 28 dneh, se izračuna BKF na podlagi kinetičnega pristopa (prim. odstavek 38), lahko pa se podaljša faza absorpcije. Če bi to pomenilo nepraktično dolgo fazo absorpcije, da se doseže stacionarno stanje (prim. odstavka 37 in 38, Dodatek 5), se priporoča kinetični pristop. Za močno hidrofobne snovi pa je treba obravnavati izvedbo prehranske študije ⁽³⁾, če je prehranski preskus skladen z ustreznim regulativnim okvirom.

Konstanta hitrosti absorpcije, konstanta hitrosti očiščenja (izgube) (ali konstante, kadar se uporabijo kompleksnejši modeli), biokonzentracijski faktor (stacionarni in/ali kinetični) in, kadar je to mogoče, meje zaupanja za vsakega od teh parametrov se izračunajo na podlagi modela, ki najbolje opisuje izmerjene koncentracije preskusne snovi v ribah in vodi (prim. Dodatek 5).

Povečanje mase rib med preskusom povzroči zmanjšanje koncentracije preskusne snovi v rastočih ribah (ki se imenuje razredčitev zaradi rasti), zato je kinetični BKF prenizko ocenjen, če se ga ne popravi na podlagi rasti (prim. odstavka 72 in 73).

BKF temelji na skupni koncentraciji v ribi (tj. na celotno mokro težo ribe). Vendar se za posebne namene lahko uporabijo določena tkiva ali organi (npr. mišice, jetra), če so ribe dovolj velike, ali pa se ribe razdelijo na užitne (fileji) in neužitne (drobovje) dele. Ker za mnoge organske snovi velja jasna povezava med potencialom za biokonzentracijo in hidrofobnost, obstaja tudi ustrezno razmerje med vsebnostjo lipidov v preskusnih ribah in ugotovljeno biokonzentracijo takih snovi. Da bi se zmanjšal ta vir variabilnosti v rezultatih preskusa za te snovi z visoko lipofilnostjo (tj. z vrednostjo $\log K_{ow} > 3$), je treba biokonzentracijo izraziti kot normalizirano na ribo s 5-odstotno vsebnostjo lipidov (glede na celotno mokro težo telesa) poleg te, ki se izpelje neposredno iz študije. To je potrebno, da se zagotovi podlaga, na podlagi katere se lahko primerjajo rezultati za različne snovi in/ali preskusne vrste. Pogosto se uporablja 5-odstotna vsebnost lipidov, saj predstavlja povprečno vsebnost lipidov v ribah, ki se običajno uporabljajo pri tej preskusni metodi (21).

⁽¹⁾ Večine preskusnih snovi se načeloma ne sme zaznati v kontrolni vodi. Koncentracije ozadja bi morale biti pomembne samo za naravno prisotne materiale (npr. nekatere kovine) in snovi, ki so splošno prisotne v okolju.

⁽²⁾ Če kinetika prvega reda očitno ni upoštevana, je treba uporabiti kompleksnejše modele (glej vire v Dodatku 5) in poiskati nasvet biostatistika.

⁽³⁾ Absorpcija je lahko omejena pri nizkih koncentracijah izpostavljenosti zaradi nizke topnosti v vodi pri preskusu biokonzentracije, pri prehranskem preskusu pa se lahko dosežejo veliko višje koncentracije izpostavljenosti.

INFORMACIJE O PRESKUSNI SNOVI

Poleg lastnosti preskusne snovi, navedene v uvodu (odstavek 3), so zahtevane tudi informacije o toksičnosti za vrsto rib, ki bo uporabljena v preskusu, po možnosti asimptotični LC_{50} (tj. neodvisen od časa) in/ali toksičnost, ki je bila ocenjena v dolgotrajnih preskusih pri ribah (npr. TM C.47 (22), C.15 (23), C.14 (24)).

Na voljo mora biti ustrezna analitska metoda z znano točnostjo, natančnostjo in občutljivostjo, saj mora biti na voljo količinska opredelitev snovi v preskusnih raztopinah in biološkem materialu ter podrobnosti o pripravi in shranjevanju vzorca. Ravno tako mora biti znana analitska meja določljivosti preskusne snovi v vodi in ribjih tkivih. Kadar se uporabi izotopsko označena preskusna snov, mora ta imeti najvišjo čistost (npr. po možnosti > 98 %), in znan mora biti odstotek radioaktivnosti, povezan z nečistočami.

VELJAVNOST PRESKUSA

Za veljavnost preskusa morajo biti izpolnjeni naslednji pogoji:

sprememba temperature mora znašati manj kot ± 2 °C, saj lahko velika odstopanja vplivajo na biološke parametre, ki so pomembni za absorpcijo in očiščenje, ter povzročajo stres pri živalih;

koncentracija raztopljenega kisika ne sme pasti pod 60 % nasičenosti;

koncentracija preskusne snovi v komorah se ohranja v območju ± 20 % povprečja izmerjenih vrednosti med fazo absorpcije;

koncentracija preskusne snovi je pod mejo topnosti v vodi, pri čemer se upošteva učinek, ki ga lahko ima preskusna voda na dejansko topnost ⁽¹⁾;

smrtnost ali drugi neželeni učinki/bolezni pri kontrolnih in tretiranih ribah znašajo ob koncu preskusa manj kot 10 %; kadar preskus traja več tednov ali mesecev, morajo smrtnost ali drugi neželeni učinki v obeh skupinah rib znašati manj kot 5 % na mesec in skupno ne smejo presegati 30 %. Precejšnje razlike v povprečni rasti med preskusnimi in kontrolnimi skupinami vzorčenih rib so lahko pokazatelj toksičnega učinka preskusne snovi.

REFERENČNE SNOVI

Uporaba referenčnih snovi z znanim biokoncentracijskim potencialom in nizkim metabolizmom bi bila uporabna za preverjanje preskusnega postopka, kadar je to zahtevano (npr. ko laboratorij nima predhodnih izkušenj s preskusom ali so bili spremenjeni preskusni pogoji).

OPIS METODE

Oprema

Za vse dele opreme se je treba izogniti uporabi materialov, ki se lahko raztopijo, sorbirajo ali lužijo in imajo neželen učinek na ribe. Uporabijo se lahko standardni pravokotni ali valjasti bazeni iz kemično inertnega materiala in ustrezne prostornine, ki je v skladu s stopnjo obremenitve (prim. odstavek 43). Čim manj je treba uporabljati cevni material iz mehke plastike. Uporabiti je treba cevni material iz politetrafluoroetilena, nerjavnega jekla in/ali stekla. Na podlagi izkušenj je za preskusne snovi z visokim koeficientom adsorpcije, na primer sintetične piretroide, morda treba uporabiti silanizirano steklo. V takih primerih je treba opremo po uporabi zavreči. Priporočeno je, da se preskusne sisteme izpostavi koncentracijam preskusne snovi, ki bodo uporabljene v študiji, za tako dolgo, kot je potrebno, da se dokaže ohranjanje obstojnih koncentracij izpostavljenosti, preden se doda preskusne organizme.

⁽¹⁾ Za snovi z več sestavinami, UVCB in zmesi je treba upoštevati topnost v vodi vsake ustrezne sestavine, da se določijo ustrezne koncentracije izpostavljenosti.

Voda

Za preskus se običajno uporablja naravna voda, ki mora biti pridobljena iz neonesnaženega vira enotne kakovosti. Morda pa je primernejša modelna razredčevalna voda (tj. demineralizirana voda, ki so ji dodana določena hranila v znanih količinah), da se zagotovi enotna kakovost v daljšem časovnem obdobju. Voda za redčenje oziroma voda, ki je zmešana s preskusno snovjo, preden je dodana v preskusno posodo (*prim.* odstavek 30), mora biti take kakovosti, ki omogoči preživetje izbrane vrste rib ves čas trajanja aklimatizacije in preskušanja, ne da bi pri tem ta vrsta neobičajno spremenila videz ali vedenje. Načeloma je treba dokazati, da lahko preskusne vrste preživijo, rastejo in se razmnožujejo v vodi za redčenje (npr. v laboratorijski kulturi ali preskusu strupenosti življenjskega cikla). Voda za redčenje mora biti opredeljena vsaj s pH, trdoto, vsemi snovmi v trdem stanju in skupnim organskim ogljikom (TOC ⁽¹⁾), če je mogoče, pa tudi z amonijem, nitritom in alkalnostjo ter slanostjo za morske vrste. Parametri, ki so pomembni za optimalno počutje rib, niso povsem znani, vendar so v Dodatku 2 navedene priporočene najvišje koncentracije številnih parametrov za sladko in morsko preskusno vodo.

Voda za redčenje mora biti ves čas preskusa enake kakovosti. Vrednost pH mora biti ob začetku preskusa v območju 6,0 do 8,5, med danim preskusom pa mora biti v območju $\pm 0,5$ pH enot. Za zagotovitev, da voda za redčenje ne bi neprimerno vplivala na rezultat preskusa (na primer s kompleksiranjem preskusne snovi) ali imela neželen učinek na vedenje staleža rib, je treba v časovnih intervalih vzeti vzorce za analizo, vsaj na začetku in koncu preskusa. Določiti je treba težke kovine (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd in Ni), glavne anione in katione (npr. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- in SO_4^{2-}), pesticide (npr. skupni organofosforni in skupni organoklorini pesticidi), skupni organski ogljik in suspendirane trdne snovi, na primer vsake tri mesece, kadar se ve, da je voda za redčenje razmeroma konstantne kakovosti. Če se dokaže, da je bila kakovost vode za redčenje konstantna vsaj eno leto, se lahko analize izvajajo manj pogosto, časovni intervali pa se lahko podaljšajo (npr. vsakih šest mesecev).

Vsebnost naravnih delcev in skupni organski ogljik vode za redčenje morata biti čim nižja, da se prepreči adsorpcija preskusne snovi na organsko snov, saj lahko to zmanjša njeno biološko dostopnost, to pa lahko pomeni prenizko oceno BKF. Najvišja sprejemljiva vrednost je 5 mg/l za delce (suha snov, ki jo zadrži 0,45 μm filter) in 2 mg/l za skupni organski ogljik (*prim.* Dodatek 2). Voda za redčenje se mora po potrebi pred uporabi filtrirati. Preskusne ribe (izločki) in ostanki hrane morajo čim manj prispevati k vsebnosti organskega ogljika v preskusni vodi (*prim.* odstavek 46).

Preskusne raztopine

Pripravi se osnovna raztopina preskusne snovi z ustrešno koncentracijo. Po možnosti je treba osnovno raztopino pripraviti s preprostim mešanjem ali stresanjem preskusne snovi v vodi za redčenje. V nekaterih primerih je morda ustrezno uporabiti drugo možnost, in sicer sistem odmerjanja za desorpcijo iz trdne faze. Na splošno se ne priporoča uporaba topil in disperzijskih sredstev (sredstev za raztapljanje) (*prim.* (25)); uporaba teh materialov pa je morda sprejemljiva, da se pridobi osnovna raztopina z ustrešno koncentracijo, vendar si je treba čim bolj prizadevati, da se taki materiali uporabljajo čim manj in da se ne preseže njihova kritična koncentracija tvorbe micel (kadar je to ustrezno). Topila, ki se lahko uporabijo, so aceton, etanol, metanol, dimetilformamid in trietilen glikol; disperzijska sredstva, ki so se uporabila, so Tween 80, metilceluloza 0,01 % in HCO-40. Koncentracija topila v končnem preskusnem mediju mora biti enaka v vseh tretiranjih (tj. neodvisno od koncentracije preskusne snovi) in ne sme presegati ustreznih pragov toksičnosti, ki so bili določeni za topilo v preskusnih pogojih. Najvišja raven je koncentracija, ki znaša 100 mg/l (ali 0,1 ml/l). Koncentracija topila, ki znaša 100 mg/l, verjetno ne bo zelo spremenila najvišje raztopljenosti koncentracije preskusne snovi, ki jo je mogoče doseči v mediju (25). Znano mora biti, koliko prispeva topilo (skupaj s preskusno snovjo) k skupni vsebnosti organskega ogljika v preskusni vodi. Koncentracija skupnega organskega ogljika v preskusnih posodah ves čas preskusa ne sme preseči koncentracije

⁽¹⁾ TOC vključuje organski ogljik iz delcev in raztopljeni organski ogljik, tj. $\text{TOC} = \text{POC} + \text{DOC}$.

organskega ogljika, ki izvira iz preskusne snovi, ter topila ali sredstva za raztapljanje ⁽¹⁾, kadar se uporabi, za več kot 10 mg/l (\pm 20 %). Vsebnost organske snovi lahko precej vpliva na količino prosto raztopljene preskusne snovi med pretočnimi preskusi na ribah, zlasti za zelo lipofilne snovi. Mikroekstrakcija na trdni fazi (prim. odstavek 60) lahko zagotovi pomembne informacije o razmerju med vezanimi in prosto raztopljenimi spojinami, slednje pa naj bi predstavljale biološko dostopen del. Koncentracija preskusne snovi mora biti pod mejo topnosti preskusne snovi v preskusnih medijih kljub uporabi topila ali sredstva za raztapljanje. Ob uporabi lahko biorazgradljivih topil je treba biti previden, saj lahko povzročijo težave z rastjo bakterij v pretočnih preskusih. Če ni mogoče pripraviti osnovne raztopine brez uporabe sredstva za raztapljanje, je treba obravnavati ustreznost študije vodne izpostavljenosti v primerjavi s študijo prehranske izpostavljenosti.

Za pretočne preskuse je potreben sistem, ki neprestano dovaja in redči osnovno raztopino preskusne snovi (npr. metrična črpalka, proporcionalni razredčevalnik, nasičevalnik), ali sistem odmerjanja za desorpcijo iz trdne faze, da se lahko dovajajo preskusne koncentracije v preskusne komore. Po možnosti se mora v vsaki preskusni komori zamenjati vsaj pet prostornin na dan. Priporočena je pretočna metoda, kadar pa to ni mogoče (npr. ko obstajajo neželeni učinki na preskusne organizme), se lahko uporabi polstatična tehnika, če so izpolnjena merila za veljavnost (prim. odstavek 24). Hitrost pretoka osnovnih raztopin in vode za redčenje je treba preveriti 48 ur pred preskusom in nato vsak dan med preskusom. V to preverjanje je treba zajeti določanje hitrosti pretoka skozi vsako preskusno komoro in zagotoviti, da se ne spreminja za več kot 20 % v komori ali med njimi.

Izbira vrst

Pomembna merila za izbiro vrst so, da so lahko dostopne, da so na razpolago v primernih velikostih in da se lahko ustrezno gojijo v laboratoriju. Druga merila za izbiro rib vključujejo rekreacijsko, komercialno in ekološko pomembnost ter primerljivo občutljivost, preteklo uspešno uporabo itd. Priporočene preskusne vrste so navedene v Dodatku 3. Uporabijo se lahko tudi druge vrste, vendar je morda treba prilagoditi preskusni postopek, da se zagotovijo ustrezni preskusni pogoji. V tem primeru je treba utemeljiti izbiro vrste in preskusne metode. Na splošno uporaba manjših vrst rib skrajša čas za doseganje stacionarnega stanja, ampak je verjetno potrebnih več rib (vzorcev), da se ustrezno analizira vsebnost lipidov in koncentracij preskusne snovi v ribah. Poleg tega lahko razlike v hitrosti dihanja in metabolizmu med mladimi in starejšimi ribami ovirajo primerjave rezultatov med različnimi preskusi in preskusnimi vrstami. Opozoriti je treba, da lahko vrste rib, preskušene med življenjskim ciklom s hitro rastjo (mlade ribe), otežijo razlago podatkov.

Vzdrževanje rib (pomembno za vodno in prehransko izpostavljenost)

Populacija staleža rib se mora vsaj dva tedna aklimatizirati v vodi (prim. odstavek 28) pri preskusni temperaturi in ves čas ji je treba zagotavljati zadostno hrano (prim. odstavek 45). Voda in hrana morata biti iste vrste kot tisti, ki bosta uporabljeni med preskusom.

Po 48 urah prilagajanja se zabeleži smrtnost in uporabijo se naslednja merila:

- smrtnost, ki v sedmih dneh preseže 10 % populacije: zavrne se celotna serija;
- smrtnost, ki v sedmih dneh znaša od 5 do 10 % populacije: serija se mora aklimatizirati dodatnih sedem dni in če je v drugih sedmih dneh smrtnost večja od 5 %, se zavrne celotna serija;
- smrtnost, ki v sedmih dneh znaša manj kot 5 % populacije: serija se sprejme.

Ribe, uporabljene v preskusih, morajo biti brez vidnih bolezni in anomalij. Vse bolne ribe je treba zavreči. Ribe v dveh tednih pred preskusom ali med poskusom ne smejo biti zdravljene zaradi bolezni.

⁽¹⁾ Čeprav to na splošno ni priporočeno, je ob uporabi topila ali sredstva za raztapljanje treba dodati organski ogljik, ki izvira iz tega sredstva, k organskemu ogljiku iz preskusne snovi, da se oceni koncentracija organskega ogljika v preskusnih posodah.

IZVEDBA PRESKUSA

Predhodni preskus

Morda je uporabno izvesti predhodni poskus, da se optimizirajo preskusni pogoji dokončnega preskusa, npr. izbira koncentracij preskusne snovi ter trajanje faze absorpcije in očiščenja, ali da se določi, ali je treba izvesti popoln preskus. Načrt predhodnega preskusa mora biti tak, da se pridobijo zahtevane informacije. Obravnava se lahko, ali bo za izračun BKF morda zadoščal minimiziran preskus ali pa bo potrebna popolna študija (prim. odstavke 83–95 o minimiziranem preskusu).

Pogoji izpostavljenosti*Trajanje faze absorpcije*

Trajanje faze absorpcije je mogoče napovedati na podlagi praktičnih izkušenj (npr. iz pretekle študije ali študije akumulacije o strukturno sorodni snovi) ali določenih empiričnih razmerij, ki temeljijo na znanju o topnosti v vodi ali porazdelitvenem koeficientu n-oktanol/voda preskusne snovi (pod pogojem, da absorpcija sledi kinetiki prvega reda, prim. Dodatek 5).

Fazo absorpcije je treba izvajati 28 dni, razen če se lahko dokaže, da je bilo stacionarno stanje doseženo že prej (za opredelitev pojmov in enote glej Dodatek 1). Stacionarno stanje je doseženo v grafičnem prikazu preskusne snovi v ribah (C_f) v odvisnosti od časa, ko krivulja postane vzporedna s časovno osjo in so tri zaporedne analize C_f na vzorcih, vzetih v intervalu najmanj dveh dni, v območju $\pm 20\%$ druga od druge ter ni precejšnjega povečanja C_f v času med prvo in zadnjo zaporedno analizo. Pri analiziranju združenih vzorcev so potrebne najmanj štiri zaporedne analize. Za preskusne snovi, ki se absorbirajo počasi, so primernejši sedemdnevni intervali. Če stacionarno stanje ni bilo doseženo v 28 dneh, se izračuna BKF s kinetičnim pristopom, ki ni odvisen od doseganja stacionarnega stanja, ali pa se podaljša faza absorpcije in opravlja nadaljnje meritve, dokler ni doseženo stacionarno stanje ali 60 dni, kar koli od tega je krajše. Koncentracija preskusne snovi v ribah ob koncu faze absorpcije mora tudi biti dovolj visoka, da se zagotovi zanesljiva ocena k_2 iz faze očiščenja. Če se po 28 dneh ne pokaže znatna absorpcija, se lahko preskus ustavi.

Trajanje faze očiščenja

Za snovi, ki sledijo kinetiki prvega reda, je polovica obdobja trajanja faze absorpcije običajno dovolj za ustrezno (npr. 95 %) zmanjšanje v obremenitvi telesa za snov (prim. Dodatek 5 za razlago ocene). Če je čas, ki je potreben, da se doseže 95 % izgube, nepraktično dolg in na primer dvakrat daljši od normalnega trajanja faze absorpcije (tj. več kot 56 dni), se lahko uporabi krajše obdobje (npr. kadar koncentracija preskusne snovi znaša manj kot 10 % koncentracije v stacionarnem stanju). Za snovi z bolj zapletenimi vzorci absorpcije in očiščenja, kot jih predstavlja enodelni model za ribe, ki zagotavlja kinetiko prvega reda, pa bodo morda potrebne daljše faze očiščenja. Če se opazijo in/ali predvidevajo taki zapleteni vzorci, se priporoča, da se poišče nasvet biostatistika in/ali farmakokinetika, da se zagotovi ustrezen načrt preskusa. Če se čas očiščenja podaljša, je lahko na voljo manjše število rib za vzorčenje, razlike v rasti med ribami pa lahko vplivajo na rezultate. Na to obdobje lahko vpliva tudi obdobje, v katerem koncentracija preskusne snovi v ribah ostane nad analitsko mejo določljivosti.

Število preskusnih rib

Število rib na preskusno koncentracijo je treba izbrati tako, da so za vsako vzorčno točko na voljo najmanj štiri ribe. RIBE se lahko združi samo, če analiza posameznih rib ni izvedljiva. Če se namerava pridobiti višja natančnost pri prilagajanju krivulje (in izpeljanih parametroh) ali če so potrebne študije o metabolizmu (npr. za razlikovanje med metaboliti in matično snovjo pri uporabi izotopsko označenih preskusnih snovi), je potrebnih več rib na vzorčno točko. Vsebnost lipidov je treba določiti na istem biološkem materialu, kot se uporablja za določanje koncentracije preskusne snovi. Če to ni izvedljivo, bodo mora potrebne dodatne ribe (prim. odstavka 56 in 57).

Če se uporabijo odrasle (tj. spolno zrele) ribe, ne smejo biti v stanju drstenja ali nedavno po drstitvi (tj. so se že drstile) pred ali med preskusom. V poročilu je treba tudi navesti, ali so bili v preskusu uporabljeni ribji samci ali samice ali oboji. Če se uporabita oba spola, je treba pred začetkom izpostavljenosti zabeležiti, da so razlike v rasti in vsebnosti lipidov med spoloma zanemarljive, zlasti če se predvideva, da bo treba združiti ribje samce in samice, da se zagotovijo zaznavne koncentracije snovi in/ali vsebnost lipidov.

Za kateri koli preskus se izberejo ribe podobne teže, tako da najmanjše niso manjše od dveh tretjin teže največjih. Vse morajo biti vzgojene v istem letu in prihajati iz istega vira. Ker lahko teža in starost ribe precej vplivata na vrednosti BKF (12), je treba te podrobnosti točno zabeležiti. Priporočeno je, da se malo pred preskusom stehta podvzorec staleža rib, da se oceni povprečna teža (prim. odstavek 61).

Obremenitev

Uporabiti je treba visoka razmerja med vodo in ribami, da se čim bolj zmanjša upadanje koncentracije preskusne spojine v vodi zaradi dodajanja rib na začetku preskusa in da se prepreči zmanjšanje koncentracij raztopljenega kisika. Pomembno je, da stopnja obremenitve ustreza uporabljenim preskusnim vrstam. V vsakem primeru se običajno priporoča stopnja obremenitve med vodo in ribami, ki znaša 0,1–1,0 g rib (mokra teža) na liter vode na dan. Visoke stopnje obremenitve med vodo in ribami se lahko uporabijo, če se pokaže, da se zahtevana koncentracija preskusne snovi lahko ohranja v območju ± 20 % mejnih vrednosti, in da koncentracija raztopljenega kisika ne pade pod 60 % nasičenosti (prim. odstavek 24).

Pri izbiri ustreznih režimov obremenitve je treba upoštevati naravni habitat vrste rib. Na primer ribe, ki živijo pri dnu, morda zahtevajo več prostora na dnu akvarija pri enaki prostornini vode v primerjavi z vrstami pelagičnih rib.

Hranjenje

Med aklimatizacijo in preskušanjem se ribe hranijo z ustrežno hrano, ki ima znano vsebnost lipidov in skupnih proteinov, v zadostnih količinah, ki zagotavljajo zdravo stanje in ohranjanje telesne teže (nekaj rasti je dovoljene). Ribe se med prilagajanjem in preskušanjem hranijo vsakodnevno in z vnaprej določeno količino hrane glede na uporabljeno vrsto, preskusne pogoje in kalorično vrednost hrane (na primer za šarenko približno 1 do 2 % telesne teže na dan). Stopnjo hranjenja je treba izbrati tako, da se prepreči hitra rast in veliko povečanje vsebnosti lipidov. Da se ohrani enaka stopnja hranjenja, je treba količino hrane po potrebi znova ustrezno izračunati, na primer enkrat na teden. Za ta izračun se lahko teža rib v vsaki preskusni komori oceni glede na težo ribe, ki je bila nazadnje vzorčena v tej komori. Ribe, ki ostanejo v komori, se ne tehtajo.

Ostanki hrane in iztrebki se iz preskusnih komor izčrpajo vsak dan kmalu po hranjenju (v 30 minutah do ene ure). Posode morajo biti ves čas preskusa čim bolj čiste, da ostane koncentracija organskih snovi čim nižja (prim. odstavek 29), saj lahko prisotnost organskega ogljika omeji biološko dostopnost preskusne snovi (12).

Ker veliko hrane temelji na ribji moki, je treba zagotoviti, da hrana ne bo vplivala na rezultate preskusa ali povzročila neželenih učinkov, npr. ker vsebuje (sledove) pesticidov, težkih kovin in/ali same preskusne snovi.

Svetloba in temperatura

Priporoča se obdobje osvetljenosti od 12 do 16 ur in temperatura (± 2 °C) mora biti ustrezna za preskusno vrsto (prim. Dodatek 3). Vrsta in lastnosti svetlobe morajo biti znane. Paziti je treba na morebitno fototransformacijo preskusne snovi pod obsevalnimi pogoji študije. Uporabiti je treba ustrezno svetlobo, da se prepreči izpostavljenost rib nenaravnim fotoproduktom. V nekaterih primerih je morda ustrezno uporabiti filter, da se zaustavi obsevanje UV pod 290 nm.

Preskusne koncentracije

Preskus je bil izvorno zasnovan za nepolarne organske snovi. Za to vrsto snovi se pričakuje, da je dovolj izpostavljenost rib eni koncentraciji, saj niso pričakovani nobeni učinki koncentracije, čeprav sta morda zahtevani dve koncentraciji zaradi ustreznega regulativnega okvira. Če se preskušajo snovi, ki ne sodijo v to področje, ali so znane druge indikacije morebitne odvisnosti od koncentracije, je treba izvesti preskus z dvema ali več koncentracijami. Če se preskuša samo ena koncentracija, je treba utemeljiti uporabo ene koncentracije (prim. odstavek 79). Preskusna koncentracija mora biti tako nizka, kot je praktično ali tehnično izvedljivo (tj. ne preblizu meje topnosti).

V nekaterih primerih se lahko predvideva, da je biokoncentracija snovi odvisna od koncentracije vode (npr. za kovine, pri katerih se lahko absorpcija v ribe vsaj delno regulira). V takem primeru je potrebno, da se preskusita vsaj dve, po možnosti pa več koncentracij (prim. odstavek 49), ki so ustrezne za okolje. Tudi za snovi, pri katerih morajo biti preskušene koncentracije blizu meje topnosti zaradi praktičnih razlogov, se priporoča preskušanje vsaj dveh koncentracij, saj lahko to zagotovi razumevanje zanesljivosti koncentracij izpostavljenosti. Izbira preskusnih koncentracij mora zajeti koncentracijo, ki je realna za okolje, in koncentracijo, ki je pomembna za namen določene ocene.

Koncentracije preskusne snovi je treba izbrati tako, da so pod njeno ravnijsko kroničnega učinka ali 1 % akutnega asimptotičnega LC_{50} , v območju, ki je ustrezen za okolje, in vsaj en red velikosti nad njeno mejo določljivosti v vodi z uporabljeno analitsko metodo. Največja dovoljena preskusna koncentracija se lahko določi tudi z deljenjem akutnega 96-urnega LC_{50} z ustreznim akutnim/kroničnim razmerjem (npr. ustreznost razmerja za nekatere snovi so približno tri, nekaj pa jih je nad 100). Če se uporabi druga koncentracija, mora biti za desetkratnik drugačna od navedene. Če to ni mogoče zaradi merila toksičnosti (ki omejuje zgornjo preskusno koncentracijo) in analitske meje (ki omejuje spodnjo preskusno koncentracijo), se lahko uporabi manjši faktor od deset in treba je obravnavati uporabo izotopsko označene preskusne snovi (z najvišjo čistostjo, npr. po možnosti > 98 %). Zagotoviti je treba, da nobena uporabljena koncentracija ni nad mejo topnosti preskusne snovi v preskusnih medijih.

Kontrole

Poleg preskusne serije je treba izvesti eno kontrolo z vodo za redčenje ali, če je ustrezno (prim. odstavka 30 in 31), eno kontrolo s topilom.

Pogostost meritev kakovosti vode

Med preskusom je treba meriti raztopljeni kisik, TOC, pH in temperaturo v vseh preskusnih in kontrolnih posodah. Skupna trdota in slanost (če je ustrezno) se morata meriti v kontrolah in eni posodi. Če se preskušata ena dve več koncentracij, se ti parametri merijo pri višji (ali najvišji) koncentraciji. Raztopljeni kisik in slanost (če je ustrezno) se morata meriti najmanj trikrat – na začetku, približno na sredini in na koncu faze absorpcije – in enkrat tedensko v fazi očiščenja. TOC je treba izmeriti na začetku preskusa (24 in 48 ur pred začetkom faze absorpcije v preskusu), preden se dodajo ribe, in najmanj enkrat tedensko med fazo absorpcije in očiščenja. Temperaturo je treba meriti in beležiti vsak dan, pH na začetku in koncu vsake faze, trdoto pa enkrat na preskus. Temperaturo je treba po možnosti neprestano nadzirati v vsaj eni posodi.

Vzorčenje ter analiza rib in vode

Časovni razpored vzorčenja rib in vode

Vodo je treba vzorčiti iz preskusnih komor, da se določi koncentracija preskusne snovi, preden se dodajo ribe ter med fazo absorpcije in očiščenja. Vodo je treba vzorčiti pred hranjenjem, ob istem času kot se vzorči ribe. Morda je uporabno pogostejše vzorčenje, da se zagotovijo stacionarne koncentracije po dodajanju rib. Med fazo absorpcije je treba določiti koncentracije preskusne snovi, da se preveri skladnost z merili za veljavnost (odstavek 24). Če se z analizami vzorcev vode na začetku faze očiščenja ne zazna preskusne snovi, se to lahko uporabi kot utemeljitev, zakaj se v preostali fazi očiščenja ne bodo opravile meritve preskusne in kontrolne vode za preskusno snov.

Ribe je treba za preskusno snov vzorčiti vsaj petkrat med fazo absorpcije in vsaj štirikrat med fazo očiščenja. Ker je v nekaterih primerih na podlagi tega števila vzorcev (zlasti če ni nakazana preprosta kinetika absorpcije in očiščenja prvega reda) težko izračunati ustrezno natančno oceno vrednosti BKF, je morda priporočljivo v obeh fazah odvzeti vzorce pogosteje (prim. Dodatek 4).

Vsebnost lipidov je treba določiti na istem biološkem materialu, kakršen se uporablja za določanje koncentracije preskusne snovi, vsaj na začetku in koncu faze absorpcije ter ob koncu faze očiščenja. Če to ni izvedljivo, je treba vzorčiti vsaj tri neodvisne ribe, da se določi vsebnost lipidov v vsaki od istih treh časovnih točk. Ustrezno je treba prilagoditi število rib na bazen na začetku preskusa ⁽¹⁾. Če pa se v kontrolnih ribah (tj. ribah iz populacije staleža) ne zaznajo znatne količine preskusne snovi, se lahko analizira kontrolne ribe iz preskusa samo za vsebnost lipidov, analizo preskusne snovi v preskusnih skupinah (in z njo povezane konstanto hitrosti absorpcije, konstanto hitrosti očiščenja in vrednosti BKF) pa se lahko popravi glede na spremembe v skladu z vsebnostjo lipidov v kontrolni skupini med preskusom ⁽²⁾.

Mrtve ali bolne ribe se ne smejo analizirati glede koncentracije preskusne snovi ali lipidov.

Primer sprejemljivega časovnega razporeda vzorčenja je naveden v Dodatku 4. Drugi režimi se lahko preprosto izračunajo z drugimi predvidenimi vrednostmi K_{ow} , da se izračuna čas izpostavljenosti za 95-odstotno absorpcijo (glej Dodatek 5 za izračune).

Vzorčenje je treba nadaljevati med fazo absorpcije, dokler se ne vzpostavi stacionarno stanje (za opredelitev pojmov in enote glej Dodatek 1) ali dokler se drugače ne konča faza absorpcije (po 28 ali 60 dneh, prim. odstavek 37 in 38). Pred začetkom faze očiščenja je treba ribe prenesti v čiste posode.

Vzorčenje in priprava vzorcev

Pridobiti je treba vzorce vode za analizo, na primer tako da se voda prek inertnega cevne materiala izčrpa iz središčne točke preskusne posode. Filtriranje in centrifugiranje ne ločita vedno biološko nedostopnega dela preskusne snovi od tega, ki je biološko dostopen. Če se uporabi tehnika ločevanja, je treba zaradi težav z biološko dostopnostjo v poročilu o preskusu vedno zagotoviti utemeljitev ali validacijo tehnike ločevanja (25). Vzorci pa se ne smejo tako tretirati zlasti v primeru močno hidrofobnih snovi (tj. snovi, ki imajo $\log K_{ow} > 5$) (12), (26), pri katerih lahko pride do adsorpcije na matriko filtra ali centrifugirne posode. Namesto tega je treba zagotoviti, da so bazeni čim bolj čisti (prim. odstavek 46), vsebnost skupnega organskega ogljika pa je treba spremljati v fazi absorpcije in očiščenja (prim. odstavek 53). Da se preprečijo morebitne težave z manjšo biološko dostopnostjo, se lahko za slabo topne in močno hidrofobne snovi uporabi vzorčenje na podlagi tehnik mikroekstrakcije na trdni fazi.

⁽¹⁾ Če se vsebnost lipidov ne analizira na istih ribah kot preskusna snov, morajo ribe imeti vsaj podobno težo in (če je to pomembno) biti istega spola.

⁽²⁾ Ta možnost se lahko uporabi samo, če se ribe v vseh preskusnih skupinah gojijo v podobnih velikostih skupin, če so odstranjene po istem vzorcu in hranjene na enak način. To zagotovi, da je rast rib v vseh preskusnih skupinah podobna, če je preskušana koncentracija pod mejo območja toksičnosti. Če je rast podobna, se pričakuje, da bo podobna tudi vsebnost lipidov. Drugačna rast v kontrolni skupini bi kazala na učinek snovi, zaradi česar bi se študija razveljavila.

Vzorčene ribe je treba takoj evtanazirati z najustreznejšo in najbolj humano metodo (za meritve celih rib se ne smejo opravljati nobeni nadaljnji postopki razen spiranja z vodo (prim. odstavek 28) in sušenja ribe s pivnikom). Izmeriti je treba težo in skupno dolžino ⁽¹⁾. Za vsako posamezno ribo je treba izmerjeno težo in dolžino povezati z analizirano koncentracijo snovi (in vsebnostjo lipidov, kadar je to ustrezno), na primer z uporabo edinstvene identifikacijske kode za vsako vzorčeno ribo.

Ribe in vodo je po možnosti treba analizirati takoj po vzorčenju, da se prepreči razgradnja ali druge izgube ter da se med izvajanjem preskusa izračunata približni konstanti hitrosti absorpcije in očiščenja. S takojšnjo analizo se preprečijo tudi zamude pri določanju, kdaj je bilo doseženo stacionarno stanje.

Če se analiza ne izvede takoj, je treba vzorce shraniti na ustrezen način. Pred začetkom študije je treba pridobiti informacije o pravilni metodi shranjevanja za določeno preskusno snov, na primer globoka zamrznitev, shranjevanje pri 4 °C, ekstrakcija itd. Trajanje shranjevanja je treba izbrati tako, da se zagotovi, da se snov med shranjevanjem ne razgradi.

Kakovost analitske metode

Ker so za celoten postopek pomembne predvsem točnost, natančnost in občutljivost analitske metode, uporabljene za preskusno snov, je treba preveriti s preskušanjem, da so natančnost, točnost in obnovljivost analize snovi ter izkoristek preskusne snovi iz vode in rib zadovoljivi za določeno metodo. To mora biti del predhodnih preskusov. Preveriti je treba tudi, da preskusne snovi ni mogoče zaznati v vodi za redčenje. Vrednosti koncentracij preskusne snovi v vodi in ribah, ki so bile pridobljene s preskusi za izkoristke in vrednosti ozadja za kontrole, je treba po potrebi popraviti. Z vzorci rib in vode je treba ves čas ravnati tako, da se čim bolj zmanjša onesnaženost in izguba (npr. zaradi adsorpcije na napravo za vzorčenje).

Analiza vzorcev rib

Če se v preskusu uporabljajo izotopsko označeni materiali, se lahko analizira skupni izotopski označevalec (tj. matična snov in metaboliti) ali pa se vzorci očistijo, zato da se lahko matična snov analizira ločeno. Če naj bi BKF temeljil na matični snovi, je treba opredeliti glavne metabolite vsaj ob koncu faze absorpcije (prim. odstavek 6). Glavni metaboliti so tisti, ki predstavljajo ≥ 10 % skupnih ostankov v ribjih tkivih, tisti, ki predstavljajo ≥ 5 % v dveh zaporednih točkah vzorčenja, tisti, ki kažejo rastoče ravni med celotno fazo absorpcije, in tisti z znanim toksikološkim učinkom. Če BKF za celo ribo v smislu skupnih izotopsko označenih ostankov znaša ≥ 500 , je morda dobro, za določene kategorije snovi, kot so pesticidi, pa močno priporočljivo, identificirati in količinsko opredeliti glavne metabolite. Nekateri regulativni organi morda zahtevajo količinsko opredelitev takih metabolitov. Če so identificirani in količinsko opredeljeni razkrojki, ki predstavljajo > 10 % skupnih izotopsko označenih ostankov v ribjem tkivu, je nato tudi priporočljivo, da se identificirajo in količinsko opredelijo razkrojki v preskusni vodi. Če to ni izvedljivo, je to treba pojasniti v poročilu.

Koncentracijo preskusne snovi je treba običajno določiti za vsako posamezno stehtano ribo. Če to ni mogoče, se lahko združi vzorce ob vsakem vzorčenju, vendar združevanje omeji statistične postopke, ki se lahko uporabijo za podatke, zato je treba v preskus vključiti ustrezno število rib, da bodo izpolnjeni pogoji za zeleno združevanje, statistični postopek in moč. Vira (27) in (28) se lahko uporabita kot uvod v ustrezne postopke združevanja.

⁽¹⁾ Poleg teže je treba zabeležiti skupno dolžino, saj je primerjava obsega povečanja dolžine med preskusom dober pokazatelj tega, ali je prišlo do neželenega učinka.

BKF je treba izraziti kot normaliziranega na ribo s 5-odstotno vsebnostjo lipidov (na podlagi mokre teže) poleg tega, ki se izpelje neposredno iz študije (prim. odstavek 21), razen če je mogoče utemeljiti, da se preskusna snov primarno ne kopiči v lipidih. Vsebnost lipidov v ribi je treba določiti ob vsakem vzorčenju, če je to mogoče, po možnosti na istem ekstraktu, kot je ta, ki je bila pridobljen za analizo preskusne snovi, saj je treba lipide pogosto odstraniti iz ekstrakta, preden ga je mogoče analizirati s kromatografijo. Vendar analiza preskusnih snovi pogosto zahteva določene postopke ekstrakcije, ki so lahko v nasprotju s preskusnimi metodami za določanje lipidov. V tem primeru (dokler ni na voljo ustreznih nedestruktivnih instrumentalnih metod) je priporočeno, da se uporabi drugačna strategija za določanje vsebnosti lipidov v ribah (prim. odstavek 56). Za določanje vsebnosti lipidov je treba uporabiti ustrezne metode (20). Kot standardna metoda (30) se lahko priporoča tehnika ekstrakcije z mešanico kloroform-metanol (29), kot druga možnost pa se priporoča Smedesova metoda (31). Značilnosti slednje metode so primerljiva učinkovitost ekstrakcije, visoka točnost, uporaba manj toksičnih organskih topil in preprosta izvedba. Uporabijo se lahko druge metode, če je njihova točnost primerljiva s to iz priporočenih metod in so ustrezno utemeljene. Pomembno je navesti podrobnosti o uporabljeni metodi.

Meritve rasti rib

Na začetku preskusa je treba stehtati od pet do deset posameznih rib iz populacije staleža in izmeriti njihovo skupno dolžino. To so lahko iste ribe, ki se uporabijo za analizo lipidov (prim. odstavek 56). Težo in dolžino rib, ki bodo uporabljene za vsako vzorčenje iz preskusne in kontrolne skupine, je treba izmeriti pred izvedbo analize kemikalij ali lipidov. Meritve teh vzorčenih rib se lahko uporabijo za oceno teže in dolžine preostalih rib v preskusnem in kontrolnem bazenu (prim. odstavek 45).

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

Krivuljo absorpcije preskusne snovi je treba pridobiti tako, da se njena koncentracija v/na ribi (ali določenih tkivih) v fazi absorpcije grafično prikaže v odvisnosti od časa na aritmetični lestvici. Če krivulja doseže stacionarno stanje, torej če postane približno asimptotična na časovno premico, se stacionarni BKF (BKF_{ss}) izračuna na podlagi enačbe:

$$\frac{C_f \text{ stacionarno stanje (povpr.)}}{C_w \text{ stacionarno stanje (povpr.)}}$$

Rast rib lahko vpliva na potek C_f (prim. odstavka 72 in 73). Povprečna koncentracija izpostavljenosti (C_w) se spreminja s časom. Pričakuje se lahko, da je tehtano povprečje koncentracije v določenem časovnem intervalu ustrežnejše in natančnejše za bioakumulacijske študije, tudi če so spremembe v ustreznem območju veljavnosti (prim. odstavek 24). Tehtano povprečje koncentracije vode v določenem časovnem intervalu (TWA, time weighted average) se lahko izračuna z enačbami iz Dodatka 5, oddelek 1.

Kinetični biokoncentracijski faktor (BKF_K) se določi kot razmerje k_1/k_2 med dvema konstantama hitrosti kinetike prvega reda. Konstanti hitrosti k_1 in k_2 ter BKF_K se lahko izpeljejo s hkratnim prilagajanjem faz absorpcije in očiščenja. Konstanti k_1 in k_2 pa se lahko določita tudi zaporedno (glej Dodatek 5 za opis in primerjavo teh metod). Konstanto hitrosti očiščenja (k_2) je morda treba prilagoditi glede na razredčitev zaradi rasti (prim. odstavka 72 in 73). Če krivulja absorpcije in/ali očiščenja očitno ni krivulja prvega reda, je treba uporabiti kompleksnejše modele (glej vire v Dodatku 5) ter poiskati nasvet biostatistika in/ali farmakokinetika.

Podatki o teži/dolžini rib

Mokra teža in skupna dolžina posameznih rib za vsa vzorčenja se predstavita v preglednici ločeno za preskusno in kontrolno skupino med fazo absorpcije (vključno s populacijo staleža na začetku absorpcije) in očiščenja. Za vsako posamezno ribo je treba izmerjeno težo in dolžino povezati z analizirano koncentracijo kemikalije, na primer z uporabo edinstvene identifikacijske kode za vsako vzorčeno ribo. Po možnosti se teža uporabi kot merilo za rast za namene popravljanja vrednosti kinetičnega BKF glede na razredčitev zaradi rasti (glej odstavek 73 in Dodatek 5 za metodo, ki se uporabi za popravljanje podatkov glede na razredčitev zaradi rasti).

Popravki glede na razredčitev zaradi rasti in normalizacija lipidov

Rast rib med fazo očiščenja lahko zniža izmerjene koncentracije kemikalije v ribah, kar pomeni, da je skupna konstanta hitrosti očiščenja (k_2) višja, kot pa bi bila samo na podlagi procesov odstranjevanja (npr. dihanje, metabolizem, izločanje). Kinetične biokoncentracijske faktorje je treba popraviti glede na razredčitev zaradi rasti. Rast vpliva tudi na BKF_{SS}, toda na voljo ni nobenega dogovorjenega postopka za popravljanje BKF_{SS} glede na rast. V primerih precejšnje rasti je treba izpeljati tudi BKF_K, popravljen glede na rast (BKF_{Kg}), saj je morda ustrežnejše merilo biokoncentracijskega faktorja. Vsebnost lipidov v preskusnih ribah (ki so tesno povezani z bioakumulacijo hidrofobnih snovi) je lahko v praksi dovolj različna, da jo je treba normalizirati na vnaprej določeno vsebnost lipidov v ribah (5 %, masni delež), da se smiselno predstavita kinetični in stacionarni biokoncentracijski faktor, razen če je mogoče utemeljiti, da se preskusna snov primarno ne kopiči v lipidih (npr. nekatere perfluorirane snovi se lahko vežejo na proteine). Enačbe in primeri teh izračunov so opisani v Dodatku 5.

Da se popravi kinetični BKF glede na razredčitev zaradi rasti, je treba popraviti konstanto hitrosti očiščenja glede na rast. Ta konstanta hitrosti očiščenja, popravljena glede na rast (k_{2g}), se izračuna z odštevanjem konstante hitrosti rasti (k_g , pridobljene iz izmerjenih podatkov o teži) od skupne konstante hitrosti očiščenja (k_2). Kinetični biokoncentracijski faktor, popravljen glede na rast, se nato izračuna tako, da se konstanta hitrosti absorpcije (k_1) deli s konstanto hitrosti očiščenja, popravljeno glede na rast (k_{2g}) (prim. Dodatek 5). V nekaterih primerih ta pristop ni zanesljiv. Na primer za snovi, ki se očistijo zelo počasi in se preskušajo v hitro rastočih ribah, je lahko izpeljana konstanta k_{2g} zelo nizka, zato postanejo napake v dveh konstantah hitrosti, iz katerih se izpelje, ključnega pomena, v nekaterih primerih pa so lahko ocene k_g višje kot k_2 . Drug pristop, ki ne zahteva popravljanja glede na razredčitev zaradi rasti, pa zajema uporabo mase preskusne snovi na podatke o očiščenju za ribo (celo ribo) in ne običajne mase preskusne snovi na masno enoto podatkov o (koncentraciji v) ribi. Ta pristop je preprost, saj bi v preskusih, skladnih s to preskusno metodo, zabeležene koncentracije v tkivih morale biti povezane s težo posameznih rib. Preprost postopek za ta pristop je opisan v Dodatku 5. Opozoriti je treba, da je v poročilu še vedno treba navesti k_2 , čeprav je uporabljen drugi pristop.

Navesti je treba tudi kinetični in stacionarni biokoncentracijski faktor glede na privzeto vsebnost lipidov v ribah, ki znaša 5 % (masni delež), razen če je mogoče utemeljiti, da se preskusna snov primarno ne kopiči v lipidih. Podatki o koncentraciji v ribah ali BKF se normalizirajo glede na razmerje med 5-odstotno in dejansko (posamezno) povprečno vsebnostjo lipidov (v % mokre teže) (prim. Dodatek 5).

Če so bile analize kemikalije in lipidov izvedene na isti ribi, je treba uporabiti normalizirane podatke o lipidih v posamezni ribi za izračun BKF, ki je normaliziran glede na vsebnost lipidov. Če pa je rast v kontrolnih in izpostavljenih ribah podobna, se lahko za popravljanje vsebnosti lipidov uporabi samo vsebnost lipidov v kontrolnih ribah (prim. odstavek 56). Metoda za izračun BKF, normaliziranega glede na vsebnost lipidov, je opisana v Dodatku 5.

Razlaga rezultatov

Rezultate je treba razlagati previdno, kadar so izmerjene koncentracije preskusnih raztopin na ravneh, ki so blizu meje zaznavnosti analitske metode.

Povprečna rast v preskusni in kontrolni skupini načeloma ne bi smela biti bistveno drugačna, da se lahko izključijo toksični učinki. Konstanti hitrosti rasti ali krivulji rasti obeh skupin je treba primerjati z ustreznim postopkom ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Izvede se lahko t-test na konstantah hitrosti rasti, da se preskusi, ali je rast v kontrolni in preskusni skupini različna, ali F-test v primeru analize variance. F-test ali preskus razmerja verjetnosti se lahko po potrebi uporabi za pomoč pri izbiri ustreznega modela rasti (monografija OECD 54, (32)).

Jasno določeni krivulji absorpcije in očiščenja kažeta na kvalitativne podatke o biokonzentraciji. Za konstanti rasti bi moral rezultat preskusa prileganja χ^2 pokazati dobro prileganje (tj. majhen odstotek napak pri meritvah (32)) za bioakumulacijski model, zato da se lahko konstanti hitrosti obravnavata kot zanesljivi (prim. Dodatek 5). Če se uporabi več preskusnih koncentracij, morajo spremembe v konstantah absorpcije/očiščenja med preskusnimi koncentracijami znašati manj kot 20 % (¹). V nasprotnem primeru to morda kaže na odvisnost od koncentracije. Zabeležiti je treba ugotovljene znatne razlike v konstantah hitrosti absorpcije/očiščenja med uporabljenima preskusnima koncentracijama in zagotoviti možna pojasnila. Na splošno se 95-odstotna meja zaupanja BKF iz dobro načrtovanih študij približa ± 20 % izpeljanega BKF.

Če se preskusita dve ali več koncentracij, se uporabijo rezultati obeh ali vseh koncentracij, da se prouči, ali so rezultati dosledni, in pokaže, ali obstaja odvisnost od koncentracije. Če se preskusi samo ena koncentracija, da se zmanjša uporaba živali in/ali virov, je treba utemeljiti uporabo ene koncentracije.

Dobljeni BKF_{SS} je nezanesljiv, če je BKF_K znatno višji od BKF_{SS} , saj to morda kaže na to, da stacionarno stanje ni bilo doseženo ali da nista bila upoštevana postopek razredčitve zaradi rasti in postopek izgube. V primerih, ko je BKF_{SS} veliko višji od BKF_K , je treba preveriti, ali izpeljava konstant hitrosti absorpcije in očiščenja vsebuje napake ter jo ponovno ovrednotiti. Oceno BKF_K je morda mogoče izboljšati z drugačnim postopkom prilagajanja (prim. Dodatek 5).

Poročilo o preskusu

Poleg informacij o preskusni snovi iz odstavka 3 se v poročilo o preskusu vključijo naslednji podatki:

Preskusna snov:

agregatno stanje in, če je ustrezno, fizikalno-kemijske lastnosti;

- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd. (vključno z vsebnostjo organskega ogljika, če je ustrezno);
- za snovi z več sestavinami in UVCB (kemijske snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti in biološki materiali) čim boljši opis kemijske identitete posameznih sestavin in odstotek skupne mase snovi za vsako sestavino. Povzeti je treba, kako analitska metoda, uporabljena v preskusu, predstavlja merilo koncentracije snovi; opisati je treba vse analitske postopke, vključno s točnostjo metode, mejo zaznavnosti metode in mejo določljivosti.
- če gre za izotopsko označeno snov, točen položaj označenih atomov in odstotek radioaktivnosti, povezane z nečistočami;
- informacije o toksičnosti preskusne snovi za ribe (načeloma za preskusno vrsto). Toksičnost se mora navesti kot akutni 96-urni LC_{50} ter koncentracija brez opaženega škodljivega učinka (NOAEC) in najnižja koncentracija z opaženim škodljivim učinkom (LOAEC) iz študije kroničnosti (tj. preskus v zgodnjem življenjskem obdobju ali preskus celotnega življenjskega cikla, če je na voljo);
- pogoji shranjevanja preskusne kemikalije ali preskusne snovi in obstojnost preskusne kemikalije ali preskusne snovi pod pogoji shranjevanja, če je bila pred uporabo shranjena.

Preskusna vrsta:

znanstveno ime, sev, vir, morebitna predhodna obdelava, aklimatizacija, starost, spol (če je pomembno), razpon velikosti (teža in dolžina) itd.

⁽¹⁾ Na osnovi teh odstotkov se predvideva, da so analitske metode zanesljive in da je razpolovna doba < 14 dni. Če so analitske metode manj zanesljive ali je razpolovna doba (zelo) povečana, bodo te številke višje.

Preskusni pogoji:

- uporabljeni preskusni postopek (npr. pretočni ali polstatični); standardna študija ali minimiziran načrt (vključno z razlogi in utemeljitvijo);
- vrsta in značilnosti uporabljene svetlobe in obdobja osvetljenosti;
- načrt preskusa (npr. število in velikost preskusnih komor, hitrost nadomestitve vodne prostornine, stopnja obremenitve, število ponovljenih vzorcev, število rib na ponovljen vzorec, število preskusnih koncentracij, dolžina faze absorpcije in očiščenja, pogostost vzorčenja ribjih in vodnih vzorcev);
- metoda priprave osnovnih raztopin in pogostost obnavljanja (kadar se uporabi, je treba navesti topilo ter njegovo koncentracijo in prispevek k vsebnosti organskega ogljika v preskusni vodi) ali opis drugačnega sistema odmerjanja;
- nominalne preskusne koncentracije, povprečja izmerjenih vrednosti in njihovih standardnih odklonov v preskusnih posodah ter metoda in pogostost, s katerima so bili izmerjeni;
- vir vode za redčenje, opis morebitne predhodne obdelave, rezultati vseh dokazovanj sposobnosti preskusnih rib, da živijo v vodi, in značilnosti vode: pH, trdota, temperatura, koncentracija raztopljenega kisika, skupni preostali klor (če je bil izmerjen), skupni organski ogljik, suspendirane trdne snovi, slanost preskusnega medija (če je ustrezno) in vse druge opravljene meritve;
- kakovost vode v preskusnih posodah, pH, trdota, TOC, temperatura in koncentracija raztopljenega kisika; uporabljene metode in pogostost meritev;
- podrobni podatki o hranjenju, na primer vrsta hrane, vir, sestava (vsaj vsebnost lipidov in proteinov, če je mogoče), izbrana stopnja hranjenja, količina dane hrane in pogostost;
- podatki o tretiranju ribjih in vodnih vzorcev, vključno s podrobnostmi o pripravi, shranjevanju, ekstrakciji ter analitskih postopkih (in natančnost) za preskusno snov in vsebnost lipidov;
- metode, uporabljene za naključno razporeditev tretiranja in dodelitev rib v preskusne posode;
- datum dodajanja preskusnih organizmov v preskusne raztopine in trajanje preskusa;
- opis preskusa in rezultatov za določanje območja, če so na voljo.

Rezultati:

- rezultati vseh izvedenih predhodnih študij;
- smrtnost kontrolnih rib in rib v vsaki komori s preskusno snovjo ter kakršno koli ugotovljeno nenavadno vedenje;
- informacije o morebitnih ugotovljenih neželenih učinkih;
- popoln opis vseh uporabljenih postopkov kemijske analize, vključno z mejo zaznavnosti in določljivosti, variabilnostjo in izkoristkom;
- vsebnost lipidov v ribah, vključno z uporabljeno metodo, in, če je bil izpeljan, faktor normalizacije lipidov (L_n , faktor za izražanje rezultatov glede na 5-odstotno vsebnost lipidov ribah);
- v preglednici predstavljeni podatki o teži (in dolžini) rib, povezani s koncentracijami kemikalije (in vsebnostjo lipidov, kadar je ustrezno) v posameznih ribah za kontrolno in preskusno skupino (na primer z uporabo edinstvene identifikacijske kode za vsako vzorčeno ribo), ter izračuni za izpeljane konstante hitrosti rasti;
- v preglednici predstavljeni podatki o koncentraciji preskusne snovi v ribah (C_f povezani s posameznimi ribami) in vodi (C_w) (s povprečnimi vrednostmi za preskusno in kontrolno skupino, standardnim odklonom in območjem, kadar je ustrezno) za vsa vzorčenja (C_f izražen v mg/kg mokre teže celega telesa ali določenih tkiv tega telesa, npr. lipidi, in C_w v mg/l). Vrednosti C_w za kontrolno serijo (navesti je treba tudi ozadje);

- krivulje (vključno z vsemi izmerjenimi podatki), ki kažejo naslednje (če je ustrezno, se lahko koncentracije izrazijo glede na celo telo in vsebnost lipidov, normalizirano na 5 % v živali ali določenih tkivih te živali):
 - rast, tj. teža ribe v odvisnosti od časa ali teža v odvisnosti od časa, pretvorjena v naravni logaritem (vključno z izpeljano konstanto hitrosti rasti, k_g);
 - absorpcija in očiščenje preskusne snovi v ribi (na enem grafu);
 - čas, v katerem je bilo doseženo stacionarno stanje (če je bilo doseženo);
 - koncentracija v odvisnosti od časa absorpcije, pretvorjena v naravni logaritem (vključno z izpeljano konstanto hitrosti absorpcije, k_1);
 - koncentracija, pretvorjena v naravni logaritem (koncentracija ln), v odvisnosti od časa očiščenja (vključno z izpeljano konstanto hitrosti očiščenja, k_2) in
 - krivulji faz absorpcije in očiščenja, ki prikazujeta podatke in prilagojen model;
- če vizualni pregled grafičnega prikaza pokaže očitne osamelce, se lahko uporabi statistično veljaven preskus osamelcev, da se odstranijo napačne podatkovne točke in zagotovi utemeljitev za njihovo opustitev;
- stacionarni biokoncentracijski faktor (BKF_{ss}), če je (skoraj) doseženo stacionarno stanje;
- kinetični biokoncentracijski faktor (BKF_k) ter izpeljani konstanti hitrosti absorpcije in očiščenja, k_1 in k_2 , skupaj z variancami k_2 (naklon in osni odsek), če se uporabi zaporedno prilagajanje;
- meje zaupanja, standardni odklon (kot je na voljo) in metode za izračune/analizo podatkov za vsak parameter za vsako koncentracijo uporabljene preskusne snovi;
 - kakršne koli informacije o metabolitih izotopsko označene preskusne snovi in njihovem kopičenju;
 - konstante hitrosti rasti (vključno s 95-odstotnimi intervali zaupanja) in izračunana konstanta hitrosti očiščenja, popravljena glede na rast (k_{2g}), ter vrednosti razpolovne dobe in BKF (BKF_{kg});
 - kar koli nenavadnega v zvezi s preskusom, kakršno koli odstopanje od teh postopkov in vsi drugi pomembni podatki;
- preglednica s povzetimi, ustreznimi, izmerjenimi in izračunanimi podatki, kot sledi v nadaljevanju:

Konstanti hitrosti absorpcije in očiščenja snovi ter biokoncentracijski faktorji (BKF)	
k_g (konstanta hitrosti rasti; dan^{-1}):	vstavi vrednost (95-odstotni CI) ⁽¹⁾
k_1 (skupna konstanta hitrosti absorpcije; $\text{l kg}^{-1} \text{ dan}^{-1}$):	vstavi vrednost (95-odstotni CI) ⁽¹⁾
k_2 (skupna konstanta hitrosti očiščenja; dan^{-1}):	vstavi vrednost (95-odstotni CI) ⁽¹⁾
k_{2g} (konstanta hitrosti očiščenja, popravljena glede na rast; dan^{-1}):	vstavi vrednost (95-odstotni CI) ⁽¹⁾
C_f (koncentracija kemikalije v ribi v stacionarnem stanju; mg kg^{-1}):	vstavi vrednost \pm SD ⁽²⁾
C_w (koncentracija kemikalije v vodi; mg l^{-1}):	vstavi vrednost \pm SD ⁽²⁾
L_n (faktor normalizacije lipidov):	vstavi vrednost ⁽³⁾

Konstanti hitrosti absorpcije in očiščenja snovi ter biokoncentracijski faktorji (BKF)	
BKF _{SS} (stacionarni BKF; l kg ⁻¹)	vstavi vrednost ± SD ⁽²⁾
BKF _{SSL} (stacionarni BKF, normaliziran glede na lipide; l kg ⁻¹):	vstavi vrednost ⁽³⁾ ±SD ⁽²⁾
BKF _K (kinetični BKF; l kg ⁻¹)	vstavi vrednost (95-odstotni CI) ⁽¹⁾
BKF _{Kg} (kinetični BKF, popravljen glede na rast; l kg ⁻¹)	vstavi vrednost (95-odstotni CI) ⁽¹⁾
t _{1/2g} (razpolovna doba, popravljena glede na rast; dan):	vstavi vrednost (95-odstotni CI) ⁽¹⁾
BKF _{KL} (kinetični BKF, normaliziran glede na vsebnost lipidov; l kg ⁻¹):	vstavi vrednost
BKF _{KLg} (kinetični BKF, popravljen glede na rast in normaliziran glede na vsebnost lipidov; l kg ⁻¹):	vstavi vrednost

⁽¹⁾ CI (confidence interval): interval zaupanja (kadar ga je mogoče oceniti)
⁽²⁾ SD (standard deviation): standardni odklon (kadar ga je mogoče oceniti)

Preprečiti je treba rezultate, ki so v poročilu navedeni kot „ni zaznano/količinsko opredeljeno na meji zaznavnosti/določljivosti“ pri razvoju metode in načrta preskusa pred preskusom, saj takih rezultatov ni mogoče uporabiti za izračune konstant hitrosti.

C.13 – II: Minimiziran preskus vodne izpostavljenosti rib

UVOD

Vedno več izkušenj, ki so jih laboratoriji in regulativni organi pridobili z izvedbo in razlago popolnega preskusa, kaže, da se za oceno konstant hitrosti absorpcije in očiščenja uporablja kinetika prvega reda, razen za nekatere izjeme. Zato se lahko konstanti hitrosti absorpcije in očiščenja ocenita s čim manjšim številom točk vzorčenja ter izpelje kinetični BKF.

Proučevanje drugačnih načrtov za študije BKF je bilo najprej namenjeno razvoju kratkega preskusa, ki bi bil uporabljen kot vmesni korak preskušanja, da se potrdi ali ovrže ocene BKF na podlagi K_{OW} in QSAR, s tem pa odpravi potreba po popolni študiji za mnoge snovi ter zmanjša stroške in uporabo živali z zmanjšanim vzorčenjem in številom izvedenih analitskih zaporedij. Ob upoštevanju glavnega načrta prejšnje preskusne metode, da se zagotovi združevanje rezultatov preskusa z obstoječimi podatki o BKF ter olajša izvedba preskusov in razlaga podatkov, je bil cilj zagotoviti ocene BKF z ustrežno točnostjo in natančnostjo za sprejemanje odločitev v zvezi z oceno tveganja. Uporabljajo se mnoga ista načela kot pri popolnem preskusu, npr. merila za veljavnost (prim. odstavek 24) in prekinitev preskusa, če se ob koncu faze absorpcije ugotovi zanemarljiva absorpcija (prim. odstavek 16 in 38).

Snovi, za katere se lahko izvede minimiziran načrt preskusa, morajo soditi v splošno območje, za katerega je bila razvita ta preskusna metoda, tj. nepolarne organske snovi (prim. odstavek 49). Če kar koli kaže na to, da bi se lahko snov, ki se bo preskusila, vedla drugače (npr. očitno odstopanje od kinetike prvega reda), je treba zaradi regulativnih razlogov izvesti popoln preskus.

Minimiziran preskus se običajno ne izvaja v krajšem časovnem obdobju kot standardni preskus BKF, ampak zajema manj vzorčenj rib (glej Dodatek 6 za utemeljitev). Lahko pa se skrajša faza očiščenja za snovi, ki se zelo hitro očistijo, da se prepreči padec koncentracij v ribah pod mejo zaznavnosti/določljivosti pred koncem preskusa. Minimiziran preskus izpostavljenosti rib z eno koncentracijo se lahko uporabi za opredeljevanje potrebe po popolnem preskusu in če so rezultati preskusa, uporabljeni za izračun konstant hitrosti in BKF, zanesljivi (prim. odstavek 93), se lahko opusti izvedba popolnega preskusa, če dobljeni BKF očitno ne sodi v območje vrednosti, ki zahtevajo regulativni nadzor.

V nekaterih primerih je morda bolje izvesti minimiziran načrt preskusa z več preskusnimi koncentracijami kot predhodni preskus, da se določi, ali so ocene BKF za snov odvisne od koncentracije. Če ocene BKF iz minimiziranega preskusa kažejo na odvisnost od koncentracije, je treba izvesti popoln preskus. Če na podlagi takega minimiziranega preskusa ocene BKF niso odvisne od koncentracije, ampak se rezultati ne morejo obravnavati kot dokončni, potem se lahko kateri koli nadaljnji popolni preskus izvede z eno koncentracijo, s tem pa se zmanjša uporaba živali v primerjavi s popolnim preskusom z dvema koncentracijama (ali več).

Snovi, za katere se lahko morebiti izvede minimiziran preskus, morajo:

- najverjetneje slediti približni kinetiki absorpcije in očiščenja prvega reda, npr. na podlagi virov o podobnih snoveh;
- imeti $\log K_{ow} < 6$, razen če se pričakuje zelo hiter metabolizem ⁽¹⁾;
- biti dovolj topne v vodi glede na analitsko tehniko (prim. odstavek 24);
- biti jasno količinsko opredeljive (tj. koncentracije morajo biti vsaj en red velikosti nad mejo določljivosti) v ribah in vodi, priporočeno je označevanje radioaktivnosti (prim. odstavek 23); in
- imeti daljšo fazo očiščenja kot je njihova predvidena razpolovna doba (prim. Dodatek 5 za izračune) ali pa je treba ustrezno prilagoditi trajanje očiščenja (prim. odstavek 91). Izjema k temu pravilu je dovoljena, če se pričakuje zelo hiter metabolizem snovi.

ČASOVNI RAZPORED VZORČENJA ZA ŠTUDIJE, KI SLEDIJO MINIMIZIRANEMU NAČRTU

Vzorčenje rib

Vzorčenje rib je zmanjšano na štiri točke vzorčenja:

- na sredini in ob koncu faze absorpcije (slednja je hkrati začetek očiščenja), npr. po 14 in 28 dneh (33);
- na sredini faze očiščenja in ob koncu študije (ko je koncentracija snovi < 10 % največje koncentracije ali vsaj očitno po eni razpolovni dobi snovi), npr. po 7 in 14 dneh očiščenja (33). Če se pričakuje ali ugotovi zelo hitro očiščenje, je morda treba skrajšati fazo očiščenja, da se prepreči padec koncentracij v ribah pod mejo določljivosti;
- merjenje lipidov kot v popolni študiji;
- popravljanje zaradi rasti kot v popolni študiji;
- BKF se izračuna kot kinetični BKF.

Vzorčenje vode

Pri minimiziranem načrtu se voda vzorči kot v popolni študiji (prim. odstavek 54) ali vsaj petkrat, ta vzorčenja pa so enakomerno porazdeljena v fazi absorpcije, in enkrat tedensko v fazi očiščenja.

⁽¹⁾ Minimiziran preskus se lahko pravzaprav uporabi, da se dokaže zelo hiter metabolizem, kadar se ve, da je to najverjetneje značilno za snov.

Spremembe načrta

Ob upoštevanju lastnosti preskusne snovi, veljavnih napovedi QSAR in določenega namena študije se lahko obravnavajo nekatere spremembe načrta študije:

- če je potrebna večja natančnost, se lahko za vzorec ob koncu faze absorpcije uporabi več rib (6 ali 8 namesto 4);
- Če očiščenje v 14 dneh (ali ob predvidenem koncu faze očiščenja) ni bilo dovolj za ustrezno očiščenje (tj. > 50 %), se lahko uporabi „dodatna“ skupina rib. Če je predvideno trajanje faze očiščenja krajše ali daljše od 14 dni, je treba prilagoditi časovni raspored vzorčenja (tj. ena skupina rib ob predvidenem koncu faze očiščenja in ena skupina na polovici te faze);
- uporaba dveh preskusnih koncentracij, da se prouči morebitna odvisnost od koncentracije. Če rezultati minimiziranega preskusa, izvedenega z dvema preskusnima koncentracijama, kažejo, da BKF ni odvisen od koncentracije (tj. razlika je manj kot 20-odstotna), se lahko ena preskusna koncentracija obravnava kot zadostna v popolnem preskusu, če bo izveden;
- za pomoč pri načrtovanju dolžine faz absorpcije in očiščenja se lahko najverjetneje uporabijo modeli bioakumulacijskih postopkov, na primer ti, ki so predlagani v Arnot idr. (35) (glej tudi Dodatek 5).

Izračuni

Razlog za ta pristop je, da se lahko biokoncentracijski faktor v popolnem preskusu določi kot stacionarni biokoncentracijski faktor (BKF_{SS}), tako da se izračuna razmerje med koncentracijo preskusne snovi v ribjem tkivu in koncentracijo preskusne snovi v vodi, ali z izračunom kinetičnega biokoncentracijskega faktorja (BKF_k), ki je razmerje med konstanto hitrosti absorpcije k_1 in konstanto hitrosti očiščenja k_2 . BKF_k je veljaven, čeprav med absorpcijo ni dosežena stacionarna koncentracija snovi, če absorpcija in očiščenje približno sledita kinetičnim procesom prvega reda. Za oceno konstant hitrosti absorpcije in očiščenja sta potrebni najmanj dve podatkovni točki, ena ob koncu faze absorpcije (tj. na začetku faze očiščenja) in ena ob koncu faze očiščenja (ali po večjem delu te faze). Priporočena je vmesna točka vzorčenja za preverjanje kinetike absorpcije in očiščenja ⁽¹⁾. Za izračune glej Dodatka 5 in 6.

Razlaga rezultatov

Za oceno veljavnosti in informativnosti preskusa je treba preveriti, da faza očiščenja presega eno razpolovno dobo snovi. Poleg tega je BKF_{km} (kinetični BKF, izpeljan iz minimiziranega preskusa) treba primerjati z minimizirano vrednostjo BKF_{SS} (tj. BKF_{SS} , izračunan ob koncu faze absorpcije na podlagi predvidevanja, da je bilo doseženo stacionarno stanje. To je mogoče zgolj predvidevati, saj število točk vzorčenja ni zadostno, da se lahko dokaže). Če je $BKF_{km} < \text{minimiziranega } BKF_{SS}$, mora biti minimizirani BKF_{SS} preferenčna vrednost. Če je BKF_{km} manjši od 70 % minimiziranega BKF_{SS} , rezultati niso veljavni in treba je izvesti popoln preskus.

Če se z minimiziranim preskusom dobi BKF_{km} v območju kakršne koli vrednosti, ki zahteva regulativni nadzor, je treba izvesti popoln preskus. Če rezultat očitno ne sodi v območje kakršne koli vrednosti, ki zahteva regulativni nadzor (je precej nad ali pod tako vrednostjo), morda ni potrebno izvesti popolnega preskusa, ali pa se lahko izvede popoln preskus z eno koncentracijo, če to zahteva ustrezní regulativni okvir.

Če se ugotovi, da je po minimiziranem preskusu z eno koncentracijo treba izvesti popoln preskus, se lahko ta izvede s še eno koncentracijo. Če so rezultati dosledni, se lahko opusti nadaljnji popolni preskus z drugačno koncentracijo, saj se za biokoncentracijo snovi predvideva, da ni odvisna od koncentracije. Če je bil izveden minimiziran preskus z dvema koncentracijama in rezultati kažejo na neodvisnost od koncentracije, se lahko popoln preskus izvede samo z eno koncentracijo (prim. odstavek 87).

⁽¹⁾ Kadar se merita samo dve podatkovni točki, se lahko ocene meje zaupanja za BKF_{km} izvedejo z metodami samovzorčenja. Ko so na voljo tudi vmesne podatkovne točke, se lahko meje zaupanja za BKF_{km} izračunajo kot v popolnem preskusu.

Poročilo o preskusu

V poročilo o preskusu za minimizirani preskus morajo biti vključene vse informacije, ki so zahtevane za popoln preskus (prim. odstavek 81), razen tistih, ki jih ni mogoče natančno pojasniti (tj. krivulja, ki kaže čas za doseganje stacionarnega stanja in stacionarni biokoncentracijski faktor; namesto slednjega je treba navesti minimizirani BKF_{ss}). Poleg tega mora zajeti razloge za uporabo minimiziranega preskusa in dobljenega BKF_{km}.

C.13 – III: Preskus prehranske izpostavljenosti za ugotavljanje bioakumulacije v ribah

UVOD

Metodo, opisano v tem oddelku, je treba uporabljati za snovi, pri katerih izvedba metodologije vodne izpostavljenosti ni praktična (na primer zato, ker ni mogoče ohranjati obstojnih, merljivih koncentracij v vodi ali ker ni mogoče doseči ustreznih obremenitev telesa v 60 dneh izpostavljenosti; glej prejšnje oddelke o metodi vodne izpostavljenosti). Vendar se je treba zavedati, da je končna točka tega preskusa prehranski biomagnifikacijski faktor (BMF) in ne biokoncentracijski faktor (BKF) ⁽¹⁾.

Maja 2001 je bila na konferenci SETAC Europe v Madridu predstavljena nova metoda za preskušanje bioakumulacije organskih snovi, slabo topnih v vodi (36). To delo temelji na različnih objavljenih bioakumulacijskih študijah v virih, ki uporabljajo metodo odmerjanja na podlagi hrane z dodatkom (*npr.* (37)). Na začetku leta 2004 je bil delovni skupini PBT EU skupaj s podpornim referenčnim dokumentom (39) predložen osnutek protokola (38), zasnovan za merjenje bioakumulacijskega potenciala organskih snovi, slabo topnih v vodi, pri katerih izvedba standardne metode vodne izpostavljenosti za ugotavljanje biokoncentracije ni bila praktična. Nadaljnja utemeljitev za metodo je bila, da lahko do morebitne izpostavljenosti v okolju takim, slabo topnim snovem (tj. $\log K_{ow} > 5$) pride predvsem s prehrano (*prim.* (40), (41), (42), (43) in (44)). Zato so v nekaterih objavljenih uredbah o kemikalijah navedeni preskusi prehranske izpostavljenosti ⁽²⁾. Vendar je treba vedeti, da je bila v metodi, opisani v tem dokumentu, izpostavljenost prek vodne faze previdno izpuščena, zato vrednosti BMF iz te preskusne metode ni mogoče neposredno primerjati z vrednostjo BMF iz terenske študije (v kateri sta morda združeni vodna in prehranska izpostavljenost).

Ta del trenutne preskusne metode temelji na tem protokolu (38) in je nova metoda, ki se ni pojavila v predhodni različici TM C.13. Ta drugačni preskus omogoča neposredno proučevanje poteka prehranske izpostavljenosti pod nadzorovanimi laboratorijskimi pogoji.

Morebitni raziskovalci si morajo prebrati odstavke od 1 do 14 te preskusne metode za informacije o tem, kdaj je bolje izvesti preskus prehranske izpostavljenosti kot pa preskus vodne izpostavljenosti. Navedene so informacije o različnih vidikih snovi, ki jih je treba upoštevati pred izvedbo preskusa.

Obravnavana se lahko uporaba izotopsko označenih preskusnih snovi, pri tem pa je treba upoštevati podobne vidike kot pri metodi vodne izpostavljenosti (*prim.* odstavka 6 in 65).

Prehranska metoda se lahko uporabi za preskušanje več snovi v enem preskusu, če so izpolnjena določena merila, ki so nadalje obravnavana v odstavku 112. Zaradi preprostosti ta metodologija opisuje preskus s samo eno preskusno snovjo.

Prehranski preskus je v mnogih vidikih podoben metodi vodne izpostavljenosti, pri čemer je očitna izjema način izpostavljenosti. Zato se mnogo vidikov metode, opisane v tem dokumentu, prekriva z metodo vodne izpostavljenosti, ki je opisana v prejšnjem oddelku. Uporabljenih je bilo čim več sklicevanj na ustrezne odstavke v prejšnjem oddelku, vendar se določenim podvojitvam ni bilo mogoče izogniti zaradi boljše berljivosti in razumevanja.

⁽¹⁾ Za opredelitev pojmov in enote glej Dodatek 1.

⁽²⁾ Za namene Uredbe (ES) št. 1907/2006 o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH) (UL L 396, 30.12.2006, str. 1) je to vprašanje obravnavano v „Smernicah za zahteve po informacijah in oceno kemijske varnosti“, poglavja R.7c, R.7.10.3.1 in R.7.10.4.1 ter slika R.7.10–2.

NAČELO PRESKUSA

Uporabiti je mogoče pretočne ali polstatične pogoje (prim. odstavek 4), priporočeni pa so pretočni pogoji, da se omeji morebitna izpostavljenost preskusne snovi prek vode zaradi kakršne koli desorpcije iz hrane z dodatkom ali iz iztrebkov. Preskus zajema dve fazi: absorpcija (hrana z dodatkom preskusne snovi) in očiščenje (čista, netretirana hrana) (prim. odstavek 16). V fazi absorpcije se „preskusna“ skupina rib vsak dan hrani z vnaprej določeno prehrano iz ribje hrane, dostopne na trgu, z znano sestavo, ki ji je dodana preskusna snov. Ribe bi načeloma morale pojesti vso hrano, ki jim je dana (prim. odstavek 141). Nato pa se ribe hranijo s čisto, netretirano ribjo hrano, dostopno na trgu, v fazi očiščenja. Pri metodi vodne izpostavljenosti se lahko po potrebi uporabi več preskusnih skupin z različnimi koncentracijami preskusne snovi z dodatkom, čeprav je za večino močno hidrofobnih, organskih preskusnih snovi dovolj ena preskusna skupina (prim. odstavka 49 in 107). Če se uporabijo polstatični pogoji, je treba ribe prenesti v nov medij in/ali novo preskusno komoro ob koncu faze absorpcije (v primeru, da sta bila medij in/ali oprema, uporabljena v fazi absorpcije, onesnažena s preskusno snovjo zaradi luženja). Koncentracije preskusne snovi v ribah se merijo v obeh fazah preskusa. Poleg skupine rib, ki se hranijo s hrano z dodatkom (preskusna skupina), se kontrolna skupina rib goji pod enakimi pogoji in hrani enako, razen da ribji hrani, dostopni na trgu, ni dodana preskusna snov. Ta kontrolna skupina omogoča, da se količinsko opredelijo ravni ozadja preskusne snovi v neizpostavljenih ribah, in se uporablja za primerjavo v zvezi s kakršnimi koli neželenimi učinki, povezanimi z tretiranjem in opaženimi v preskusnih skupinah⁽¹⁾. Omogoča tudi primerjavo konstant hitrosti rasti med skupinami, da se lahko preveri, ali so ribe pojedle podobno količino ponujene hrane (pri pojasnjevanju različnih konstant hitrosti rasti je treba obravnavati tudi morebitne razlike v okusnosti med hranama; prim. odstavek 138). Pomembno je, da se med fazo absorpcije in očiščenja preskusni in kontrolni skupini daje hrano z enako hranilno vrednostjo.

Na podlagi izkušenj raziskovalcev, ki so razvili metodo, je običajno dovolj, da faza absorpcije traja 7–14 dni (38), (39). To obdobje bi moralo čim bolj zmanjšati stroške izvedbe preskusa, hkrati pa zagotoviti zadostno izpostavljenost za večino snovi. V nekaterih primerih pa se lahko faza absorpcije podaljša (prim. odstavek 127). Koncentracija snovi v ribah med fazo absorpcije morda ne bo dosegla stacionarnega stanja, zato obdelava podatkov in rezultati te metode običajno temeljijo na kinetični analizi ostankov v tkivih. (Opomba: pri tem se lahko uporabijo enačbe za oceno časa, ki je potreben za doseganje stacionarnega stanja, tako kot pri preskusu vodne izpostavljenosti – glej Dodatek 5). Faza očiščenja se začne, ko se ribam prvič da hrana brez dodatka, in običajno traja do največ 28 dni ali do takrat, ko ni mogoče več količinsko opredeliti preskusne snovi v celi ribi, kar koli od tega je prej. Faza očiščenja se lahko skrajša ali podaljša za več kot 28 dni glede na spremembe v odvisnosti od časa v izmerjenih koncentracijah kemikalij in velikosti rib.

S to metodo se lahko opredelijo razpolovna doba, ki je značilna za snov ($t_{1/2}$, iz konstante hitrosti očiščenja, k_2), učinkovitost asimilacije (absorpcija v črevesju; a), kinetični prehranski biomagnifikacijski faktor (BMF_k), kinetični prehranski biomagnifikacijski faktor, popravljen glede na rast (BMF_{kg}) in kinetični prehranski biomagnifikacijski faktor, popravljen glede na lipide⁽²⁾ (BMF_{kl}) (in/ali kinetični prehranski biomagnifikacijski faktor, popravljen glede na rast in lipide, BMF_{kgkl}) za preskusno snov v ribah. Tako kot pri metodi vodne izpostavljenosti povečanje mase rib med preskusom povzroči razredčitev preskusne snovi v rastočih ribah, zato je (kinetični) BMF prenizko ocenjen, če se ga ne popravi na podlagi rasti (prim. odstavka 162 in 163). Poleg tega se lahko izračuna indikativen stacionarni BMF, če je ocenjeno, da je bilo v fazi absorpcije doseženo stacionarno stanje. Na voljo so pristopi, ki omogočajo oceno kinetičnega biokoncentracijskega faktorja (BKF_k) na podlagi podatkov, pridobljenih v prehranski študiji (npr. (44), (45), (46), (47) in (48)). Prednosti in slabosti takih pristopov so opisane v Dodatku 8.

Preskus je bil primarno zasnovan za nepolarne organske snovi, slabo topne v vodi, ki približno sledijo kinetiki absorpcije in očiščenja prvega reda v ribah. Če se snov preskusi in ne sledi približnosti kinetiki absorpcije in očiščenja prvega reda, je treba uporabiti kompleksnejše modele (glej vire v Dodatku 5) ter poiskati nasvet biostatistika in/ali farmakokinetika.

⁽¹⁾ Večine preskusnih snovi se načeloma ne sme zaznati v kontrolni vodi. Koncentracije ozadja bi morale biti pomembne samo za naravno prisotne materiale (npr. nekatere kovine) in snovi, ki so splošno prisotne v okolju.

⁽²⁾ Ker je BMF opredeljen kot razmerje med koncentracijo snovi v organizmu in koncentracijo snovi v hrani organizma v stacionarnem stanju, se upoštevajo lipidi tako, da se vrednost popravi glede na vsebnost lipidov v organizmu in hrani, zato ga je ustrezneje opisati kot „popravek“. Ta pristop se razlikuje od „normalizacije“ na vnaprej določeno vsebnost lipidov v organizmu, ki se izvede pri preskusu vodne izpostavljenosti za ugotavljanje biokoncentracije.

BMF se običajno določi z analizo preskusne snovi v celi ribi (na podlagi mokre teže). Če je to pomembno za cilj študije, se lahko vzorčijo določena tkiva (npr. mišice, jetra), če se riba razdeli na užitne in neužitne dele (prim. odstavek 21). Poleg tega se lahko odstrani gastrointestinalni trakt in izvede ločena analiza, da se opredeli prispevek h koncentracijam v celi ribi za točke vzorčenja ob koncu faze absorpcije in skoraj na začetku faze očiščenja, ali kot del pristopa masne bilance.

Izmeriti je treba vsebnost lipidov v celi vzorčeni ribi, zato da se lahko koncentracije popravijo glede na lipide, pri tem pa se upošteva vsebnost lipidov v hrani in ribi (prim. odstavka 56 in 57 ter Dodatek 7).

Izmeriti in zabeležiti je treba težo vzorčenih posameznih rib ter jo povezati z analizirano koncentracijo kemikalije v teh posameznih ribah (npr. z uporabo edinstvene identifikacijske kode za vsako vzorčeno ribo), zato da se lahko izračuna rast, do katere je morda prišlo med preskusom. Kadar je mogoče, je treba izmeriti tudi skupno dolžino ribe⁽¹⁾. Podatki o teži so potrebni tudi za oceno BKE, pri čemer se uporabijo podatki o očiščenju iz prehranskega preskusa.

INFORMACIJE O PRESKUSNI SNOVI

Na voljo morajo biti informacije o preskusni snovi, kot so opisane v odstavkih 3 in 22. Običajno ni potrebna analitska metoda za koncentracije preskusne snovi v vodi, zahtevane pa so metode z zadostno občutljivostjo za merjenje koncentracij v ribji hrani in tkivih.

Metoda se lahko uporabi za preskušanje več snovi v enem preskusu. Vendar morajo biti preskusne snovi med sabo združljive, tako da ne vplivajo druga na drugo in ne spremenijo svoje kemijske identitete, ko se jih doda v ribjo hrano. Cilj je, da se izmerjeni rezultati za vse posamezne snovi, ki so preskušene skupaj, ne razlikujejo veliko od rezultatov, ki bi se pridobili, če bi se izvedli posamezni preskusi za vsako preskusno snov. S predhodnimi analitskimi raziskavami je treba ugotoviti, da se lahko vsaka snov ponovno pridobi iz hrane z več dodatki in vzorca ribjega tkiva z i) visokim izkoristkom (npr. > 85 % nominalne vrednosti) in ii) ustrezno občutljivostjo za preskušanje. Skupni odmerek snovi, ki se preskušajo skupaj, mora biti nižji od skupne koncentracije, ki bi lahko povzročila toksične učinke (prim. odstavek 51). Poleg tega je treba pri načrtu preskusa upoštevati morebitne neželene učinke pri ribah in potencial za vzajemne učinke (npr. metabolične učinke), ki so povezani s preskušanjem več snovi hkrati. Izogniti se je treba tudi sočasnemu preskušanju snovi, ki lahko ionizirajo. V smislu izpostavljenosti je metoda primerna tudi za kompleksne zmesi (prim. odstavek 13, čeprav zanjo veljajo enake omejitve pri analizi kot za katero koli drugo metodo).

VELJAVNOST PRESKUSA

Za veljavnost preskusa morajo biti izpolnjeni naslednji pogoji (prim. odstavek 24):

- sprememba temperature vode mora znašati manj kot ± 2 °C v tretiranih in kontrolnih skupinah;
- koncentracija raztopljenega kisika ne sme pasti pod 60 % nasičenosti z zrakom;
- koncentracija preskusne snovi v ribji hrani pred in ob koncu faze absorpcije mora tudi biti v območju ± 20 % (na podlagi vsaj treh vzorcev v obeh časovnih točkah);
- v predhodnih analitskih raziskavah o hrani z dodatkom je treba dokazati visoko stopnjo homogenosti snovi v hrani, pri čemer vsaj tri koncentracije vzorca za snov, vzete ob začetku preskusa, ne smejo od povprečja odstopati za več kot ± 15 %;

⁽¹⁾ Med preskusom je treba zabeležiti tudi skupno dolžino, saj je dober pokazatelj tega, ali je prišlo do neželenega učinka.

- koncentracije preskusne snovi niso zaznane ali so prisotne samo v običajnih sledih v hrani brez dodatka ali tkivih kontrolnih rib glede na tretirane vzorce;
- smrtnost ali drugi neželeni učinki/bolezni v kontrolni in tretirani skupini rib morajo ob koncu preskusa znašati $\leq 10\%$; če se preskus zaradi kakršnega koli razloga podaljša, morajo biti neželeni učinki v obeh skupinah $\leq 5\%$ na mesec in $\leq 30\%$ skupno. Precejšnje razlike v povprečni rasti med preskusnimi in kontrolnimi skupinami vzorčenih rib so lahko pokazatelj toksičnega učinka preskusne snovi.

REFERENČNE SNOVI

Če laboratorij še ni izvedel preskusa ali je prišlo do precejšnjih sprememb (npr. sprememba seva ali dobavitelja rib, druga vrsta rib, precejšnje spremembe v velikosti rib, ribji hrani ali metodi dodajanja snovi v hrano itd.), se priporoča izvedba študije tehnične usposobljenosti z referenčno snovjo. Referenčna snov se uporablja predvsem ugotavljanje, ali je tehnika za dodajanje snovi v hrano ustrezna, da se zagotovi čim večja homogenost in biološka dostopnost preskusnih snovi. Primer, ki je bil uporabljen v primeru nepolarnih hidrofobnih snovi, je heksaklorobenzen (HCB), vendar je treba zaradi nevarne lastnosti heksaklorobenzena obravnavati druge snovi, za katere so na voljo obstoječi, zanesljivi podatki o absorpciji in biomagnifikaciji⁽¹⁾. Če se uporabi referenčna snov, je treba v poročilu o preskusu zagotoviti osnovne informacije o tej snovi, vključno z imenom, čistostjo, številko CAS, strukturo in podatki o toksičnosti (če so na voljo), tako kot za preskusne snovi (prim. odstavek 3 in 22).

OPIS METODE

Oprema

Materiali in oprema morajo biti uporabljeni tako, kot je opisano v metodi vodne izpostavljenosti (prim. odstavek 26). Uporabiti je treba pretočni preskusni sistem ali preskusni sistem za statično obnavljanje vode, ki zagotavlja zadostno prostornino vode za redčenje v preskusnih bazenih. Zabeležiti je treba hitrost pretoka.

Voda

Preskusna voda mora biti uporabljena tako, kot je opisano v metodi vodne izpostavljenosti (prim. odstavek 27–29). Preskusni medij je treba opredeliti, kot je opisano, in kakovost medija mora biti med preskusom konstantna. Vsebnost naravnih delcev in skupni organski ogljik (TOC) morata biti čim nižja (≤ 5 mg/l delcev; ≤ 2 mg/l skupnega organske ogljika) pred začetkom preskusa. TOC je treba izmeriti samo pred preskusom v okviru opredeljene lastnosti preskusne vodi (prim. odstavek 53).

Hrana

Priporočena je ribja hrana, ki je dostopna na trgu (peleti, ki plavajo in/ali počasi potonejo na dno) in ima opredeljene vsaj vsebnost proteinov in maščob. Peleti morajo biti enake velikosti, da se poveča učinkovitost izpostavljenosti hrani, tj. ribe bodo pojedle več hrane, saj ne bodo jedle samo večjih kosov in zgrešile manjše. Na začetku preskusa je treba izbrati pelete ustrezne velikosti glede na velikost rib (npr. uporabijo se lahko peleti s približnim premerom 0,6–0,85 mm za ribe s skupno dolžino od 3 do 7 cm in 0,85–1,2 mm za ribe s skupno velikostjo od 6 do 12 cm). Na začetku faze očiščenja se lahko velikost peletov prilagodi glede na rast rib. Primer ustrezne sestave hrane, ki je dostopna na trgu, je naveden v Dodatku 7. Pri razvoju te metode je bila običajno uporabljena preskusna hrana s skupno vsebnostjo lipidov od 15 do 20 % (masni delež). Na nekaterih območjih morda ni na voljo ribja hrana s tako visoko koncentracijo lipidov. V takih primerih se lahko študije primerov izvedejo z nižjo koncentracijo lipidov v hrani in po potrebi ustrezno prilagodi stopnjo hranjenja za ohranjanje zdravja rib (na podlagi predhodnega preskušanja). Pred začetkom preskusa in ob koncu faze absorpcije je treba izmeriti in zabeležiti skupno vsebnost lipidov v hrani preskusne in kontrolne skupine. V poročilu o študiji je treba predstaviti podrobnosti, ki jih je zagotovil dobavitelj hrane, dostopne na trgu, o analizi za hranila, vlago, vlaknine in pepel ter po možnosti ostanke mineralov in pesticidov (npr. „standardna“ prednostna onesnaževala).

⁽¹⁾ HCB je naveden v prilogah A in C k Stockholmski konvenciji in v prilogah I in III Uredbe (ES) št. 850/2004 o obstojnih organskih onesnaževalih (UL L 158, 30.4.2004, str. 7).

Pri dodajanju preskusne snovi v hrano si je treba čim bolj prizadevati, da se zagotovi homogenost v celotni preskusni hrani. Koncentracijo preskusne snovi v hrani za preskusno skupino je treba izbrati ob upoštevanju občutljivosti analitske tehnike, toksičnosti preskusne snovi (NOEC, če je znan) in ustreznih fizikalno-kemijskih podatkov. Če se uporabi referenčna snov, jo je treba po možnosti vključiti pri koncentraciji, ki znaša približno 10 % koncentracije preskusne snovi (oziroma je v vsakem primeru tako nizka, kot je praktično izvedljivo), glede na občutljivost analize (npr. za heksaklorobenzen je bilo ugotovljeno, da sprejemljiva koncentracija v hrani znaša 1–100 µg/g; prim. (47) za več informacij o učinkovitosti asimilacije HCB).

Preskusna snov se lahko ribji hrani doda na več načinov glede na njene fizikalne lastnosti in topnost (glej Dodatek 7 za več podrobnosti o metodah za dodajanje snovi v hrano):

- če je snov topna in obstojna v trigliceridih, jo je treba raztopiti v majhni količini ribjega ali užitnega rastlinskega olja, preden se jo primeša ribji hrani. V tem primeru je treba skrbno zagotoviti, da pri tem ne nastane obrok s previsoko vsebnostjo lipidov, ter upoštevati vsebnost naravnih lipidov v hrani z dodatkom, tako da se doda najmanjša znana količina olja, ki je potrebna, da se doseže porazdelitev in homogenost preskusne snovi v hrani, ali;
- hrani je treba dodati preskusno snov z ustreznim organskim topilom, če to ne vpliva na homogenost in biološko dostopnost (zaradi izhlapevanja topila lahko v hrani nastanejo (mikro)kristali preskusne snovi, tega pa ni mogoče dokazati na preprosto način; prim. (49)), ali;
- neviskozne tekočine je treba dodati neposredno v ribjo hrano, vendar jih je treba dobro premešati, da se doseže homogenost in pospeši dobra asimilacija. S tehniko mešanja je treba zagotoviti homogenost hrane z dodatkom.

V nekaterih primerih, npr. za manj hidrofobne preskusne snovi, za katere obstaja verjetnost desorpcije iz hrane, je morda treba na pripravljene pelete hrane nanesti majhno količino koruznega/ribjega olja (glej odstavek 142). V takih primerih je treba kontrolno hrano tretirati enako in zadnjo pripravljeno hrano uporabiti za merjenje vsebnosti lipidov.

Če se uporabi referenčna snov, morajo ti rezultati biti primerljivi s podatki študij iz virov, ki so bile izvedene v podobnih pogojih in s primerljivo stopnjo hranjenja (prim. odstavek 45), in parametri, značilni za referenčno snov, morajo izpolnjevati ustrezna merila iz odstavka 113 (3., 4. in 5. točka).

Če se kot vehikel za preskusno snov uporabi olje ali topilo, je treba enako količino istega vehikla (brez preskusne snovi) primešati kontrolni hrani, da je ta enaka hrani z dodatkom. Pomembno je, da se med fazo absorpcije in očiščenja preskusni in kontrolni skupini daje hrano z enako hranilno vrednostjo.

Hrano z dodatkom je treba shranjevati pod pogoji, ki ohranjajo obstojnost preskusne snovi v mešanici hrane (npr. hlajenje), in te pogoje navesti v poročilu.

Izbira vrste rib

Uporabijo se lahko ribe, ki so navedene za preskus vodne izpostavljenosti (prim. odstavek 32 in Dodatek 3). Šarenka (*Oncorhynchus mykiss*), krap (*Cyprinus carpio*) in črnoglavi pisanec (*Pimephales promelas*) so bili pogosto uporabljeni v študijah prehranske bioakumulacije z organskimi snovmi pred objavo te preskusne metode. Vrsta rib se mora pri hranjenju vesti tako, da zelo hitro poje dani obrok hrane, saj se s tem čim bolj omeji kakršen koli dejavnik, ki vpliva na koncentracijo preskusne snovi v hrani (npr. luženje v vodo in možnost vodne izpostavljenosti). Uporabiti je treba ribe z velikostjo/težo v priporočenem območju (prim. Dodatek 3). Ribe ne smejo biti tako majhne, da bi njihova velikost ovirala preprostost analize posameznih rib. Ribje vrste, preskušene v fazi hitre rasti, lahko otežijo razlago podatkov, hitra rast pa lahko vpliva na izračun učinkovitosti asimilacije (¹).

(¹) Za hitro rast med fazo absorpcije se dejanska stopnja hranjenja zmanjša na nižjo od te, ki je bila določena na začetku izpostavljenosti.

Vzdrževanje rib

Merila za sprejemljivost v zvezi z aklimatizacijo, smrtnostjo in boleznijo so enaka kot pri metodi vodne izpostavljenosti pred izvedbo preskusa (prim. odstavki 33–35).

IZVEDBA PRESKUSA

Raziskave pred študijo in preskus za določanje območja

Analitske raziskave pred študijo so potrebne, da se dokaže izkoristek snovi iz hrane z dodatkom/ribjega tkiva z dodatkom. Preskus za določanje območja, da se izbere ustrezna koncentracija v hrani, ni vedno potreben. Lahko se izvede predhodne prehranske preskuse, vendar ti niso obvezni, da se pokaže, da niso ugotovljeni nobeni neželeni učinki, da se oceni okusnost hrane z dodatkom ter občutljivost analitske metode za ribja tkiva in hrano ter da se izbere ustrezno stopnjo hranjenja in intervale vzorčenja med fazo očiščenja itd. Predhodna študija je lahko dragocena za oceno števila rib, ki je potrebno za vzorčenje med fazo očiščenja. To lahko pomeni precejšnje zmanjšanje števila uporabljenih rib, zlasti za preskusne snovi, ki so še posebej dojemljive za metabolizem.

Pogoji izpostavljenosti

Trajanje faze absorpcije

Običajno je dovolj, da faza absorpcije traja 7–14 dni, in med tem se vsak dan ena skupina rib hrani s kontrolno hrano, druga skupina rib pa s preskusno hrano na podlagi vnaprej določenega obroka, ki je odvisen od preiskovane vrste in preskusnih pogojev, npr. med 1–2 % telesne teže (mokra teža) v primeru šarenke. Stopnjo hranjenja je treba izbrati tako, da se prepreči hitra rast in veliko povečanje vsebnosti lipidov. Faza absorpcije se lahko po potrebi podaljša glede na praktične izkušnje iz preteklih študij ali znanja o absorpciji/očiščenju preskusne (ali druge ustrezne) snovi. Začetek preskusa je opredeljen s prvim hranjenjem s hrano z dodatkom. Preskusni dan traja od hranjenja do malo pred začetkom naslednjega hranjenja (npr. eno uro). Prvi preskusni dan absorpcije torej traja od prvega hranjenja s hrano z dodatkom in se konča malo pred drugim hranjenjem s hrano z dodatkom. V praksi se faza absorpcije konča malo pred (npr. eno uro) prvim hranjenjem s preskusno snovjo brez dodatka, saj bodo ribe še naprej prebavljale hrano z dodatkom in absorbirale preskusno snov v vmesnih 24 urah. Pomembno je zagotoviti, da se s preskusno snovjo doseže dovolj visoko (netoksično) obremenitev telesa glede na analitsko metodo, zato da se lahko med fazo očiščenja izmeri upad vsaj enega reda velikosti. V posebnih primerih se lahko faza absorpcije podaljša (do največ 28 dni) in uporabi dodatno vzorčenje, da se zberejo ugotovitve o kinetiki absorpcije. Med absorpcijo koncentracija v ribah morda ne bo dosegla stacionarnega stanja. Pri tem se lahko tako kot za preskus vodne izpostavljenosti uporabijo enačbe za oceno časa, ki je potreben za doseganje stacionarnega stanja, te pa pokažejo, kako dolgo najverjetneje traja, da se dosežejo znatne koncentracije v ribah (prim. Dodatek 5).

V nekaterih primerih je morda znano, da 7–14 dni za absorpcijo snovi v ribe ni dovolj, da bi uporabljena koncentracija hrane dosegla dovolj visoko koncentracijo v ribah, da bi se analiziral upad vsaj enega reda velikosti med očiščenjem, zaradi slabe analitske občutljivosti ali nizke učinkovitosti asimilacije. V takih primerih je morda priporočljivo podaljšati začetno fazo hranjenja na več kot 14 dni ali pa obravnavati višjo koncentracijo v hrani, zlasti za močno prebavljive snovi. Toda treba je paziti, da se obremenitev telesa med absorpcijo ohranja pod (ocenjeno) kronično koncentracijo brez opaznega učinka (NOEC) v ribjem tkivu (prim. odstavek 138).

Trajanje faze očiščenja

Očiščenje običajno traja do največ 28 dni in se začne, ko se ribe v preskusni skupini nahрани s čisto, netretirano hrano po fazi absorpcije. Očiščenje se začne s prvim dajanjem hrane „brez dodatka“ in ne takoj po zadnjem hranjenju s hrano „z dodatkom“, saj bodo ribe še naprej prebavljale hrano in absorbirale preskusno snov v vmesnih 24 urah, kot je opisano v odstavku 126. Zato se prvi vzorec v fazi očiščenja vzame malo pred drugim hranjenjem s hrano brez dodatka. Ta faza očiščenja je zasnovana tako, da vključuje snovi z morebitno razpolovno dobo do največ 14 dni, kar je skladno z razpolovno dobo bioakumulacijskih snovi⁽¹⁾, pri čemer 28 dni torej zajema dve razpolovni dobi takih snovi. V primerih močno bioakumulacijskih snovi je morda priporočljivo podaljšati fazo očiščenja (če je to razvidno iz predhodnega preskušanja).

Če se snov očiščuje tako počasi, da v fazi očiščenja ni mogoče točno določiti razpolovne dobe, je morda še vedno na voljo dovolj informacij za namene ocenjevanja, da se pokaže visoka raven bioakumulacije. Če pa se snov očiščuje tako hitro, da ni mogoče izpeljati zanesljive koncentracije ob času nič (koncentracije ob koncu absorpcije/začetku očiščenja, $C_{0,d}$) in k_2 , se lahko ugotovi previdna ocena k_2 (prim. Dodatek 7).

Če analize rib v zgodnejših intervalih (npr. 7 ali 14 dni) kažejo, da se je snov pred celotnim 28-dnevnim obdobjem očistila do te mere, da je padla pod mejo določljivosti, se lahko nadaljnje vzorčenje in preskus prekineta.

V nekaterih primerih ob koncu faze absorpcije (ali z drugim vzorcem očiščenja) morda ne pride do izmerljive absorpcije preskusne snovi. Če se lahko dokaže, da: i) so izpolnjena merila za veljavnost iz odstavka 113 in ii) do pomanjkanja absorpcije ni prišlo zaradi kakšne druge pomanjkljivosti preskusa (npr. prekratko trajanje absorpcije, pomanjkljiva tehnika za dodajanje snovi v hrano, ki povzroči slabo biološko dostopnost, pomanjkanje občutljivosti analitske metode, ribe ne jedo hrane itd.), se lahko študija prekine, ne da bi jo bilo treba znova izvesti z daljšim trajanjem absorpcije. Če so predhodne raziskave pokazale, da lahko pride do tega, je priporočljivo izvesti analizo iztrebkov za neprebavljeno preskusno snov v okviru pristopa „masne bilance“, če je to mogoče.

Število preskusnih rib

Podobno kot pri preskusu vodne izpostavljenosti je treba izbrati ribe podobne teže in dolžine, tako da najmanjše ribe niso manjše od dveh tretjin teže največjih (prim. odstavki 40–42).

Skupno število rib za študijo je treba izbrati na podlagi časovnega razporeda vzorčenja (najmanj en vzorec ob koncu faze absorpcije in štiri do šest vzorcev med fazo očiščenja, vendar je to odvisno od trajanja faz), pri tem pa je treba upoštevati občutljivost analitske tehnike, koncentracijo, ki bo najverjetneje dosežena ob koncu faze absorpcije (na podlagi predhodnega znanja), in trajanje očiščenja (če se lahko na podlagi predhodnega znanja izvede ocena). Ob vsakem dogodku je treba vzorčiti pet do deset rib, pri čemer se parametri rasti (teža in skupna dolžina) izmerijo pred analizo kemikalije in lipidov.

Zaradi neločljivih razlik v velikosti, hitrosti rasti in fiziologiji med ribami ter možnih razlik v količini dane hrane, ki jo poje vsaka riba, je v vsakem intervalu treba vzorčiti vsaj pet rib iz preskusne skupine in pet rib iz kontrolne skupine, da se ustrezno oceni povprečna koncentracija in njena variabilnost. Razlike med uporabljenimi ribami bodo verjetno prispevale več k skupni nenadzorovani variabilnosti preskusa kot pa k variabilnosti, ki je del uporabljenih analitskih metodologij, zato je v nekaterih primerih upravičena uporaba do največ deset rib na točko vzorčenja. Če pa koncentracije ozadja preskusne snovi v kontrolnih ribah niso izmerljive na začetku očiščenja, je morda dovolj kemijska analiza pri dveh do treh kontrolnih ribah v zadnjem intervalu vzorčenja, če se ob vseh točkah vzorčenja še vedno vzorčijo teža in skupna dolžina preostalih kontrolnih rib (zato da se vzorči rast istega števila rib iz preskusne in kontrolne skupine). Ribe je treba shraniti, posamezno stehitati (tudi če se izkaže, da je treba pozneje združiti rezultate vzorčenja) in izmeriti skupno dolžino.

⁽¹⁾ V študiji vodne izpostavljenosti bi 14-dnevna razpolovna doba ustrezala BKF, ki znaša približno 10 000 l/kg, z uporabo rib z 1 g in ustrezno hitrostjo absorpcije, ki znaša približno 500 l/kg/d (v skladu z enačbo iz Sijm idr. (46)).

Za standardni preskus z na primer 28-dnevno fazo očiščenja, vključno s petimi vzorci očiščenja, to pomeni skupno 59–120 rib iz preskusne in 50–110 rib iz kontrolne skupine, pri čemer se predvideva, da se z analitsko tehniko za snov lahko izvede analiza vsebnosti lipidov na istih ribah. Če analize lipidov ni mogoče izvesti na istih ribah kot kemijsko analizo in če tudi ni izvedljivo uporabiti kontrolnih rib samo za analizo lipidov (prim. odstavek 56), je potrebnih dodatnih 15 rib (tri iz populacije staleža ob začetku preskusa, po tri ribe iz kontrolne in preskusne skupine ob začetku očiščenja ter po tri ribe iz kontrolne in preskusne skupine ob koncu preskusa). Primer časovnega razporeda vzorčenja s številom rib je opisan v Dodatku 4.

Obremenitev

Uporabiti je treba podobno visoka razmerja med vodo in ribami kot pri metodi vodne izpostavljenosti (prim. odstavka 43 in 44). Čeprav stopnje obremenitve med vodo in ribami v tem preskusu ne vplivajo na koncentracije izpostavljenosti, se priporoča stopnja obremenitve, ki znaša 0,1–1,0 g rib (mokra teža) na liter vode na dan, da se ohranijo ustrezne koncentracije raztopljenega kisika in čim bolj omeji stres pri preskusnih organizmih.

Preskusna hrana in hranjenje

Med aklimatizacijo je treba ribe hraniti z ustrežno hrano, kot je opisano zgoraj (odstavek 117). Če se preskus izvaja pod pretočnimi pogoji, je treba pretok med hranjenjem rib ustaviti.

Med preskusom mora hrana za preskusno skupino ustrezati tej, opisani zgoraj (odstavki 116–121). Poleg upoštevanja dejavnikov, značilnih za snov, analitske občutljivosti, pričakovane koncentracije v hrani pod pogoji v okolju in ravni kronične toksičnosti/obremenitve telesa je treba pri izbiri ciljne koncentracije za dodatek k hrani obravnavati tudi okusnost hrane (zato da je ribe ne zavračajo). V poročilu je treba navesti nominalno koncentracijo preskusne snovi za dodatek k hrani. Na podlagi izkušenj koncentracije za dodatek k hrani, ki znašajo 1–1000 µg/g, zagotavljajo praktično delovno območje za preskusne snovi, ki ne kažejo določenih toksičnih mehanizmov. Pri snoveh, ki delujejo z nedoločenim mehanizmom, ravni ostankov v tkivih ne smejo preseči 5 µmol/g lipidov, saj ostanki nad to ravni najverjetneje povzročajo kronične učinke (19), (48) in (50) ⁽¹⁾. Pri drugih snoveh je treba paziti, da se zaradi akumulirane izpostavljenosti ne pojavijo neželeni učinki (prim. odstavek 127). To še zlasti velja, če se preskuša več kot ena snov hkrati (prim. odstavek 112).

Ustrezna količina preskusne snovi se lahko doda k ribji hrani na enega od treh načinov, opisanih v odstavku 119 in Dodatku 7. Metode in postopke za dodajanje preskusne snovi k hrani je treba opisati v poročilu. Kontrolne ribe je treba hraniti z netretirano hrano, ki vsebuje enako količino oljnega vehikla brez dodatka, če je ta bil uporabljen v hrani z dodatkom za fazo absorpcije, ali ki je tretirana s „čistim“ topilom, če je bilo za pripravo hrane za preskusno skupino uporabljeno topilo. Tretirano in netretirano hrano je treba vsaj trikrat analitsko izmeriti glede koncentracije preskusne snovi pred začetkom in ob koncu faze absorpcije. Po izpostavljenosti tretirani hrani (faza absorpcije), se ribe (obe skupini) hrani z netretirano hrano (faza očiščenja).

Ribe se hranijo z vnaprej določenim obrokom (glede na vrsto; npr. približno 1–2 % teže mokrega telesa na dan v primeru šarenke). Stopnjo hranjenja je treba izbrati tako, da se prepreči hitra rast in veliko povečanje vsebnosti lipidov. Zabeležiti je treba točno stopnjo hranjenja, določeno med preskusom. Začetno hranjenje mora temeljiti na načrtovanih meritvah teže za populacijo staleža tik pred začetkom preskusa. Količino hrane je treba prilagoditi glede na mokro težo vzorčenih rib ob vsakem vzorčenju, da se upošteva rast med preskusom. Teža in dolžina rib v preskusnem in kontrolnem bazenu se lahko oceni na podlagi teže in skupne dolžine rib, ki se uporabijo ob vsakem vzorčenju; ne smejo se tehtati ali meriti preostale ribe v preskusnem in kontrolnem bazenu. Pomembno je, da se enaka stopnja hranjenja ohrani v celotnem preskusu.

⁽¹⁾ Ker se dejanske notranje koncentracije lahko določijo samo po izvedbi preskusa, je treba oceniti pričakovano notranjo koncentracijo (npr. na podlagi pričakovanega BMF in koncentracije v hrani; prim. enačba A5.8 v Dodatku 5).

Hranjenje je treba opazovati, da se zagotovi, da ribe vidno pojedjo vso hrano, ki jim je dana, zato da bodo v izračunih uporabljene ustrezne hitrosti zaužitja. Pri izbiri stopnje hranjenja, ki bo zagotovila zaužitje vse hrane ob hranjenju enkrat na dan, je treba obravnavati predhodne preskuse hranjenja ali pretekle izkušnje. Če hrana vedno ostane, je priporočljivo razporediti odmerek na dodatno obdobje hranjenja v vsakem preskusnem dnevu (npr. nadomestiti hranjenje enkrat na dan s hranjenjem polovice obroka dvakrat na dan). Če je to potrebno, je treba drugo hranjenje izvesti ob vnaprej določenem času in ga razporediti tako, da pred vzorčenjem rib preteče čim več časa (npr. čas za drugo hranjenje se določi v prvi polovici preskusnega dne).

Čeprav ribe na splošno zelo hitro pojedjo hrano, je pomembno zagotoviti, da snov ostane adsorbirana na hrano. Prizadevati si je treba, da se preskusna snov ne bi razpršila iz hrane v vodo, saj bi se s tem ribe izpostavilo vodnim koncentracijam preskusne snovi poleg prehranske izpostavljenosti. To je mogoče zagotoviti tako, da se v eni uri od hranjenja odstranijo vsi ostanki hrane (in iztrebki) iz preskusnega in kontrolnega bazena, po možnosti pa v 30 minutah. Poleg tega se lahko uporabi sistem, pri katerem se voda neprestano čisti prek filtra iz aktivnega ogljika, da se absorbirajo kakršna koli „raztopljena“ onesnaževala. Pretočni sistemi lahko pripomorejo k hitrem spiranju delcev hrane in raztopljenih snovi⁽¹⁾. V nekaterih primerih lahko malo spremenjena tehnika priprave hrane z dodatkom pomaga olajšati to težavo (glej odstavek 119).

Svetloba in temperatura

Tako kot pri metodi vodne izpostavljenosti (prim. odstavek 48) se priporoča obdobje osvetljenosti od 12 do 16 ur in temperatura (± 2 °C) mora biti ustrezna za uporabljeno preskusno vrsto (prim. Dodatek 3). Vrsta in lastnosti svetlobe morajo biti znane in navedene.

Kontrole

Uporabiti je treba eno kontrolno skupino z ribami, ki se hranijo z istim obrokom kot preskusna skupina, vendar brez preskusne snovi v hrani. Če se je pri dodajanju preskusne snovi k hrani za preskusno skupino uporabilo olje ali topilo, je treba hrano kontrolne skupine tretirati na povsem enak način, vendar brez preskusne snovi, zato da sta hrani preskusne in kontrolne skupine enaki (prim. odstavka 121 in 139).

Pogostost meritev kakovosti vode

Pogoji, opisani pri metodi vodne izpostavljenosti, veljajo tudi za to metodo, razen tega, da je treba TOC izmeriti samo pred preskusom v okviru opredelitve lastnosti preskusne vode (prim. odstavek 53).

Vzorčenje ter analiza rib in hrane

Analiza vzorcev hrane

Vzorce preskusne in kontrolne hrane je treba analizirati vsaj trikrat za preskusno snov, za vsebnost lipidov pa vsaj pred začetkom in ob koncu faze absorpcije. V poročilo je treba vključiti metode analize in postopke za zagotavljanje homogenosti hrane.

⁽¹⁾ Morda ni mogoče povsem preprečiti prisotnosti preskusne snovi v preskusnem mediju zaradi izločanja rib ali luženja iz hrane. Ena možnost je torej izmeriti koncentracijo snovi v vodi ob koncu faze absorpcije, zlasti če se uporablja polstatični sistem, da se lažje ugotovi, ali je prišlo do kakršne koli vodne izpostavljenosti.

Vzorke je treba analizirati za preskusno snov po uveljavljenih in validiranih metodah. Treba je izvesti predhodne raziskave, da se ugotovijo meja določljivosti, odstotek izkoristka, motnje in analitska variabilnost pri izbrani matriki vzorčenja. Če se preskuša izotopsko označen material, je treba obravnavati podobne ugotovitve kot pri metodi vodne izpostavljenosti, pri čemer prehranska analiza nadomesti vodno analizo (prim. odstavek 65).

Analiza rib

Ob vsakem vzorčenju rib je treba vzorčiti 5–10 posameznih rib iz preskusne in kontrolne skupine (v nekaterih primerih se število kontrolnih rib lahko zmanjša; prim. odstavek 134).

Vzorčenja morajo potekati vsak preskusni dan ob istem času (glede na hranjenje) in morajo biti razporejena tako, da je čim manjša verjetnost, da hrana ostane v črevesju med fazo absorpcije in v zgodnjem delu faze očiščenja, da se prepreči lažno prispevanje k skupnim koncentracijam preskusne snovi (tj. vzorčene ribe je treba odstraniti ob koncu preskusnega dne in pri tem upoštevati, da se preskusni dan začne ob hranjenju in konča ob naslednjem hranjenju, približno 24 ur pozneje. Očiščenje se začne s prvim hranjenjem s hrano brez dodatka; prim. odstavek 128). Prvi vzorec v fazi očiščenja (ki se vzame malo pred drugim hranjenjem s hrano brez dodatka) je pomemben, saj se ekstrapolacija za en dan nazaj iz te meritve uporabi za oceno koncentracije ob času nič ($C_{0,d}$, koncentracija v ribi ob koncu absorpcije/začetku očiščenja). Po izbiri se lahko odstrani gastrointestinalni trakt ribe in analizira ločeno ob koncu absorpcije ter 1. in 3. dan med očiščenjem.

Ob vsakem vzorčenju je treba odstraniti ribe iz obeh preskusnih posod in jih tretirati na enak način, kot je opisan pri metodi vodne izpostavljenosti (prim. odstavki 61–63).

Koncentracije preskusne snovi v celi ribi (mokra teža) se izmerijo vsaj ob koncu faze absorpcije in med fazo očiščenja v kontrolni in preskusni skupini. Med fazo očiščenja je priporočenih štiri do šest točk vzorčenja (npr. 1., 3., 7., 14. in 28. dan). Po izbiri se lahko vključiti dodatno točko vzorčenja po 1–3 dneh absorpcije, da se oceni učinkovitost asimilacije iz linearne faze absorpcije za ribo, ko je še na začetku obdobja izpostavljenosti. Možna sta dva glavna odstopanja od časovnega razporeda: i) če se za namene raziskovanja kinetike absorpcije uporabi podaljšana faza absorpcije, so med fazo absorpcije potrebne dodatne točke vzorčenja, zato je treba vključiti dodatne ribe (prim. odstavek 126); ii) če je bila študija prekinjena ob koncu faze absorpcije, ker ni bilo izmerljive absorpcije (prim. odstavek 131). Posamezne ribe, ki se vzorčijo, je treba stehtati (in izmeriti njihovo skupno dolžino), da se lahko določijo konstante hitrosti rasti. Ob koncu absorpcije in izbranih točkah očiščenja se lahko izmerijo tudi koncentracije snovi v določenem ribjem tkivu (užitnih in neužitnih delih). Če se preskuša izotopsko označen material, je treba obravnavati podobne ugotovitve kot pri metodi vodne izpostavljenosti, pri čemer prehranska analiza nadomesti vodno analizo (prim. odstavek 65).

Za periodično uporabo referenčne snovi (prim. odstavek 25) je treba koncentracije po možnosti meriti v preskusni skupini ob koncu absorpcije in vseh točkah očiščenja, ki so določene za preskusno snov (cela riba); v kontrolni skupini je treba analizirati koncentracije samo ob koncu absorpcije (cela riba). V določenih okoliščinah (na primer če sta analitski tehniki za preskusno snov in referenčno snov nezdružljivi, kar pomeni, da so v okviru časovnega razporeda vzorčenja potrebne dodatne ribe) se lahko uporabi drug pristop, opisan v nadaljevanju, da se čim bolj zmanjša število dodatnih rib. Koncentracije referenčne snovi se izmerijo med očiščenjem samo 1. in 3. dan ter ob dveh nadaljnjih točkah vzorčenja, izbranih tako, da se lahko zanesljivo ocenita koncentracija ob času nič ($C_{0,d}$) in k_2 za referenčno snov.

Če je mogoče, je treba vsebnost lipidov posameznih rib določiti ob vsakem vzorčenju ali vsaj ob začetku in koncu faze absorpcije ter ob koncu faze očiščenja. (prim. odstavka 56 in 67). Glede na analitsko metodo (glej odstavke 67 in Dodatek 4) se lahko morda uporabi iste ribe za določanje vsebnosti lipidov in koncentracije preskusne snovi. To je zaželeno zaradi čim manjšega števila rib. Če pa to ni mogoče, se lahko uporabi enak pristop, kot je opisan pri metodi vodne izpostavljenosti (glej odstavek 56 za te druge možnosti merjenja lipidov). Metodo, ki se uporabi za količinsko opredelitev vsebnosti lipidov, je treba opisati v poročilu.

Kakovost analitske metode

Izvesti je treba preverjanja s preskušanjem, da se zagotovi specifičnost, točnost, natančnost in obnovljivost analitske tehnike, značilne za snov, ter izkoristke preskusne snovi iz hrane in rib.

Meritve rasti rib

Na začetku preskusa je treba stehtati vzorec rib iz populacije staleža (in izmeriti njihovo skupno dolžino). Te ribe je treba vzorčiti malo prvim hranjenjem s hrano z dodatkom (npr. eno uro) in jih dodeliti preskusnemu dnevu 0. Število rib za ta vzorec mora biti vsaj enako kot za vzorce med preskusom. Nekatere od teh rib so lahko iste kot te, ki so uporabljene za analizo lipidov pred začetkom faze absorpcije (prim. odstavek 153). Ob vsakem intervalu vzorčenja se ribe najprej stehtajo in izmeri se njihova dolžina. Za vsako posamezno ribo je treba izmerjeno težo (in dolžino) povezati z analizirano koncentracijo kemikalije (in vsebnostjo lipidov, kadar je to ustrezno), na primer z uporabo edinstvene identifikacijske kode za vsako vzorčeno ribo. Meritve teh vzorčenih rib se lahko uporabijo za oceno teže (in dolžine) preostalih rib v preskusnem in kontrolnem bazenu.

Preskusno vrednotenje

Vsak dan je treba izvesti in zabeležiti opazovanja v zvezi s smrtnostjo. Izvesti in zabeležiti je treba dodatna opazovanja za neželene učinke, na primer nenavadno vedenje ali pigmentacijo. Ribe se obravnavajo kot mrtve, če ni dihalnega gibanja in ni mogoče zaznati odziva na rahli mehanski dražljaj. Vse mrtve ali jasno umirajoče ribe je treba odstraniti.

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

Rezultati preskusa se uporabijo za izpeljavo konstante hitrosti očiščenja (k_2) kot funkcije skupne mokre teže rib. Izračuna se konstanta hitrosti rasti, k_g , ki temelji na povprečnem povečanju teže rib, in uporabi za izračun konstante hitrosti očiščenja, popravljene glede na rast, k_{2g} , kadar je to ustrezno. Poleg učinkovitosti asimilacije (a ; absorpcija v črevesju), je treba v poročilu navesti kinetični biomagnifikacijski faktor (BMF_k) (ki je po potrebi popravljeno glede na rast, BMF_{kg}), njegovo vrednost, popravljeno glede na lipide (BMF_{kl} ali BMF_{kgl} , če je popravljeno glede na razredčitev zaradi rasti), in stopnjo hranjenja. Izračunati je mogoče tudi oceno časa, ki je potreben za doseganje stacionarnega stanja v fazi absorpcije (npr. 95 % stacionarnega stanja ali $t_{95} = 3,0/k_2$), in vključi se lahko ocena stacionarnega BMF (BMF_{ss}) (prim. odstavka 105 in 106 ter Dodatek 5), če je iz vrednosti t_{95} razvidno, da so bili morda doseženi pogoji stacionarnega stanja. Ta BMF_{ss} je treba popraviti glede na lipide tako kot kinetično izpeljan BMF (BMF_k), da se dobi vrednost, popravljena glede na lipide, BMF_{ssl} (opozoriti je treba, da ni na voljo dogovorjenega postopka za popravljanje stacionarnega BMF glede na razredčitev zaradi rasti). Formule in primeri izračunov so predstavljeni v Dodatku 7. Na voljo so pristopi, ki omogočajo oceno kinetičnega biokoncentracijskega faktorja (BKF_k) na podlagi podatkov, pridobljenih v prehranski študiji. Ti so opisani v Dodatku 8.

Podatki o teži/dolžini rib

Mokra teža in dolžina posameznih rib za vsa časovna obdobja se predstavita v preglednici ločeno za preskusno in kontrolno skupino za vse dneve vzorčenj med fazo absorpcije (populacija staleža za začetek absorpcije; kontrolno in preskusno skupino za konec absorpcije in, če se izvede, zgodnjo fazo (npr. 1.–3. dan absorpcije) ter fazo očiščenja (npr. 1., 2., 4., 7., 14. in 28. dan za kontrolno in preskusno skupino). Po možnosti se teža uporabi kot merilo za rast za namene popravljanja glede na razredčitev zaradi rasti. Glej opise v nadaljevanju (odstavka 162 in 163) ter Dodatek 5 za metode, uporabljene za popravljanje podatkov glede na razredčitev zaradi rasti.

Podatki o koncentraciji preskusne snovi v ribah

V preglednici se predstavijo meritve ostankov preskusne snovi v posameznih ribah (ali združenih vzorcev rib, če meritve posameznih rib niso mogoče), izražene v smislu koncentracije na moko težo (masni delež), za preskusne in kontrolne ribe za posamezna vzorčenja. Če je bila na vsak vzorčeni ribi izvedena analiza lipidov, se lahko izpeljejo in v preglednici predstavijo posamezne koncentracije, popravljene glede na lipide, v smislu koncentracije lipidov (masni delež lipidov).

- Meritve ostankov preskusne snovi v posameznih ribah (ali združenih vzorcev rib, če meritve posameznih rib niso mogoče, prim. odstavek 66) za fazo očiščenja se pretvorijo v njihove naravne logaritme in grafično prikažejo v odvisnosti od časa (dan). Če vizualni pregled grafičnega prikaza pokaže očitne osamelce, se lahko uporabi statistično veljaven preskus osamelcev, da se odstranijo napačne podatkovne točke in zagotovi utemeljitev za njihovo opustitev.
- Izračuna se linearna korelacija po metodi najmanjših kvadratov za $\ln(\text{koncentracijo})$ v odvisnosti od podatkov o očiščenju (dan). Naklon in osni odsek se v poročilu navedeta kot skupna konstanta hitrosti očiščenja (k_2) in naravni logaritem izpeljane koncentracije ob času nič ($C_{0,d}$) (prim. Dodatek 5 in Dodatek 7 za nadaljnje podrobnosti). Če to ni mogoče, ker koncentracije padejo pod mejo določljivosti za drugi vzorec očiščenja, se lahko izvede previdna ocena k_2 (prim. Dodatek 7).
- Variance v naklonu in osnem odseku se izračunajo s standardnimi statističnimi postopki, na podlagi teh rezultatov pa se ovrednotijo in predstavijo 90-odstotni (ali 95-odstotni) intervali zaupanja.
- Izračuna se tudi povprečna izmerjena koncentracija v ribah za zadnji dan absorpcije (izmerjena koncentracija ob času nič, $C_{0,m}$) in primerja z izpeljano vrednostjo $C_{0,d}$. Če je izpeljana vrednost nižja od izmerjene vrednosti, lahko ta razlika kaže na prisotnost neprebavljene hrane z dodatkom v črevesju. Če je izpeljana vrednost precej višja od izmerjene vrednosti, lahko to kaže na to, da je vrednost, izpeljana iz linearne regresije podatkov o očiščenju, napačna in da jo je treba znova ovrednotiti (glej Dodatek 7).

Hitrost očiščenja in biomagnifikacijski faktor

Za izračun biomagnifikacijskega faktorja iz podatkov je naprej treba pridobiti učinkovitost asimilacije (absorpcijo preskusne snovi v črevesju, a). Za to je treba uporabiti enačbo A7.1 iz Dodatka 7, ki zahteva, da so znani izpeljana koncentracija v ribah ob času nič faze očiščenja ($C_{0,d}$), (skupna) konstanta hitrosti očiščenja (k_2), koncentracija v hrani (C_{hrana}), konstanta hitrosti zaužitja hrane (I) in trajanje faze absorpcije (t). Naklon in osni odsek linearne razmerja med $\ln(\text{koncentracijo})$ in trajanjem očiščenja se navedeta kot skupna konstanta hitrosti očiščenja ($k_2 = \text{naklon}$) in koncentracija ob času nič ($C_{0,d} = e^{\text{intercept}}$), kot je opisano zgoraj. Preveriti je treba, da so izpeljane vrednosti biološko verodostojne (npr. učinkovitost asimilacije kot delež ni višja od 1). (I) se izračuna tako, da se masa hrane deli z maso rib, ki se hranijo vsak dan (če se hranijo z 2 % telesne teže, (I) znaša 0,02). Stopnjo hranjenja, uporabljeno v izračunu, pa je morda treba prilagoditi glede na rast rib (to se lahko izvede z znano konstanto hitrosti rasti, da se oceni teža rib v vsaki točki časa med fazo absorpcije; prim. Dodatek 7). Kadar ni mogoče izpeljati k_2 in $C_{0,d}$, ker so na primer koncentracije padle pod mejo zaznavnosti za drugi vzorec očiščenja, se lahko izvede previdna ocena k_2 in BMF_k „zgornje meje“ (prim. Dodatek 7).

Ko se pridobi učinkovitost asimilacije (a), se lahko izračuna biomagnifikacijski faktor tako, da se a množi s konstanto hitrosti zaužitja (I) in deli s (skupno) konstanto hitrosti očiščenja (k_2). Biomagnifikacijski faktor, popravljen glede na rast, se izračuna na enak način, uporabi pa se konstanta hitrosti očiščenja, popravljena glede na rast (k_{2g} ; (prim. odstavek 162 in 163)). Izpelje se lahko drugačna ocena učinkovitosti asimilacije, če je bila v zgodnji, linearni fazi faze absorpcije izvedena analiza ribjega tkiva; prim. odstavek 151 in Dodatek 7. Ta vrednost predstavlja neodvisno oceno učinkovitosti asimilacije za organizem, ki v bistvu ni bil izpostavljen (tj. ribe so pred začetkom faze absorpcije). Za izpeljavo BMF se običajno uporabi učinkovitost asimilacije, ocenjena na podlagi podatkov o očiščenju.

Popravek glede na lipide in razredčitev zaradi rasti

Rast rib med fazo očiščenja lahko zniža izmerjene koncentracije kemikalije v ribah, kar pomeni, da je skupna konstanta hitrosti očiščenja, k_2 , višja, kot bi bila zgolj na podlagi procesov odstranjevanja (npr. metabolizem, izločanje) (prim. odstavek 72). Vsebnost lipidov v preskusnih ribah (ki je tesno povezana z bioakumulacijo hidrofobnih snovi) in vsebnost lipidov v hrani se lahko v praksi tako razlikujeta, da jih je treba popraviti, zato da se lahko biomagnifikacijske faktorje smiselno predstavi. Biomagnifikacijski faktor je treba popraviti glede na razredčitev zaradi rasti (tako kot kinetični BKF pri metodi vodne izpostavljenosti) in glede na vsebnost lipidov v hrani, ki je povezana z vsebnostjo lipidov v ribah (korekcijski faktor za lipide). Enačbe in primeri teh izračunov so opisani v Dodatku 5 oziroma Dodatku 7.

Za popravek glede na razredčitev zaradi rasti je treba izračunati konstanto hitrosti očiščenja, popravljeno glede na rast (k_{2g}) (glej Dodatek 5 za enačbe). Ta konstanta hitrosti očiščenja, popravljena glede na rast (k_{2g}), se nato uporabi za izračun biomagnifikacijskega faktorja, popravljenega glede na rast, kot je opisano v odstavku 73. V nekaterih primerih ta pristop ni mogoč. Drug pristop, ki ne zahteva popravljanja glede na razredčitev zaradi rasti, pa zajema uporabo mase preskusne snovi na podatke o očiščenju za ribo (celo ribo) in ne običajne mase preskusne snovi na masno enoto podatkov o (koncentraciji v) ribi. Ta pristop je preprost, saj bi v preskusih, skladnih s to metodo, zabeležene koncentracije v tkivih morale biti povezane s težo posameznih rib. Preprost postopek za ta pristop je opisan v Dodatku 5. Opozoriti je treba, da je v poročilu še vedno treba oceniti in navesti k_2 , čeprav je uporabljen drugi pristop.

Da se popravijo vrednosti glede na vsebnost lipidov v hrani in ribah, kadar analiza lipidov ni bila izvedena na vseh vzorčenih ribah, se izpeljejo povprečni deleži lipidov (masni delež) v ribah in hrani⁽¹⁾. Nato se izračuna korekcijski faktor za lipide (L_c), tako da se povprečni delež lipidov v ribah deli s povprečnim deležem lipidov v hrani. Biomagnifikacijski faktor, popravljen glede na rast ali ne, kot je ustrezno, se deli s korekcijskim faktorjem za lipide, da se izračuna biomagnifikacijski faktor, popravljen glede na lipide.

Če so bile analize kemikalije in lipidov izvedene na istih ribah v vsaki točki vzorčenja, se lahko podatki o tkivu, popravljene glede na lipide, za posamezne ribe uporabijo neposredno za izračun BMF, popravljenega glede na lipide (prim. (37)). Z grafičnim prikazom koncentracije, popravljene glede na lipide, se dobi $C_{0,d}$ na podlagi lipidov in k_2 . Nato se lahko izvede matematična analiza z enakimi enačbami iz Dodatka 7, učinkovitost asimilacije (a) pa se izračuna s konstanto hitrosti zaužitja hrane, normalizirano glede na lipide (I_{lipid}), in koncentracijo v hrani na podlagi lipidov ($C_{hrana-lipid}$). Parametri, popravljene glede na lipide, se nato podobno uporabijo za izračun BMF (opozoriti je treba, da se popravek konstante hitrosti rasti uporabi tudi za delež lipidov, ne pa za mokro težo ribe, da se izračuna BMF_{kgL} , popravljen glede na lipide in rast).

Razlaga rezultatov

Povprečna rast v preskusni in kontrolni skupini načeloma ne bi smela biti bistveno drugačna, da se lahko izključijo toksični učinki. Konstanti hitrosti rasti ali krivulji rasti obeh skupin je treba primerjati z ustreznim postopkom⁽²⁾.

Poročilo o preskusu

Po koncu študije se pripravi končno poročilo z informacijami o preskusni snovi, preskusni vrsti in preskusnih pogojih v skladu z odstavkom 81 (kot pri metodi vodne izpostavljenosti). Poleg tega se zahtevajo naslednji podatki:

- (¹) Ta pristop je značilen za prehransko študijo in je drugačen od postopka pri vodni izpostavljenosti, zato je bila namesto „normalizacije“ uporabljena beseda „popravek“, da se prepreči nejasnosti – glej tudi opombo v odstavku 106.
- (²) Izvede se lahko t-test na konstantah hitrosti rasti, da se preskusi, ali je rast v kontrolni in preskusni skupini različna, ali F-test v primeru analize variance. F-test ali preskus razmerja verjetnosti se lahko po potrebi uporabi za pomoč pri izbiri ustreznega modela rasti (monografija OECD 54, (32)).

Preskusna snov:

- kakršne koli informacije o obstojnosti preskusne snovi v pripravljene hrani.

Preskusni pogoji:

- nominalna koncentracija snovi v hrani, tehnika za dodajanje snovi v hrano, količina vehikla (lipidov), uporabljena pri postopku dodajanja snovi v hrano (če se uporabi), meritve koncentracije preskusne snovi v hrani z dodatkom za vsako analizo (vsaj tri pred začetkom študije in ob koncu absorpcije) in povprečne vrednosti;
- vrsta in kakovost oljnega nosilca ali topila (kategorija, dobavitelj itd.), ki in če se je uporabil za dodajanje k hrani;
- uporabljena vrsta hrane (približna analiza ⁽¹⁾), kategorija ali kakovost, dobavitelj itd.), stopnja hranjenja med fazo absorpcije, količina dane hrane in pogostost (vključno z morebitnimi prilagoditvami na podlagi teže vzorčenih rib);
- čas, ko so bile ribe zbrane in evtanazirane za kemijsko analizo za vsako točko vzorčenja (npr. eno uro pred hranjenjem naslednjega dne).

Rezultati:

- rezultati kakršnih koli predhodnih študij;
- informacije o kakršnih koli ugotovljenih neželenih učinkih;
- popoln opis vseh uporabljenih postopkov kemijske analize, vključno z mejo zaznavnosti in določljivosti, variabilnostjo in izkoristkom;
- izmerjene koncentracije lipidov v hrani (hrana z dodatkom in kontrolna hrana), vrednosti za posamezne ribe, povprečne vrednosti in standardni odkloni;
- v preglednici predstavljeni podatki o teži (in dolžini) rib, povezani s posameznimi ribami za kontrolno in preskusno skupino (na primer z uporabo edinstvene identifikacijske kode za vsako ribo), in izračuni, izpeljane konstante hitrosti rasti in 95-odstotni intervali zaupanja;
- v preglednici predstavljeni podatki o koncentraciji preskusne snovi v ribah, povprečna izmerjena koncentracija ob koncu absorpcije ($C_{0,m}$), izpeljana (skupna) konstanta hitrosti očiščenja (k_2) in koncentracija v ribah ob začetku faze očiščenja ($C_{0,d}$) skupaj z variancami teh vrednosti (naklon in osni odsek);
- v preglednici predstavljeni podatki o vsebnosti lipidov v ribah (navedeni v odvisnosti od določenih koncentracij snovi, kadar je to ustrezno), povprečne vrednosti za preskusno in kontrolno skupino ob začetku preskusa ter koncu absorpcije in očiščenja;
- krivulje (vključno z vsemi izmerjenimi podatki), ki kažejo naslednje (če je ustrezno, se lahko koncentracije izrazijo glede na celo telo živali ali določena tkiva te živali):
 - rast (tj. teža (in dolžina) ribe v odvisnosti od časa) ali teža v odvisnosti od časa, pretvorjena v naravni logaritem;
 - očiščenje preskusne snovi v ribi in
 - koncentracija, pretvorjena v naravni logaritem (koncentracija ln), v odvisnosti od časa očiščenja (vključno z izpeljano konstanto hitrosti očiščenja, k_2 , in koncentracijo, izpeljano iz naravnega logaritma, v ribah ob začetku faze očiščenja, $C_{0,d}$);
- če vizualni pregled grafičnega prikaza pokaže očitne osamelce, se lahko uporabi statistično veljaven preskus osamelcev, da se odstrani napačne podatkovne točke in zagotovi utemeljitev za njihovo opustitev;

⁽¹⁾ Tehnika za analizo hrane za proteine, lipide, surove vlaknine in pepel; te informacije so običajno na voljo pri dobavitelju hrane.

- izračunana konstanta hitrosti očiščenja, popravljena glede na rast, in razpolovna doba, popravljena glede na rast;
- izračunana učinkovitost asimilacije (α);
- „surovi“ prehranski BMF, kinetični BMF, popravljen glede na lipide in razredčitev zaradi rast („surovi“ in popravljen glede na lipide na podlagi mokre teže cele ribe), BMF za tkivo, če je ustrezno;
- kakršne koli informacije o metabolitih izotopsko označene preskusne snovi in njihovem kopičenju;
- kar koli nenavadnega v zvezi s preskusom, kakršno koli odstopanje od teh postopkov in vsi drugi pomembni podatki;
- preglednica s povzetimi, ustreznimi, izmerjenimi in izračunanimi podatki, kot sledi v nadaljevanju:

Konstante hitrosti očiščenja snovi in biomagnifikacijski faktorji (BMF _k)	
k_g (konstanta hitrosti rasti; dan ⁻¹):	vstavi vrednost (95-odstotni CI) ⁽¹⁾
k_2 (skupna konstanta hitrosti očiščenja, dan ⁻¹):	vstavi vrednost (95-odstotni CI)
k_{2g} (konstanta hitrosti očiščenja, popravljena glede na rast; dan ⁻¹):	vstavi vrednost (95-odstotni CI) ⁽¹⁾
$C_{0,m}$ (izmerjena koncentracija ob času nič, koncentracija v ribah ob koncu absorpcije) (µg/g):	vstavi vrednost ± SD ⁽²⁾
$C_{0,d}$ (izpeljana koncentracija ob času nič v fazi očiščenja; µg/g):	vstavi vrednost ± SD ⁽²⁾
I (hitrost zaužitja določenega obroka hrane; g hrana/g riba/dan):	vstavi vrednost
I_g (dejanska stopnja hranjenja, prilagojena glede na rast; g hrana/g riba/dan) ⁽²⁾ :	vstavi vrednost ± SD ⁽²⁾
C_{hrana} (koncentracija kemikalije v hrani; µg/g):	vstavi vrednost ± SD ⁽²⁾
α (učinkovitost asimilacije snovi):	vstavi vrednost ± SD ⁽²⁾
BMF _k (kinetični prehranski BMF):	vstavi vrednost (95-odstotni CI) ⁽¹⁾
BMF _{kg} (kinetični prehranski BMF, popravjen glede na rast):	vstavi vrednost (95-odstotni CI) ⁽¹⁾
$t_{1/2g}$ (razpolovna doba, popravljena glede na rast, v dnevih):	vstavi vrednost ± SD ⁽²⁾
L_c (korekcijski faktor za lipide):	vstavi vrednost
BMF _{kgL} (kinetični BMF, popravjen glede na rast in lipide):	vstavi vrednost
BMF _{SSL} (indikativen stacionarni BMF, popravjen glede na lipide) ⁽²⁾ :	vstavi vrednost ± SD ⁽²⁾

⁽¹⁾ CI (confidence interval): interval zaupanja (kadar ga je mogoče oceniti)

⁽²⁾ SD (standard deviation): standardni odklon (kadar ga je mogoče oceniti)

VIRI

- (1) Poglavje C.13 te priloge: *Bioakumulacija: pretočni preskus na ribah.*
- (2) Poglavje A.6 te priloge: *Topnost v vodi*
- (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) Poglavje A.8 te priloge: Porazdelitveni koeficient (n-oktanol/voda): metoda *stresanja bučke.*
- (5) Poglavje A.24 te priloge: Porazdelitveni koeficient (n-oktanol/voda), metoda HPLC.
- (6) Poglavje A.23 te priloge: Porazdelitveni koeficient (1-oktanol/voda): metoda počasnega mešanja.
- (7) Poglavje C.7 te priloge: Hidroliza kot funkcija 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), Pariz, Francija.
- (9) Poglavje A.5 te priloge: Površinska napetost vodnih raztopin.
- (10) Poglavje A.4 te priloge: Parni tlak.
- (11) Poglavje C.4 te priloge: Določanje „dobre“ biorazgradljivosti.
- (12) Poglavje C.29 te priloge: Dobra biorazgradljivost – CO₂ v zaprtih posodah.
- (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. Na voljo na: 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. in 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. in 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. in 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. in 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. in 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. in 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. objavljeno: 3. aprila 2012.

- (22) Poglavje C.47 te priloge: Ribe, preskus toksičnosti za zgodnje razvojne stopnje.
- (23) Poglavje C.15 te priloge: Ribe, preskus kratkotrajne toksičnosti na embriih in mladiah s hranilnim mešičkom.
- (24) Poglavje C.14 te priloge: Preskus rasti ribjih mladit.
- (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), Pariz, Francija.
- (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, ZDA.
- (27) US-FDA (1999), Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, ZDA.
- (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, ZDA
- (29) Bligh E.G. in 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. in 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), Pariz, Francija.
- (33) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. in 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, ZDA.
- (35) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. in 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. in Peterson D. (2001), A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (predstavitev). na 12. letni seji SETAC Europe: Madrid, Španija.
- (37) Fisk A.T., Cymbalisty C.D., Bergman Å. in 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) Anonimni avtor (2004), Fish, dietary bioaccumulation study – Basic protocol, dokument predložen TC-NES WG o PBT.
- (39) Anonimni avtor (2004), Background document to the fish dietary study protocol, dokument predložen TC-NES WG o PBT.
- (40) Bruggeman W.A., Opperhuizen A., Wijbenga A. in Hutzinger O. (1984), Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, *Toxicol. Environ. Chem.* 7: 173-189.
- (41) Muir D.C.G., Marshall W.K. in 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. in 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. in Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 5: 624-637.
- (45) Sijm D.T.H.M. in 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. in 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. in 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. in 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. Disertacija. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, ZDA.
- (50) McCarty L.S. in 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), Pariz, Francija.
-

Dodatek 1

OPREDELITEV POJMOV IN ENOTE

Učinkovitost asimilacije (a) je merilo relativne količine snovi, absorbirane iz črevesja v organizem (a nima enote, ampak je pogosto izražena kot odstotek in ne kot delež).

Bioakumulacija se na splošno opisuje kot postopek, pri katerem koncentracija snovi v organizmu doseže raven, ki presega to v respiratornem mediju (npr. voda za ribe ali zrak za sesalce), hrani ali obojem(1).

Biokoncentracija je povečana koncentracija preskusne snovi v ali na organizmu (ali določenih tkivih organizma), ki je odvisna od koncentracije preskusne snovi v okoliskem mediju.

Biokoncentracijski faktor (BKF ali K_b) je koncentracija preskusne snovi v /na ribah ali določenih ribjih tkivih kadar koli med fazo absorpcije v tem preskusu kopičenja (C_f kot mg/kg), deljena s koncentracijo snovi v okoliskem mediju (C_w kot mg/l). BKF se izrazi v l kg⁻¹. Treba je opozoriti, da niso upoštevani popravki glede na rast in/ali standardno vsebnost lipidov.

Biomagnifikacija je povečana koncentracija preskusne snovi v ali na organizmu (ali določenih tkivih organizma), ki je odvisna od koncentracije preskusne snovi v hrani.

Biomagnifikacijski faktor (BMF) je koncentracija snovi v plenilcu, ki je odvisna od koncentracije v plenilčevem plenu (ali hrani) v stacionarnem stanju. V metodi, opisani v tej preskusni metodi, je izpostavljenost prek vodne faze previdno izpuščena, zato vrednosti BMF iz te preskusne metode ni mogoče neposredno primerjati z vrednostjo BMF iz terenske študije (v kateri sta morda združeni vodna in prehranska izpostavljenost).

Prehranski biomagnifikacijski faktor (prehranski BMF) je pojem, ki se v tej preskusni metodi uporablja za opis rezultata preskusa prehranske izpostavljenosti, v katerem je izpostavljenost prek vodne faze previdno izpuščena, zato vrednosti prehranskega BMF iz te preskusne metode ni mogoče neposredno primerjati z vrednostjo BMF iz terenske študije (v kateri sta morda združeni vodna in prehranska izpostavljenost).

Faza očiščenja ali faza (izgube) po izpostavljenosti je obdobje po prenosu preskusnih rib iz medija s preskusno snovjo v medij brez te snovi, ko se prouči očiščenje (ali čista izguba) snovi iz preskusnih rib (ali določenih ribjih tkiv).

Konstanta hitrosti očiščenja (izgube) (k_2) je številčna vrednost, ki določa hitrost zmanjšanja koncentracije preskusne snovi v preskusnih ribah (ali določenih ribjih tkivih) po prenosu preskusnih rib iz medija s preskusno snovjo v medij brez te snovi (k_2 se izrazi v dan⁻¹).

Raztopljeni organski ogljik (DOC, dissolved organic carbon) je merilo koncentracije ogljika, ki izvira iz raztopljenih organskih virov v preskusnih medijih.

Faza izpostavljenosti ali absorpcije je obdobje, v katerem so ribe izpostavljene preskusni snovi.

Stopnja zaužitja hrane (I) je povprečna količina hrane, ki jo vsak dan pojedjo ribe in je odvisna od ocene povprečne celotne telesne teže ribe (izražena v g hrana/g riba/dan).

Kinetični biokoncentracijski faktor (BKF_k) je razmerje med konstanto hitrosti absorpcije, k_1 , in konstanto hitrosti očiščenja, k_2 (tj. k_1/k_2 – glej ustrezne opredelitve v tem Dodatku). Načeloma bi ta vrednost morala biti primerljiva z BKF_{SS} (glej že navedeno opredelitev), vendar lahko pride do odstopanj, če stacionarno stanje ni bilo zagotovo doseženo ali če je bil kinetični BKF popravljen glede na rast.

Kinetični biokoncentracijski faktor, normaliziran glede na lipide (BKF_{KL}), je normaliziran na ribo s 5-odstotno vsebnostjo lipidov.

Kinetični biokoncentracijski faktor, normaliziran glede na lipide in popravljen glede na rast (BKF_{KGL}), je normaliziran na ribo s 5-odstotno vsebnostjo lipidov in popravljen glede na rast med obdobjem študije, kot je opisano v Dodatku 5.

Stacionarni biokoncentracijski faktor, normaliziran glede na lipide (BKF_{SSL}), je normaliziran na ribo s 5-odstotno vsebnostjo lipidov.

Snov z več sestavinami je za namene registracije, evalvacije, avtorizacije in omejevanja kemikalij (REACH) opredeljena kot snov, ki ima več kot eno glavno sestavino s koncentracijo, ki znaša od 10 % do 80 % (masni delež).

Porazdelitveni koeficient n-oktanol/voda (K_{OW}) je razmerje med topnostjo snovi v *n*-oktanolu in vodi v stacionarnem stanju (metode A.8 (2), A.24 (3), A.23 (4)); izrazi se tudi kot P_{OW} . Logaritem K_{OW} se uporablja kot pokazatelj potenciala snovi za biokoncentracijo v vodnih organizmih.

Delci organskega ogljika (POC, particulate organic carbon) so merilo koncentracije ogljika, ki izvira iz suspendiranih organskih virov v preskusnih medijih.

Mikroekstrakcija na trdni fazi (SPME) je analitska tehnika, pri kateri se ne uporablja topilo in ki je bila razvita za sisteme redčenja. Pri tej metodi se vlakno, prevlečeno s polimerom, izpostavi plinski ali tekoči fazi, ki vsebuje preiskovani analit. Načeloma se uporabi čim krajši čas analize, da se vzpostavijo pogoji stacionarnega stanja med trdno in tekočo fazo glede na izmerjeno vrsto. Nato se lahko koncentracija preiskovanega analita določi neposredno iz vlakna ali po njegovi ekstrakciji iz vlakna v topilo glede na tehniko določanja.

Stacionarno stanje je doseženo v grafičnem prikazu preskusne snovi v ribah (C_f) v odvisnosti od časa, ko krivulja postane vzporedna s časovno osjo in so tri zaporedne analize C_f na vzorcih, vzetih v intervalu najmanj dveh dni, v območju $\pm 20\%$ druga od druge ter ni precejšnjega povečanja C_f v času med prvo in zadnjo zaporedno analizo. Pri analiziranju združenih vzorcev so potrebne najmanj štiri zaporedne analize. Za preskusne snovi, ki se absorbirajo počasi, so primernejši sedemdnevni intervali.

Stacionarni biokoncentracijski faktor (BKF_{SS}) se v daljšem časovnem obdobju znatno ne spreminja, pri čemer je koncentracija preskusne snovi v okoliškem mediju v tem obdobju konstantna (prim. opredelitev stacionarnega stanja).

Skupni organski ogljik (TOC, total organic carbon) je merilo koncentracije ogljika, ki izvira iz vseh organskih virov v preskusnih medijih, vključno z viri v obliki delcev in raztopljenimi viri.

Konstanta hitrosti absorpcije (k_1) je številčna vrednost, ki določa hitrost povečanja koncentracije preskusne snovi v/na preskusni ribi (ali določenem ribjem tkivu), ko so ribe izpostavljene navedeni snovi (k_1 se izrazi v $l\ kg^{-1}\ dan^{-1}$).

Snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali so znani kot UVCB.

Kemikalija je snov ali zmes.

Preskusna kemikalija je katera koli snov ali zmes, ki se preskuša s to preskusno metodo.

VIRI

- (1) Gobas F. A. P. C., de Wolf W., Burkhard L. P., Verbruggen E. in Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624–637.

-
- (2) .Poglavje A.8 te Priloge: *Porazdelitveni koeficient (n-oktanol/voda): metoda stresanja bučke.*
 - (3) Poglavje A.24 te Priloge: *Porazdelitveni koeficient (n-oktanol/voda): metoda tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC).*
 - (4) Poglavje A.23 te Priloge: *Porazdelitveni koeficient (1-oktanol/voda): metoda počasnega mešanja.*
-

Dodatek 2

NEKATERE KEMIJSKE LASTNOSTI SPREJEMLJIVE VODE ZA REDČENJE

Sestavina	Mejna koncentracija
delci	5 mg/l
skupni organski ogljik	2 mg/l
neionizirani amoniak	1 µg/l
ostanek klora	10 µg/l
skupni organofosforni pesticidi	50 ng/l
skupni organoklorni pesticidi in poliklorirani bifenili	50 ng/l
skupni organski klor	25 ng/l
aluminij	1 µg/l
arzen	1 µg/l
krom	1 µg/l
kobalt	1 µg/l
baker	1 µg/l
železo	1 µg/l
svinec	1 µg/l
nikelj	1 µg/l
cink	1 µg/l
kadmij	100 ng/l
živo srebro	100 ng/l
srebro	100 ng/l

Dodatek 3

VRSTE RIB, PRIPOROČENE ZA PRESKUŠANJE

Priporočene vrste	Priporočeno območje preskusnih temperatur (°C)	Priporočena skupna dolžina poskusnih živali (cm) (²)
<i>Danio rerio</i> (¹) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) navadna cebrica	20–25	3,0 ± 0,5
<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) črnoglav pisanec	20–25	5,0 ± 2,0
<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) krap	20–25	8,0 ± 4,0 (³)
<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck in Schlegel) medaka	20–25	4,0 ± 1,0
<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) gupi	20–25	3,0 ± 1,0
<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei Centrarchidae) (Rafinesque) sončni ostriž	20–25	5,0 ± 2,0
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Teleostei Salmonidae) (Walbaum) šarenka	13–17	8,0 ± 4,0
<i>Gasterosteus aculeatus</i> (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) zet	18–20	3,0 ± 1,0

(¹) Meyer idr. (1)

(²) Opozoriti je treba, da se v preskusu po možnosti uporablja teža kot merilo za velikost in izpeljave konstant hitrosti rasti. Vendar je dolžina bolj praktično merilo, če je treba na začetku preskusa ribe izbrati na pogled (tj. iz populacije staleža).

(³) To območje je navedeno v Testing Methods for New Chemical Substances etc. (Preskusne metode za nove kemijske snovi), ki temelji na japonskem zakonu za nadzor kemijskih snovi (CSCL, Chemical Substances Control Law).

Različne rečne in morske vrste so bile manj uporabljene, na primer:

zebrasta grba	(<i>Leiostomus xanthurus</i>)
ovčjeglavi zobati krapovec	(<i>Cyprinodon variegatus</i>)
bibavični gavun	(<i>Menidia beryllina</i>)
svetlikavi ostriž	(<i>Cymatogaster aggregata</i>)
angleška iverka	(<i>Parophrys vetulus</i>)
tihomorski jelenjerogi kapelj	(<i>Leptocottus armatus</i>)
zet	(<i>Gasterosteus aculeatus</i>)
brancin	(<i>Dicentracus labrax</i>)
zelenika	(<i>Alburnus alburnus</i>)

Sladkovodne ribe, navedene v zgornji preglednici, je preprosto gojiti in/ali so na splošno na voljo celo leto, razpoložljivost morskih in rečnih vrst pa je deloma omejena na posamezne države. Lahko se razmnožujejo in gojijo v ribogojnicah ali laboratoriju v pogojih, kjer se nadzorujejo bolezni in zajedavci, zato da bodo poskusne živali zdrave in znanega porekla. Te ribe so na voljo v mnogih predelih sveta.

VIRI

- (1) Meyer A., Biermann C.H. in 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

ČASOVNI RAZPOREDI VZORČENJA ZA PRESKUSE VODNE IN PREHRANSKE IZPOSTAVLJENOSTI

1. Teoretični primer časovnega razporeda vzorčenja za celotni preskus vodne izpostavljenosti za ugotavljanje biokoncentracije snovi z $\log K_{ow} = 4$.

Vzorčenje rib	Časovni razpored vzorčenja		Število vodnih vzorcev ⁽¹⁾	Število rib na vzorec ⁽¹⁾
	Minimalna zahtevana pogostost (v dnevih) ⁽²⁾	Dodatno vzorčenje (v dnevih) ⁽²⁾		
Faza absorpcije				
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 očiščenja				Prenos rib v vodo brez preskusne snovi
7	5,0		2	4
		5,3		(4)
8	5,9		2	4
		7,0		(4)
9	9,3		2	4
		11,2		(4)

Vzorčenje rib	Časovni raspored vzorčenja		Število vodnih vzorcev ⁽¹⁾	Število rib na vzorec ⁽¹⁾
	Minimalna zahtevana pogostost (v dnevih) ⁽²⁾	Dodatno vzorčenje (v dnevih) ⁽²⁾		
Faza absorpcije				
10	14,0		2	4–8 ⁽⁵⁾
		17,5		(4+3) ⁽⁶⁾
SKUPAJ				40–72 (48–80) ⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Vrednosti v oklepajih so števila vzorcev (vode, rib), ki jih je treba vzeti, če se izvede dodatno vzorčenje.

⁽²⁾ Ocena k_2 pred preskusom za $\log K_{ow}$, ki znaša 4,0, je $0,652 \text{ dni}^{-1}$. Skupno trajanje preskusa znaša $3 \times t_{ss} = 3 \times 4,6$ dni, tj. 14 dni. Za oceno t_{ss} glej Dodatek 5.

⁽³⁾ Vodo je treba vzorčiti po najmanj treh zamenjanih prostorninah v komori.

⁽⁴⁾ Te ribe se vzorčijo iz populacije staleža.

⁽⁵⁾ Če je treba izvesti študije z večjo natančnostjo ali študije metabolizma, ki zahtevajo več rib, je treba te vzorčiti zlasti ob koncu faze absorpcije in očiščenja (prim. odstavek 40).

⁽⁶⁾ Za analizo vsebnosti lipidov bodo potrebne vsaj tri dodatne ribe, če ni mogoče uporabiti istih rib, ki so bile vzorčene za koncentracije snovi na začetku preskusa ter ob koncu faze absorpcije in očiščenja. Opozoriti je treba, da se v mnogih primerih lahko uporabijo samo tri kontrolne ribe (prim. odstavek 56).

2. Teoretični primer časovnega rasporeda vzorčenja za preskus prehranske bioakumulacije snovi z desetdnevno fazo absorpcije in 42-dnevno fazo očiščenja

Vzorčenje	Časovni raspored vzorčenja		Število vzorcev hrane	Število rib na vzorec	
	Dan faze	Dodatni vzorci rib?		Preskusna skupina	Kontrolna skupina
Faza absorpcije					
1	0	možni ⁽¹⁾ ⁽²⁾	3 – preskusna skupina	0	5–10
			3 – kontrolna skupina ⁽¹⁾		(8–13) ⁽²⁾
1A ⁽³⁾	1–3			5–10	5–10
2	10	da ⁽⁴⁾	3 – preskusna skupina	10–15 ⁽⁴⁾	5–10
			3 – kontrolna skupina ⁽¹⁾	(13–18) ⁽⁵⁾	(8–13) ⁽⁵⁾
Faza očiščenja					
3	1	da ⁽⁴⁾		10–15 ⁽⁴⁾	5–10
4	2			5–10	5–10
5	4			5–10	5–10

Vzorčenje	Časovni razpored vzorčenja		Število vzorcev hrane	Število rib na vzorec	
	Dan faze	Dodatni vzorci rib?		Preskusna skupina	Kontrolna skupina
Faza absorpcije					
6	7	da ⁽⁴⁾		10–15 ⁽⁴⁾	5–10
7	14			5–10	5–10
8	28			5–10	5–10
9	42	da ⁽⁴⁾		10–15 ⁽⁴⁾ (13–18) ⁽⁵⁾	5–10 (8–13) ⁽⁵⁾
SKUPAJ				59–120 (63–126) ⁽⁴⁾ ⁽⁵⁾	50–110 (56–116) ⁽⁴⁾ ⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Trije vzorci hrane iz kontrolne in preskusne skupine, analizirani glede koncentracij preskusne snovi in vsebnosti lipidov.

⁽²⁾ Ribe se vzorčijo iz populacije staleža čim bližje začetku študije; vsaj tri ribe iz populacije staleža je treba na začetku preskusa vzorčiti za vsebnost lipidov.

⁽³⁾ (Izbirno) vzorčenje v zgodnji fazi absorpcije zagotovi podatke za izračun prehranske asimilacije preskusne snovi, ki jo je mogoče primerjati z učinkovitostjo asimilacije, ki se izračuna iz podatkov o fazi očiščenja.

⁽⁴⁾ Vzorči se lahko pet dodatnih rib za analizo določenega tkiva.

⁽⁵⁾ Za analizo vsebnosti lipidov bodo potrebne vsaj tri dodatne ribe, če ni mogoče uporabiti istih rib, ki so bile vzorčene za koncentracije snovi na začetku preskusa ter ob koncu faze absorpcije in očiščenja. Opozoriti je treba, da se v mnogih primerih lahko uporabijo samo tri kontrolne ribe (prim. odstavka 56 in 153).

Opomba o časovnih razporedih faz in vzorčenja: Faza absorpcije se začne s prvim hranjenjem s hrano z dodatkom. Preskusni dan traja od enega hranjenja do malo pred naslednjim hranjenjem čez 24 ur. Prvo vzorčenje (1 v preglednici) je treba izvesti malo pred prvim hranjenjem (npr. eno uro). Vzorčenje med študijo je treba načeloma izvesti malo pred hranjenjem naslednjega dne (tj. približno 23 ur po hranjenju na dan vzorčenja). Faza absorpcije se konča malo pred prvim hranjenjem s hrano brez dodatka, ko se začne faza očiščenja (preskusna skupina rib bo verjetno še naprej prebavljala hrano z dodatkom v vmesnih 24 urah po zadnjem hranjenju s hrano z dodatkom). To pomeni, je treba vzorec ob koncu faze absorpcije vzeti malo pred prvim hranjenjem s hrano brez dodatka, prvi vzorec v fazi očiščenja pa je treba vzeti približno 23 ur po prvem hranjenju s hrano brez dodatka.

Dodatek 5

SPLOŠNI IZRAČUNI

1. Uvod
2. Napoved trajanja faze absorpcije
3. Napoved trajanja faze očiščenja
4. Zaporedna metoda: določitev konstante hitrosti očiščenja (izgube) k_2
5. Zaporedna metoda: določitev konstante hitrosti absorpcije k_1 (samo za metodo vodne izpostavljenosti)
6. Sočasna metoda za izračun konstant hitrosti absorpcije in očiščenja (izgube) (samo za metodo vodne izpostavljenosti)
7. Popravek glede na razredčitev zaradi rasti za kinetični BKF in BMF
8. Normalizacija lipidov na 5-odstotno vsebnost lipidov (samo za metodo vodne izpostavljenosti)

1. UVOD

Splošni model vodne bioakumulacije v ribah se lahko opiše v smislu procesov absorpcije in izgube, pri čemer se zanemari absorpcija s hrano. Diferencialna enačba (dC_f/dt), ki opisuje hitrost spremembe v koncentraciji v ribah ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dan}^{-1}$), je (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \quad [\text{enačba A5.1}]$$

pri čemer

- k_1 = konstanta hitrosti prvega reda za absorpcijo v ribah ($\text{l kg}^{-1}\cdot\text{dan}^{-1}$).
- k_2 = konstanta hitrosti prvega reda za očiščenje v ribah (dan^{-1}).
- k_g = konstanta hitrosti prvega reda za rast rib („razredčitev zaradi rasti“) (dan^{-1})
- k_m = konstanta hitrosti prvega reda za metabolično transformacijo (dan^{-1})
- k_e = konstanta hitrosti prvega reda za izločanje iztrebkov (dan^{-1})
- C_w = koncentracija v vodi ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$).
- C_f = koncentracija v ribah ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ mokre teže).

Za bioakumulacijske snovi se lahko pričakuje, da je tehtano povprečje v določenem časovnem intervalu (TWA, time-weighted average) najustreznejša koncentracija izpostavljenosti v vodi (C_w) v dovoljenem območju odstopanja (prim. odstavek 24). Priporočeno je, da se tehtano povprečje koncentracije v vodi v določenem časovnem intervalu izračuna v skladu s postopkom iz Dodatka 6 preskusne metode C.20 (2). Opozoriti je treba, da je pretvorba koncentracije v vodi v naravni logaritem ustrezna, ko se pričakuje eksponentno upadanje med obdobji obnavljanja, npr. pri polstatičnem načrtu preskusa. Pri pretočnem sistemu morda ni potrebna pretvorba koncentracij izpostavljenosti v naravni logaritem. Če se izpelje tehtano povprečje koncentracij v vodi v določenem časovnem intervalu, jih je treba navesti v poročilu in uporabiti v nadaljnjih izračunih.

V standardnem preskusu BKF na ribah se lahko absorpcija in očiščenje opišeta v smislu dveh procesov kinetike prvega reda.

$$\text{Hitrost absorpcije} = k_1 \times C_w \quad [\text{enačba A5.2}]$$

$$\text{Skupna hitrost izgube} = (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \quad [\text{enačba A5.3}]$$

V stacionarnem stanju in ob predvidevanju, da sta rast in metabolizem zanemarljiva (tj. vrednosti za k_g in k_m ni mogoče ločiti od nič), je hitrost absorpcije enaka hitrosti očiščenja, zato se z združitvijo enačb A5.2 in A5.3 dobi naslednje razmerje:

$$\text{BCF} = \frac{C_{f-ss}}{C_{w-ss}} = \frac{k_1}{k_2} \quad [\text{enačba A5.4}]$$

pri čemer

C_{f-ss} = koncentracija v ribah v stacionarnem stanju (mg kg⁻¹ mokre teže).

C_{w-ss} = koncentracija v vodi v stacionarnem stanju (mg l⁻¹).

Razmerje k_1/k_2 je znano kot kinetični BKF (BKF_k) in mora biti enako stacionarnemu BKF (BKF_{ss}), ki se pridobi iz razmerja med stacionarno koncentracijo v ribah in to v vodi, vendar lahko pride do odstopanj, če stacionarno stanje ni bilo zagotovo doseženo ali če je bil kinetični BKF popravljen glede na rast. Ampak ker sta k_1 in k_2 konstanti, za izpeljavo BKF_k ni potrebno, da je doseženo stacionarno stanje.

Na podlagi teh enačb prvega reda so v ta Dodatek 5 zajeti splošni izračuni, ki so potrebni za metode vodne in prehranske izpostavljenosti za ugotavljanje bioakumulacije. Oddelki 5, 6 in 8 sicer veljajo samo za metodo vodne izpostavljenosti, ampak so v ta dodatek vključeni kot „splošne“ tehnike. Zaporedne (oddelka 4 in 5) in sočasne (oddelek 6) metode omogočajo izračun konstant absorpcije in očiščenja, ki se uporabijo za izpeljavo kinetičnih BKF. Zaporedna metoda za določanje k_2 (oddelek 4) je pomembna pri prehranski metodi, saj je potrebna za izračun učinkovitosti asimilacije in BMF. V Dodatku 7 so izračuni, ki so značilni za prehransko metodo.

2. NAPOVED TRAJANJA FAZE ABSORPCIJE

Pred izvedbo preskusa se lahko pridobi ocena k_2 in s tem določen odstotek časa, ki je potreben za doseganje stacionarnega stanja, na podlagi empiričnih razmerij med k_2 in porazdelitvenim koeficientom *n*-oktanol/voda (K_{ow}) ali k_1 in BKF. Toda opozoriti je treba, da se enačbe v tem oddelku lahko uporabijo samo, če absorpcija in očiščenje sledita kinetiki prvega reda. Če ji očitno ne sledita in če je treba napovedati trajanje faze absorpcije, je priporočeno poiskati nasvet biostatistika in/ali farmakokinetika.

Oceno k_2 (dan⁻¹) je mogoče dobiti z več metodami. Naslednja empirična razmerja se lahko na primer uporabijo v prvem primeru ⁽¹⁾:

$$\log k_2 = 1,47 - 0,414 \log K_{ow} \quad (r^2=0,95) [(3); \text{enačba A5.5}]$$

ali

$$k_2 = \frac{k_1}{\text{BCF}} \quad [\text{enačba A5.6}]$$

$$\text{pri čemer (za snovi z } \log K_{ow} > 3) \quad (r^2=0,85) [(4); \text{enačba A5.7}]$$

$$\text{in } \text{BCF} = 10^{(0,910 \cdot \log K_{ow} - 1,975 \cdot \log(6,8 \cdot 10^{-7} K_{ow} + 1) - 0,786)} \quad (r^2=0,90) [(5); \text{enačba A5.8}]$$

⁽¹⁾ Kot pri vsakem empiričnem razmerju je treba preveriti, da je preskusna snov v območju uporabe razmerja.

W = povprečna teža tretirane ribe (v gramih mokre teže) ob koncu/začetku očiščenja ⁽¹⁾

Za druga zadevna razmerja glej (6). Morda je za oceno k_2 bolje uporabiti kompleksnejše modele, če lahko na primer najverjetneje pride do precejšnjega metabolizma (7) (8). Toda bolj kot je kompleksen model, previdneje je treba razlagati napovedi. Prisotnost nitro skupin lahko na primer kaže na hiter metabolizem, vendar ne vedno. Uporabnik mora torej pri načrtovanju študije pretehtati rezultate metode napovedovanja glede na kemijsko strukturo in druge pomembne informacije (na primer predhodne študije).

Čas, ki je potreben za doseganje določenega odstotka stacionarnega stanja, se lahko pridobi tako, da se uporabi ocena k_2 na podlagi splošne kinetične enačbe, ki opisuje absorpcijo in očiščenje (kinetika prvega reda), pri čemer se predvideva, da sta rast in metabolizem zanemarljiva. Če med študijo pride do precejšnje rasti, ocene, opisane v nadaljevanju, ne bodo zanesljive. V takih primerih je bolje uporabiti k_{2g} , popravljeno glede na rast, kot je opisano v nadaljevanju (glej oddelek 7 tega Dodatka):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_w - k_2 C_f \quad \text{[enačba A5.9]}$$

ali, če je C_w konstanten:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{[enačba A5.10]}$$

Ko se koncentracija približa stacionarnemu stanju ($t \rightarrow \infty$), se lahko enačba A5.10 okrajša (prim. (9) (10)) na:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \quad \text{[enačba A5.11]}$$

ali

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = BCF \quad \text{[enačba A5.12]}$$

Potem je $BKF \times C_w$ približek koncentracije v ribi v stacionarnem stanju (C_{f-ss}). [Opomba: enak pristop se lahko uporabi za oceno stacionarnega BMF pri prehranskem preskusu. V tem primeru se v navedenih enačbah BKF nadomesti z BMF, C_w pa z C_{hrana} , koncentracija v hrani.]

Enačba A5.10 se lahko zapiše kot:

$$C_f = C_{f-ss} (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{[enačba A5.13]}$$

ali

$$\frac{C_f}{C_{f-ss}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad \text{[enačba A5.14]}$$

Ob uporabi enačbe A5.14 je mogoče napovedati čas, ki je potreben za doseganje določenega odstotka stacionarnega stanja, kadar se k_2 predhodno oceni z enačbo A5.5 ali A5.6.

Kot smernica se lahko upošteva, da je statistično optimalno trajanje faze absorpcije za pridobivanje statistično sprejemljivih podatkov (BKF_k) to obdobje, ki je potrebno, da krivulja logaritma koncentracije preskusne snovi v ribi, grafično prikazana v odvisnosti od linearnega časa, doseže vsaj 50-odstotno stacionarno stanje (tj. $0,69/k_2$), ampak ne več kot 95-odstotno stacionarno stanje (tj. $3,0/k_2$) (11). Če kopičenje snovi doseže več kot 95-odstotno stacionarno stanje, postane izračun BKF_{ss} izvedljiv.

⁽¹⁾ Teža ribe ob koncu faze absorpcije se lahko oceni na podlagi podatkov preteklih študij ali znanja o najverjetnejšem povečanju velikosti za preskusno vrsto na podlagi običajne teže ob začetku preskusa in običajnega trajanja absorpcije (npr. 28 dni).

Čas, ki je potreben za doseganje 80-odstotnega stacionarnega stanja (z uporabo enačbe A5.14), je:

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t} \quad [\text{enačba A5.15}]$$

ali

$$t_{80} = \frac{-\ln(0,20)}{k_2} = \frac{1,6}{k_2} \quad [\text{enačba A5.16}]$$

In podobno, čas, ki je potreben za doseganje 95-odstotnega stacionarnega stanja, je:

$$t_{95} = \frac{-\ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2} \quad [\text{enačba A5.17}]$$

Na primer trajanje faze absorpcije (tj. čas, da se doseže določen odstotek stacionarnega stanja, npr. t_{80} ali t_{95}) za preskusno snov z $\log K_{OW} = 4$ bi znašalo (z uporabo enačbe A5.5, A5.16 in A5.17):

$$\log k_2 = 1,47 - 0,414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0,652 \text{ dni}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1,6}{0,652} = 2,45 \text{ dneva (59 ur)}$$

$$\text{ali } t_{95} = \frac{3,0}{0,652} = 4,60 \text{ dneva (110 ur)}$$

Uporabi se lahko tudi izraz

$$t_{ess} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{OW} + 55,31 \text{ (ur)} \quad [\text{enačba A5.18}]$$

za izračun časa, ki je potreben za doseganje dejanskega stacionarnega stanja (t_{ess}) (12). Za preskusno snov z $\log K_{OW} = 4$ je rezultat:

$$t_{ess} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55,31 = 121 \text{ ur}$$

3. NAPOVED TRAJANJA FAZE OČIŠČENJA

Napoved časa, ki je potreben za zmanjšanje obremenitve telesa na določen odstotek začetne koncentracije, se tudi lahko pridobi s splošno enačbo, ki opisuje absorpcijo in očiščenje (ki sledita kinetiki prvega reda, prim. enačba A5.9 (1) (13).

Za fazo očiščenja se predvideva, da je C_w (ali C_{hrana} pri prehranskem preskusu) nič. Enačba se lahko nato okrajša na:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f \quad [\text{enačba A5.19}]$$

ali

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \quad [\text{enačba A5.20}]$$

pri čemer je $C_{f,0}$ koncentracija na začetku faze očiščenja.

50-odstotno očiščenje bo nato doseženo v času (t_{50}):

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

ali

$$t_{50} = \frac{-\ln(0,50)}{k_2} = \frac{0,693}{k_2}$$

In podobno, 95-odstotno očiščenje bo doseženo v:

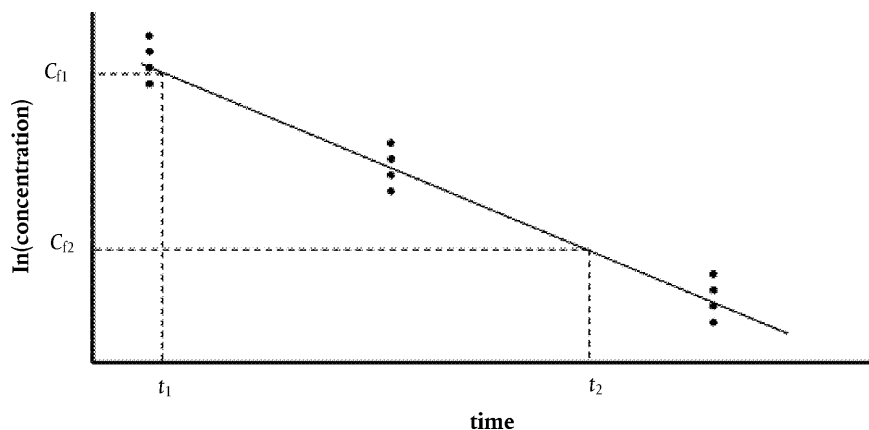
$$t_{95} = \frac{-\ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2}$$

Če se za prvo obdobje uporabi 80-odstotna absorpcija ($1,6/k_2$) in 95-odstotna izguba v fazi očiščenja ($3,0/k_2$), potem faza očiščenja traja približno dvakrat dlje kot faza absorpcije.

Opozoriti je treba, da ocene temeljijo na predvidevanju, da vzorca absorpcije in očiščenja sledita kinetiki prvega reda. Če kinetika prvega reda očitno ni upoštevana, te ocene niso veljavne.

4. ZAPOREDNA METODA: DOLOČITEV KONSTANTE HITROSTI OČIŠČENJA (IZGUBE) K_2

Za večino biokoncentracijskih podatkov se predvideva, da se „ustrezno“ opišejo s preprostim dvodelnim/dvoparametrskim modelom, kot je nakazano s premočrtno krivuljo, ki se približuje točkam za koncentracijo v ribah (na lestvici naravnega logaritma (\ln)) med fazo očiščenja.



Opozoriti je treba, da lahko odstopanja od ravne linije kažejo na bolj zapleten vzorec očiščenja, kot je kinetika prvega reda. Za ugotavljanje vrst očiščenja, ki odstopajo od kinetike prvega reda, se lahko uporabi grafična metoda.

Za izračun k_2 za več časovnih točk (vzorčenja) se izvede linearna regresija $\ln(\text{koncentracije})$ v odvisnosti od časa. Naklon regresijske premice je ocena konstante hitrosti očiščenja k_2 ⁽¹⁾. Iz osnega odseka je preprosto izračunati povprečno koncentracijo v ribah na začetku faze očiščenja ($C_{0,d}$; ki je enaka povprečni koncentraciji v ribah ob koncu faze absorpcije (vključno z dovoljenimi stopnjami napake)) ⁽¹⁾:

$$C_{0,d} = e^{\text{intercept}}$$

[enačba A5.21]

⁽¹⁾ V večini programov, ki omogočajo linearno regresijo, je mogoče ugotoviti tudi standardne napake in interval zaupanja (CI, confidence interval) za ocene, npr. v Microsoft Excelu z uporabo zbirke orodij Analiza podatkov.

Za izračun k_2 , ko sta na voljo samo dve časovni točki (vzorčenja) (kot pri minimiziranem načrtu), se nadomestita dve povprečni koncentraciji v naslednji enačbi

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}) - \ln(C_{f2})}{t_2 - t_1} \quad [\text{enačba A5.22}]$$

pri čemer sta $\ln(C_{f1})$ in $\ln(C_{f2})$ naravna logaritma koncentracij v časovnih točkah t_1 in t_2 , t_2 in t_1 pa sta časovni točki, ko sta bila odvzeta ta dva vzorca glede na začetek očiščenja ⁽¹⁾.

5. ZAPOREDNA METODA: DOLOČITEV KONSTANTE HITROSTI ABSORPCIJE K_1 (SAMO ZA METODO VODNE IZPOSTAVLJENOSTI)

Za iskanje vrednosti k_1 na podlagi nabora podatkov o koncentracijah v zaporednih časovnih točkah za fazo absorpcije, se uporabi računalniški program, ki ustreza naslednjemu modelu:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{enačba A5.23}]$$

pri čemer se k_2 pridobi s prejšnjim izračunom, $C_f(t)$ in $C_w(t)$ pa sta koncentraciji v ribah oziroma vodi ob času t .

Za izračun k_1 , ko sta na voljo samo dve časovni točki (vzorčenja) (kot pri minimiziranem načrtu), se uporabi naslednja enačba:

$$k_1 = \frac{C_f \cdot k_2}{C_w(1 - e^{-k_2 t})} \quad [\text{enačba A5.24}]$$

pri čemer se k_2 pridobi s prejšnjim izračunom, C_f je koncentracija v ribah na začetku faze očiščenja, C_w pa je povprečna koncentracija v vodi med fazo absorpcije ⁽²⁾.

Vizualni pregled naklonov k_1 in k_2 , ko sta konstanti grafično prikazani v odvisnosti od izmerjenih podatkov o točkah vzorčenja, se lahko uporabi za oceno prileganja podatkov. Če se izkaže, da je zaporedna metoda zagotovila slabo oceno za k_1 , je za izračun k_1 in k_2 treba uporabiti sočasni pristop (glej naslednji oddelek 6). Pridobljene naklone je treba znova primerjati z grafičnim prikazom izmerjenih podatkov, da se vizualno pregleda prileganje podatkov. Če je prileganje podatkov še vedno slabo, lahko to pomeni, da fazi ne sledita kinetiki prvega reda in da je treba uporabiti kompleksnejše modele.

6. SOČASNA METODA ZA IZRAČUN KONSTANT HITROSTI ABSORPCIJE IN OČIŠČENJA (IZGUBE) (SAMO ZA METODO VODNE IZPOSTAVLJENOSTI)

Za ugotavljanje vrednosti k_1 in k_2 se lahko uporabijo računalniški programi na podlagi nabora podatkov o koncentracijah v zaporednih časovnih točkah in modela:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{enačba A5.25}]$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_c \quad [\text{enačba A5.26}]$$

pri čemer

t_c = čas ob koncu faze absorpcije.

⁽¹⁾ V nasprotju z metodo linearne regresije se s to enačbo ne pridobi standardne napake za k_2 .

⁽²⁾ V nasprotju s postopkom linearne prilagajanja se s to metodo običajno ne pridobi standardne napake ali intervala zaupanja za oceno k_1 .

Ta pristop neposredno zagotovi standardne napake za oceni k_1 in k_2 . Kadar se k_1/k_2 nadomesti z BKF (prim. enačba A5.4) v enačbi A5.25 in A5.26, se lahko ocenita tudi standardna napaka in 95-odstotni interval zaupanja BKF. To je še zlasti uporabno, kadar se primerjajo različne ocene zaradi pretvorbe podatkov. Za odvisno spremenljivko (koncentracija v ribah) se lahko uporabi pretvorba v naravni logaritem ali ne, nato pa se lahko oceni negotovost BKF.

Ker je med parametroma k_1 in k_2 tesna povezava, če se ocenita sočasno, je morda priporočljivo najprej izračunati k_2 samo na podlagi podatkov o očiščenju (glej zgoraj); k_2 se v večini primerov lahko oceni na podlagi krivulje očiščenja z razmeroma visoko natančnostjo. k_1 se lahko nato izračuna na podlagi podatkov o absorpciji z nelinearno regresijo ⁽¹⁾. Pri zaporednem prilagajanju je priporočeno uporabiti enako pretvorbo podatkov.

Vizualni pregled pridobljenih naklonov, ko sta grafično prikazana v odvisnosti od izmerjenih podatkov o točkah vzorčenja, se lahko uporabi za oceno prileganja podatkov. Če se izkaže, da je ta metoda zagotovila slabo oceno za k_1 , se lahko za izračun k_1 in k_2 uporabi sočasni pristop. Prilagojeni model je treba znova primerjati z grafičnim prikazom izmerjenih podatkov, da se vizualno pregleda prileganje podatkov in pridobljene ocene parametrov za k_1 , k_2 in dobljeni BKF, njihove standardne napake in/ali intervale zaupanja pa je treba primerjati z različnimi vrstami prileganja.

Če se podatki slabo prilegajo, lahko to pomeni, da fazi ne sledita kinetiki prvega reda in da je treba uporabiti kompleksnejše modele. Eden od najpogostejših zapletov je rast rib med preskusom.

7. POPRAVEK GLEDE NA RAZREDČITEV ZARADI RASTI ZA KINETIČNI BKF IN BMF

V tem oddelku je opisana standardna metoda za popravljanje vrednosti zaradi rasti rib med preskusom (ki se imenuje „razredčitev zaradi rasti“), ki je veljavna samo, kadar fazi sledita kinetiki prvega reda. Če se ugotovi, da fazi ne sledita kinetiki prvega reda, je za ustrezni popravek glede na razredčitev zaradi rasti priporočeno poiskati nasvet biostatistika ali uporabiti pristop, ki temelji na masi in je opisan v nadaljevanju.

V nekaterih primerih je za to metodo za popravljanje glede na razredčitev zaradi rasti značilno pomanjkanje natančnosti, včasih pa ne deluje (na primer za snovi, ki se očiščujejo zelo počasi in se preskušajo na ribah, ki hitro rastejo, je lahko izpeljana konstanta hitrosti očiščenja, popravljena glede na razredčitev zaradi rasti, k_{2g} , zelo majhna, zato napaka v dveh konstantah rasti, ki se uporabita za njeno izpeljavo, postane ključnega pomena, v nekaterih primerih pa so lahko ocene k_g višje od k_2). V takih primerih se lahko uporabi drug pristop (tj. pristop, ki temelji na masi), ki deluje tudi takrat, ko snov ne sledi kinetiki rasti prvega reda, in ki odpravi potrebo po popravljanju. Ta pristop je opisan na koncu tega oddelka.

Metoda odštevanja s konstanto hitrosti rasti za popravljanje glede na rast

Pri standardni metodi se vsi podatki o posameznih težah in dolžinah pretvorijo v naravne logaritme, $\ln(\text{teža})$ ali $\ln(1/\text{teža})$ pa se grafično prikaže v odvisnosti od časa (dan) ločeno za tretirane in kontrolne skupine. Enak postopek se izvede ločeno za podatke o fazi absorpcije in očiščenja. Na splošno je za popravek glede na razredčitev zaradi rasti ustrežneje uporabiti podatke o teži iz celotne študije, da se izpelje konstanta hitrosti rasti (k_g), statistično značilne razlike med konstantama hitrosti rasti, izpeljanimi za fazo absorpcije in očiščenja, pa lahko pokažejo, da je treba uporabiti konstanto hitrosti faze očiščenja. Skupne hitrosti rasti iz študij vodne izpostavljenosti za preskusne in kontrolne skupine se lahko uporabijo za preverjanje kakršnih koli učinkov, povezanih z tretiranjem.

⁽¹⁾ Vedeti je treba, da se negotovost pri oceni k_2 ne uporablja ustrezno pri bioakumulacijskem modelu, saj se v bistvu obravnava kot konstanta za prilagajanje k_1 v metodi zaporednega prilagajanja. Pridobljena negotovost BKF je torej drugačna pri metodah sočasnega in zaporednega prilagajanja.

Izračuna se linearna korelacija po metodi najmanjših kvadratov za $\ln(\text{teža ribe})$ v odvisnosti od dneva (in za $\ln(1/\text{teža})$ v odvisnosti od dneva) za vsako skupino (preskusna in kontrolna skupina, podatki o posameznih ribah in ne dnevne povprečne vrednosti) za celotno študijo, za fazo absorpcije in očiščenja, pri čemer se uporabijo standardni statistični postopki. Izračunajo se variance v naklonih črt in uporabijo za ovrednotenje statistične značilnosti ($p = 0,05$) razlike v naklonih (konstanti hitrosti rasti) s Studentovim t-testom (ali analizo variance, če se preskuša več koncentracij). Za namene popravljanja glede na rast se po možnosti uporabijo podatki o teži. Podatki o dolžini, obdelani enako, so lahko uporabni za primerjanje kontrolne in preskusne skupine, da se preverijo učinki, povezani s tretiranjem. Če ni statistično značilne razlike v analizi podatkov o teži, se lahko združijo preskusni in kontrolni podatki ter izračuna skupna konstanta hitrosti rasti rib za študijo (k_g) kot skupni naklon linearne korelacije. Če se ugotovijo statistično značilne razlike, se konstante hitrosti rasti za vsako skupino rib in/ali fazo študije navedejo ločeno. Konstanto hitrosti za vsako tretirano skupino je nato treba uporabiti za namene popravljanja glede na razredčitev zaradi rasti za to skupino. Če so bile opažene statistične razlike med konstantama hitrosti absorpcije in očiščenja, je treba uporabiti konstante hitrosti, izpeljane iz faze očiščenja.

Izračunano konstanto hitrosti rasti (k_g , izraženo z dan^{-1}) se lahko odšteje od skupne konstante hitrosti očiščenja (k_2), da se dobi konstanta hitrosti očiščenja, k_{2g} .

$$k_{2g} = k_2 - k_g \quad \text{[enačba A5.27]}$$

Konstanto hitrosti absorpcije se deli s konstanto hitrosti očiščenja, popravljeno glede na rast, da se dobi kinetični BKF, popravljen glede na rast, ki se izrazi z BKF_{k_g} (ali BMF_{k_g}).

$$\text{BCF}_{k_g} = \frac{k_1}{k_{2g}} \quad \text{[enačba A5.28]}$$

Konstanta hitrosti rasti, izpeljana za prehransko študijo, se uporabi v enačbi A7.5 za izračun BMF_{k_g} , popravljenega glede na rast (prim. Dodatek 7).

Metoda, ki temelji na masi, za popravljanje glede na rast

Metoda, ki nadomešča že opisano „metodo odštevanja s konstanto hitrosti rast“ in odpravlja potrebo po popravljanju na podlagi rasti, se lahko uporabi, kot je opisano v nadaljevanju. Po tem načelu se namesto koncentracije uporabijo podatki o očiščenju glede na maso cele ribe.

Koncentracije v tkivu iz faze očiščenja (masa preskusne snovi/masna enota ribe) se pretvorijo v maso preskusne snovi/riba: koncentracije in teže posameznih rib se povežejo v preglednici (npr. z računalniškim programom za obdelavo preglednic) in vsaka koncentracija se pomnoži s skupno težo ribe za to meritev, da se pridobi nabor mas preskusne snovi/riba za vse vzorce iz faze očiščenja.

Dobljeni naravni logaritem podatkov o masi snovi se grafično prikaže v odvisnosti od časa za preskus (faza očiščenja), kot običajno.

Za metodo vodne izpostavljenosti se kot običajno izpelje konstanta hitrosti absorpcije (glej oddelke 4 in 6) (opozoriti je treba, da je treba uporabiti „normalno“ vrednost k_2 v enačbah za prilagajanje krivulje za k_1), iz navedenih podatkov pa se izpelje konstanta hitrosti očiščenja. Ker je dobljena vrednost za konstanto hitrosti očiščenja neodvisna od rasti, saj je bila izpeljana glede na maso cele ribe, jo je treba poimenovati k_{2g} in ne k_2 .

8. NORMALIZACIJA LIPIDOV NA 5-ODSTOTNO VSEBNOST LIPIDOV (SAMO ZA METODO VODNE IZPOSTAVLJENOSTI)

V poročilu je treba navesti tudi rezultate (kinetičnega in stacionarnega) BKF iz preskusa vodne izpostavljenosti glede na privzeto vsebnost lipidov v ribah, ki znaša 5 % mokre teže, razen če je mogoče utemeljiti, da se preskusna snov primarno ne kopiči v lipidih (npr. nekatere perfluorirane snovi se lahko vežejo na proteine). Podatke o koncentraciji v ribah ali BKF je treba pretvoriti glede na 5-odstotno vsebnost lipidov na mokro težo. Če so bile za meritve koncentracije snovi in vsebnosti lipidov v vseh točkah vzorčenja uporabljene iste ribe, je treba vsako posamezno izmerjeno koncentracijo v ribi popraviti glede na vsebnost lipidov v tej ribi.

$$C_{fL} = \frac{0,05}{L} \cdot C_f \quad \text{[enačba A5.29]}$$

pri čemer

C_{fL} = koncentracija v ribi, normalizirana glede na lipide (mg kg⁻¹ mokra teža)

L = delež lipidov (glede na mokro težo)

C_f = koncentracija preskusne snovi v ribah (mg kg⁻¹ mokra teža)

Če analiza lipidov ni bila izvedena na vseh vzorčenih ribah, se za normalizacijo BKF uporabi povprečna vrednost lipidov. Za stacionarni BKF je treba uporabiti povprečno vrednost, zabeleženo ob koncu faze absorpcije v tretirani skupini. Za normalizacijo kinetičnega BKF je v nekaterih primerih morda bolje uporabiti drugačen pristop, na primer če se je med fazo absorpcije ali očiščenja vsebnost lipidov precej spremenila. V vsakem primeru pa je treba vedno uporabiti stopnjo hranjenja, ki čim bolj zmanjša velike spremembe v vsebnosti lipidov.

$$BCF_{KL} = \frac{0,05}{L_n} \cdot BCF_K \quad \text{[enačba A5.30]}$$

pri čemer

BCF_{KL} = kinetični BKF, normaliziran glede na lipide (L kg⁻¹)

L_n = povprečni delež lipidov (glede na mokro težo)

BCF_K = kinetični BKF (L kg⁻¹)

VIRI

- (1) Arnot J. A. in Gobas F. A. P. C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2343-2355.
- (2) Poglavje C.20 te priloge, *Preskus razmnoževanja vrste Daphnia magna*.
- (3) Spacie A. in 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. in 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. in 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, Dansk.
 - (7) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. in 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. Na voljo na: 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. in 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, ZDA: 243-255.
 - (11) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. in 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. in Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22: 701-707.
 - (13) Konemann H. in van Leeuwen K. (1980), Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. *Chemosphere.* 9: 3-19.
-

Dodatek 6

ODDELEK Z ENAČBAMI ZA PRESKUS VODNE IZPOSTAVLJENOSTI: MINIMIZIRAN NAČRT PRESKUSA

Razlog za ta pristop je, da se lahko biokonzentracijski faktor v popolnem preskusu določi kot stacionarni biokonzentracijski faktor (BKF_{SS}), tako da se izračuna razmerje med koncentracijo preskusne snovi v ribjem tkivu in koncentracijo preskusne snovi v vodi, ali z izračunom kinetičnega biokonzentracijskega faktorja (BKF_k), ki je razmerje med konstanto hitrosti absorpcije k_1 in konstanto hitrosti očiščenja k_2 . BKF_k je veljaven, čeprav med absorpcijo ni dosežena stacionarna koncentracija snovi, če absorpcija in očiščenje približno sledita kinetičnim procesom prvega reda.

Če se meritev koncentracije snovi v tkivih (C_{f1}) opravi ob koncu izpostavljenosti (t_1) in se koncentracija v tkivu (C_{f2}) znova izmeri po določenem časovnem obdobju (t_2), se lahko konstanta hitrosti očiščenja (k_2) oceni z enačbo A5.22 iz Dodatka 5.

Konstanta hitrosti absorpcije, k_1 , se lahko nato določi algebrsko z enačbo A5.23 iz Dodatka 5 (pri čemer je C_f enak C_{f1} , t pa je enak t_1) (1). Kinetični biokonzentracijski faktor za minimiziran načrt preskusa (ki se imenuje BKF_{km} , da ga je mogoče ločiti od kinetičnih biokonzentracijskih faktorjev, ki se določajo z drugimi metodami) je torej:

$$BCF_{km} = \frac{k_1}{k_2} \quad \text{[enačba A6.1]}$$

Koncentracije ali rezultate je treba popraviti glede na razredčitev zaradi rasti in normalizirati na 5-odstotno vsebnost lipidov v ribah, kot je opisano v Dodatku 5.

Minimiziran BKF_{SS} je BKF , izračunan ob koncu faze absorpcije ob predvidevanju, da je bilo doseženo stacionarno stanje. To je mogoče zgolj predvideti, saj število točk vzorčenja ni zadostno, da se lahko dokaže.

$$\text{minimizirani } BCF_{SS} = \frac{C_{f - minSS}}{C_{w - minSS}} \quad \text{[enačba A6.2]}$$

pri čemer

$C_{f-minSS}$ = koncentracija v ribah ob predvidenem stacionarnem stanju na koncu absorpcije (mg kg^{-1} mokra teža).

$C_{w-minSS}$ = koncentracija v vodi ob predvidenem stacionarnem stanju na koncu absorpcije (mg l^{-1}).

VIRI

(1) Springer T. A., Guiney P. D., Krueger H. O. in Jaber M. J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2271–2280.

Dodatek 7

ODDELEK Z ENAČBAMI ZA PRESKUS PREHRANSKE IZPOSTAVLJENOSTI:

1. Primer količin za sestavine ustrezne ribje hrane, dostopne na trgu
2. Primeri tehnik dodajanja snovi v hrano
3. Izračun učinkovitosti asimilacije in biomagnifikacijskega faktorja
4. Popravljanje glede na lipide
5. Vrednotenje razlik med izmerjeno koncentracijo ob času nič ($C_{0,m}$) in izpeljano koncentracijo ob času nič ($C_{0,d}$)
6. Smernice za preskusne snovi, ki se očiščujejo zelo hitro

1. PRIMER KOLIČIN ZA SESTAVINE USTREZNE RIBJE HRANE, DOSTOPNE NA TRGU

glavna sestavina	ribja moka
surove beljakovine	$\leq 55,0 \%$
surove maščobe	$\leq 15,0 \%$ ⁽¹⁾
surove vlaknine	$\geq 2,0 \%$
vlaga	$\geq 12 \%$
pepel	$\geq 8 \%$

⁽¹⁾ Na nekaterih območjih je morda dostopna samo ribja hrana s koncentracijo lipidov, ki je veliko nižja od te zgornje meje. V takih primerih je treba študije primerov izvesti s to nižjo koncentracijo lipidov v hrani, ki je bila dostopna, in ustrezno prilagoditi stopnjo hranjenja za ohranjanje zdravja rib. Lipidov v hrani se ne sme umetno povečati z dodajanjem odvečnega olja.

2. PRIMERI TEHNIK DODAJANJA SNOVI V HRANO

Splošne točke

Kontrolna hrana mora biti pripravljena na povsem enak način kot hrana z dodatkom, vendar brez preskusne snovi.

Za preverjanje koncentracije tretirane hrane je treba ekstrahirati tri vzorce odmerjene hrane z ustrežno metodo ekstrakcije in izmeriti koncentracijo preskusne snovi ali radioaktivnost v ekstraktih. Dokazati je treba visoke analitske izkoristke ($> 85 \%$) z majhnimi razlikami med vzorci (tri koncentracije vzorcev snovi, vzeti ob začetku preskusa, ne smejo odstopati več kot $\pm 15 \%$ od povprečja).

Med prehranskim preskusom je treba zbrati tri vzorce hrane za analizo na dan 0 in ob koncu faze absorpcije, da se določi vsebnost preskusne snovi v hrani.

Priprava ribje hrane s (čistim) tekočim preskusnim materialom

Določi se ciljna, nominalna preskusna koncentracija v tretirani ribji hrani, na primer 500 µg preskusne snovi/g hrana. Doda se ustrezna količina (molska masa ali določena radioaktivnost) čiste preskusne snovi k znani masi ribje hrane v steklenem kozarcu ali rotacijski uparjalni bučki. Masa ribje hrane mora biti zadostna za trajanje faze absorpcije (ob upoštevanju potrebe po naraščajočih količinah za vsako hranjenje zaradi rasti rib). Ribja hrana/preskusna snov se mora čez noč mešati s počasnim prevračanjem (npr. z mešalno napravo z rotacijskim stojalom ali z rotacijo, če se uporabi rotacijska uparjalna bučka). Hrano z dodatkom je treba do uporabe shranjevati pod pogoji, ki ohranjajo obstojnost preskusne snovi v mešanici hrane (npr. hlajenje).

Priprava ribje hrane z vehiklom v obliki koruznega ali ribjega olja

Trdne preskusne snovi je treba zmleti v terilnici v fin prah. Tekoče preskusne snovi se lahko dodajo neposredno v koruzno ali ribje olje. Preskusna snov se raztopi v znani količini koruznega ali ribjega olja (npr. 5–15 ml). Odmerjeno olje se količinsko prenese v rotacijsko uparjalno bučko ustrezne velikosti. Bučko, v kateri je bilo pripravljeno odmerjeno olje, je treba sprati z dvema majhnima enakima količinama olja in ju dodati v rotacijsko uparjalno bučko, da se zagotovi prenos celotne raztopljene preskusne snovi. Za zagotovitev popolne raztopljenosti/razpršitve v olju (ali če se v študiji uporablja več preskusnih snovi) se doda mikromešalnik, bučka se zamaši in zmes se čez noč hitro meša. V bučko se doda ustrezna količina ribje hrane (običajno v obliki peletov) za preskus in vsebina bučke se enakomerno zmeša z neprestanim obračanjem steklene bučke vsaj 30 minut, po možnosti pa čez noč. Potem se hrana z dodatkom ustrezno shrani (npr. da na hladno), da se zagotovi obstojnost preskusne snovi v hrani do uporabe.

Priprava ribje hrane z organskim topilom

Ustrezna količina preskusne snovi (molska masa ali določena radioaktivnost), ki je zadostna, da se doseže ciljni odmerek, se raztopi v ustreznem organskem topilu (npr. cikloheksan ali aceton; 10–40 ml ali po potrebi več glede na količino hrane, ki ji je treba dodati preskusno snov). Del te raztopine ali vsa raztopina (ki se doda glede na odmerek) se zmeša z ustrezno maso ribje hrane, ki je zadostna, da se doseže zahtevani nominalni odmerek v preskusu. Hrana/preskusna snov se lahko zmeša v posodi za mešanje iz nerjavnega jekla in sveže odmerjena ribja hrana se dva dni pusti v posodi v laboratorijskem digestoriju (in se občasno zmeša), da izhlapi odvečno topilo, ali pa se zmeša v rotacijski uparjalni bučki z neprestanim vrtenjem. Odvečno topilo se lahko po potrebi „odpihne“ s tokom zraka ali dušika. Skrbno je treba zagotoviti, da preskusna snov med odstranjevanjem topila ne kristalizira. Hrano z dodatkom je treba shranjevati pod pogoji (npr. hlajenje), ki ohranjajo obstojnost preskusne snovi v mešanici hrane do uporabe.

3. IZRAČUN UČINKOVITOSTI ASIMILACIJE IN BIOMAGNIFIKACIJSKEGA FAKTORJA

Za izračun učinkovitosti asimilacije je treba najprej oceniti skupno konstanto hitrosti očiščenja v skladu z oddelkom 4 iz Dodatka 5 (z „zaporedno metodo“, tj. standardno linearno regresijo), pri čemer se uporabijo povprečne koncentracije vzorcev iz faze očiščenja. Konstanta stopnje hranjenja, I , in trajanje absorpcije, t , sta znana parametra študije. C_{hrana} , povprečna izmerjena koncentracija preskusne snovi v hrani, je izmerjena spremenljivka v študiji. $C_{0,d}$, koncentracija preskusne snovi v ribah ob koncu faze absorpcije, se običajno izpelje iz osnega odseka v grafičnem prikazu $\ln(\text{koncentracije})$ v odvisnosti od dneva očiščenja.

Učinkovitost asimilacije snovi (a , absorpcija preskusne snovi v črevesju) se izračuna kot:

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{hrana}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \quad [\text{enačba A7.1}]$$

pri čemer

$C_{0,d}$ = izpeljana koncentracija v ribah ob času nič faze očiščenja (mg kg^{-1});

k_2 = skupna konstanta hitrosti očiščenja (ki ni popravljena glede na rast) (dan^{-1}), izračunana z enačbami iz Dodatka 5, oddelek 3;

I = konstanta hitrosti zaužitja hrane (g hrana g^{-1} riba dan^{-1});

C_{hrana} = koncentracija v hrani (mg kg^{-1} hrana);

t = trajanje obdobja hranjenja (dan)

Morda pa je treba prilagoditi stopnjo hranjenja, I , ki se uporabi pri izračunu, glede na rast rib, da se pridobi točna učinkovitost asimilacije, a . Pri preskusu, v katerem ribe precej rastejo med fazo absorpcije (količine hrane, da bi se ohranila določena stopnja hranjenja, pa se med to fazo ne prilagodijo), je dejanska stopnja hranjenja ob nadaljevanju faze absorpcije nižja kot ta, ki je bila določena, kar pomeni višjo „dejansko“ učinkovitost asimilacije. (Opozoriti je treba, da to ni pomembno za skupni izračun BMF, saj se parametri I dejansko izničijo v enačbi A7.1 in A7.4). Povprečna stopnja hranjenja, popravljena glede na razredčitev zaradi rasti, I_g , se lahko izpelje na več načinov, ampak najbolj enostaven in natančen je ta, pri katerem se uporabi znana konstanta hitrosti rasti (k_g), da se ocenijo teže preskusnih rib v časovnih točkah med fazo absorpcije, tj.:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g t} \quad [\text{enačba A7.2}]$$

pri čemer

$W_f(t)$ = povprečna teža ribe na dan absorpcije t

$W_{f,0}$ = povprečna teža ribe na začetku preskusa

Na ta način se lahko oceni (vsaj) povprečna teža rib na zadnji dan izpostavljenosti ($W_{f,\text{konec absorpcije}}$). Ker je bila stopnja hranjenja določena glede na $W_{f,0}$, se lahko dejanska stopnja hranjenja za vsak dan absorpcije izračuna s tema dvema vrednostma teže. Stopnja hranjenja, popravljena glede na rast, I_g (g hrana g^{-1} riba dan^{-1}), ki se uporabi namesto I v primerih hitre rasti med fazo absorpcije, se lahko nato izračuna kot

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{f,\text{konec absorpcije}}} \quad [\text{enačba A7.3}]$$

Ko se pridobi učinkovitost asimilacije, se lahko izračuna BMF, tako da se jo pomnoži s konstanto stopnje hranjenja I (ali I_g , če se je uporabila za izračun a) in deli produkt s skupno konstanto hitrosti očiščenja, k_2 :

$$\text{BMF} = \frac{I \times a}{k_2} \quad [\text{enačba A7.4}]$$

Na enak način je treba izračunati tudi biomagnifikacijski faktor, popravljen glede na rast, tako da se uporabi konstanta hitrosti očiščenja, popravljena glede na rast (kot je izpeljana v oddelku 7 iz Dodatka 5). Če je bila I_g uporabljena za izračun a , jo je treba uporabiti tudi tukaj namesto I :

$$\text{BMF} = \frac{I \times a}{k_{2g}} \quad [\text{enačba A7.5}]$$

pri čemer

α = učinkovitost asimilacije (absorpcija preskusne snovi v črevesju);

k_2 = skupna konstanta hitrosti očiščenja (ki ni popravljena glede na rast) (dan^{-1}), izračunana z enačbami iz Dodatka 5, oddelek 3;

k_{2g} = konstanta hitrosti očiščenja, popravljena glede na rast (dan^{-1});

I = konstanta hitrosti zaužitja hrane (g hrana g^{-1} riba dan^{-1});

Razpolovna doba ($t_{1/2}$), popravljena glede na rast, se izračuna z naslednjo enačbo:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_{2g}} \quad [\text{enačba A7.6}]$$

Učinkovitost asimilacije snovi iz hrane se lahko tudi oceni, če se določijo ostanki v tkivih med linearno fazo absorpcije (med prvim in tretjim dnevom). V tem primeru se lahko učinkovitost asimilacije snovi (α) določi z naslednjo enačbo:

$$\alpha = \frac{C_{\text{riba}}(t)}{I \times C_{\text{hrana}} \times t} \quad [\text{enačba A7.7}]$$

pri čemer

$C_{\text{riba}}(t)$ = koncentracija preskusne snovi v ribi ob času t (mg kg^{-1} mokra teža).

4. POPRAVLJANJE GLEDE NA LIPIDE

Če je bila vsebnost lipidov izmerjena v istih ribah, na katerih je bila izvedena tudi kemijska analiza za vse intervale vzorčenja, je treba posamezne koncentracije popraviti glede na lipide, $\ln(\text{koncentracija, popravljena glede na lipide})$ pa se grafično prikaže v odvisnosti od očiščenja (dan), da se pridobita $C_{0,d}$ in k_2 . Učinkovitost asimilacije (enačba A7.1) se lahko nato izračuna glede na lipide, pri čemer se uporabi C_{hrana} glede na lipide (tj. C_{riba} se pomnoži s povprečnim deležem lipidov v hrani). Nato se z izračunom na podlagi enačb A7.4 in A7.5 neposredno pridobi BMF, popravljen glede na lipide (in razredčitev zaradi rasti).

V nasprotnem primeru se povprečni delež lipidov (masni delež) v ribah in hrani izpelje za tretirano in kontrolno skupino (za hrano in kontrolno skupino rib je to običajno na podlagi podatkov, izmerjenih ob začetku in koncu izpostavljenosti; za tretirano skupino rib je to običajno na podlagi podatkov, izmerjenih samo ob koncu izpostavljenosti). V nekaterih študijah se lahko vsebnost lipidov v ribah precej poveča; v takih primerih je ustrezneje uporabiti povprečno koncentracijo lipidov v preskusnih ribah, ki se izračuna iz izmerjenih vrednosti ob koncu izpostavljenosti in na začetku očiščenja. Na splošno je podatke iz tretirane skupine treba uporabiti samo za izpeljavo obeh deležev lipidov.

Korekcijski faktor za lipide (L_c) se izračuna kot:

$$L_c = \frac{L_{\text{riba}}}{L_{\text{hrana}}} \quad [\text{enačba A7.8}]$$

pri čemer sta L_{riba} in L_{hrana} povprečna deleža lipidov v ribah oziroma hrani.

Korekcijski faktor za lipide se uporabi za izračun biomagnifikacijskega faktorja, popravljenega glede na lipide (BMF_L):

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_c} \quad \text{[enačba A7.9]}$$

5. VREDNOTENJE RAZLIK MED IZMERJENO KONCENTRACIJO OB ČASU NIČ ($C_{0,m}$) IN IZPELJANO KONCENTRACIJO OB ČASU NIČ ($C_{0,d}$)

Primerjati je treba izmerjeno koncentracijo ob času nič ($C_{0,m}$) in izpeljano koncentracijo ob času nič ($C_{0,d}$). Če sta si zelo podobni, to podpre model prvega reda, ki je bil uporabljen za izpeljavo parametrov očiščenja.

V nekaterih študijah se lahko ugotovi precejšnja razlika med izpeljano vrednostjo ob času nič, $C_{0,d}$, in povprečno izmerjeno koncentracijo ob času nič, $C_{0,m}$ (glej zadnjo alinejo odstavka 159 te preskusne metode). Če je $C_{0,d}$ veliko nižja od $C_{0,m}$ ($C_{0,d} \ll C_{0,m}$), lahko razlika kaže na prisotnost neprebavljene hrane z dodatkom v črevesju. To je mogoče ugotoviti s preskušanjem, tako da se izvede ločena analiza na odstranjenem črevesju, če so bili vzeti dodatni vzorci (celih rib) in shranjeni ob koncu faze absorpcije. V nasprotnem primeru, če statistično veljaven preskus osamelcev, uporabljen za linearno regresijo faze očiščenja, kaže, da je prva točka vzorčenja očiščenja lažno višja, je morda ustrezno izvesti linearno regresijo za izpeljavo k_2 , ampak pri tem izpustiti prvo točko koncentracije očiščenja. V takih primerih, kadar se negotovost linearne regresije znatno zmanjša in je jasno, da je bila približno upoštevana kinetika očiščenja prvega reda, je morda ustrezno uporabiti dobljeni vrednosti $C_{0,d}$ in k_2 pri izračunu asimilacije učinkovitosti. To je treba v celoti utemeljiti v poročilu. Mogoče je tudi, da je faza očiščenja sledila kinetiki, ki ni prvega reda. Če je najverjetneje sledila taki kinetiki (tj. podatki, pretvorjeni v naravni logaritem, na videz sledijo krivulji v primerjavi s prikazom premice linearne regresije), potem izračuni k_2 in $C_{0,d}$ najverjetneje niso veljavni in treba je poiskati nasveti biostatistika.

Če je $C_{0,d}$ veliko višja od izmerjene vrednosti ($C_{0,d} \gg C_{0,m}$), lahko to pomeni, da: se je snov zelo hitro očistila (tj. točke vzorčenja so se približale meji določljivosti analitske metode zelo zgodaj v fazi očiščenja, *prim.* oddelek 6 v nadaljevanju); je prišlo do odstopanja od kinetike očiščenja prvega reda; je linearna regresija, s katero sta se izpeljali k_2 in $C_{0,d}$, napačna; ali pa je nekaterih časovnih točkah vzorčenja prišlo do težave z izmerjenimi koncentracijami v študiji. V takih primerih je treba skrbno proučiti prikaz linearne regresije za dokaze o vzorcih, ki so na meji določljivosti ali blizu nje, za osamelce in očitne krivine (ki kažejo na kinetiko, ki ni prvega reda) ter jih poudariti v poročilu. Opisati in utemeljiti je treba kakršno koli nadaljnjo ponovno vrednotenje linearne regresije za izboljšanje ocenjenih vrednosti. Če je ugotovljeno znatno odstopanje od kinetike prvega reda, izračuni k_2 in $C_{0,d}$ najverjetneje ne bodo veljavni in treba je poiskati nasvet biostatistika.

6. SMERNICE ZA PRESKUSNE SNOVI, KI SE OČIŠČUJEJO ZELO HITRO

Kot je bilo opisano v odstavku 129 te preskusne metode, se lahko nekatere snovi očiščujejo tako hitro, da ni mogoče izpeljati zanesljive koncentracije ob času nič, $C_{0,d}$, in k_2 , saj se v vzorcih, vzetih zelo zgodaj v fazi očiščenja (tj. od drugega vzorca očiščenja naprej), snov dejansko ne meri več (navedene koncentracije so na meji določljivosti). Ta situacija je bila ugotovljena v krožnem preskusu, ki je bil izveden v podporo tej preskusni metodi z benzo[a]pirenom in naveden v validacijskem poročilu za metodo. V takih primerih ni mogoče zanesljivo izvesti linearne regresije, s katero bi se najverjetneje dobila nerealno visoka ocena $C_{0,d}$, s tem pa navidezna učinkovitost asimilacije, ki bi znašala veliko več kot 1. V teh primerih se lahko izračuna previdna ocena k_2 in BMF „zgornje meje“.

Če se uporabijo podatkovne točke faze očiščenja, ko je bila izmerjena koncentracija, do in vključno s prvo „nezaznavno“ koncentracijo (koncentracija, določena na meji določljivosti), se lahko z linearno regresijo (pri kateri se uporabijo podatki o koncentraciji, pretvorjeni v naravni logaritem, v odvisnosti od časa) dobi ocena k_2 . Take vrste primerov bodo verjetno zajele samo dve podatkovni točki (npr. prvi in drugi dan vzorčenja med fazo očiščenja), nato pa se lahko oceni k_2 z enačbo A5.22 iz Dodatka 5. Ta ocena k_2 se lahko uporabi za oceno učinkovitosti asimilacije z enačbo A7.1, pri čemer se vrednost $C_{0,d}$ v enačbi nadomesti z izmerjeno koncentracijo ob času nič ($C_{0,m}$) v primerih, ko je ocena $C_{0,d}$ očitno veliko višja od te, ki bi se lahko dosegla v preskusu. Če $C_{0,m}$ ni bilo mogoče izmeriti, je treba uporabiti mejo zaznavnosti v ribjem tkivu. Če se s tem v nekaterih primerih dobi vrednost $\alpha > 1$, se v „najslabšem primeru“ predvideva, da učinkovitost asimilacije znaša 1.

Nato se lahko oceni največji BMF_k z enačbo A7.4, navesti pa ga je treba kot vrednost „ki je veliko manjša od“ (\ll). Na primer za študijo, ki je izvedena s 3-odstotno stopnjo hranjenja, razpolovno dobo očiščenja, ki znaša manj kot tri dni, in vrednostjo α , ki je „najslabšem primeru“ enaka 1, bo vrednost BMF_k verjetno znašala manj kot 0,13. Zaradi namena take ocene in dejstva, da bodo ocene vrednosti same po sebi previdne, teh vrednosti ni treba popraviti glede na rast, razredčitev ali vsebnost lipidov hrani in ribah.

Dodatek 8

PRISTOPI K OCENJEVANJU OKVIRNIH BKF NA PODLAGI PODATKOV, ZBRANIH V ŠTUDIJI PREHRANSKE IZPOSTAVLJENOSTI

Prehranska metoda je vključena v to preskusno metodo za preskušanje bioakumulacije snovi, ki je v praksi ni mogoče preskusiti z metodo vodne izpostavljenosti. Z metodo vodne izpostavljenosti se dobi biokonzentracijski faktor, pri prehranski metodi pa se neposredno dobijo informacije o potencialu za biomagnifikacijo pri hranjenju. V mnogih sistemih za kemijsko varnost se zahtevajo informacije o vodni biokonzentraciji (na primer pri oceni tveganja in Globalno usklajenem sistemu za razvrščanje). Zato je treba uporabiti podatke iz prehranske študije za oceno biokonzentracijskega faktorja, ki je primerljiv s preskusi, izvedenimi v skladu z metodo vodne izpostavljenosti ⁽¹⁾. V tem oddelku so opisani pristopi, ki jim je mogoče slediti v ta namen, navedene pa so tudi pomanjkljivosti, ki so del ocen.

V prehranski študiji se izmeri očiščenje, da se dobi konstanta hitrosti očiščenja, k_2 . Če se lahko na podlagi razpoložljivih podatkov za situacijo, ko so ribe bile izpostavljene preskusni snovi prek vode, oceni konstanta hitrosti absorpcije, se lahko oceni tudi kinetični BKF.

Ocena konstante hitrosti absorpcije za vodno izpostavljenost preskusne snovi temelji na mnogih domnevah, vse te domneve pa prispevajo k negotovosti ocene. Poleg tega se s tem pristopom k oceni BKF predvideva, da je skupna hitrost očiščenja (vključno z dejavniki, ki k njej prispevajo, na primer porazdelitev v telesu in posamezni procesi očiščenja) neodvisna od tehnike izpostavljenosti, ki se uporabi za obremenitev telesa s preskusno snovjo.

Glavne domneve, ki so del pristopa k ocenjevanju, je mogoče povzeti na naslednji način:

očiščenje, ki sledi prehranski absorpciji, je enako očiščenju, ki sledi vodni izpostavljenosti za dano snov;

absorpcija iz vode bi sledila kinetiki prvega reda;

glede na metodo, ki se uporabi za oceno absorpcije:

- se lahko absorpcijo poveže samo s težo rib;
- se lahko absorpcijo poveže samo s porazdelitvenim koeficientom n-oktanol/voda za snov;
- se lahko absorpcijo poveže s kombinacijo teže rib in porazdelitvenega koeficienta n-oktanol/voda za snov;
- dejavniki, ki lahko v praksi vplivajo na absorpcijo pri študiji vodne izpostavljenosti, na primer biološka dostopnost snovi, adsorpcija na opremo, molekulska velikost itd., imajo majhen učinek;
- in, kar je ključno:

zbirka podatkov („nabor za usposabljanje“), ki je bila uporabljena za razvoj metode za ocenjevanje absorpcije, je reprezentativna za preiskovano snov.

V več javno dostopnih publikacijah so bile izpeljane enačbe, ki povezujejo absorpcijo iz vode v ribe prek škrg s porazdelitvenim koeficientom n-oktanol/voda za snov, težo rib (1), (2), (3) in (4), prostornino in/ali vsebnostjo lipidov, permeacijo/difuzijo skozi membrano (5), (6), volumnom dihanja rib (7) in s pristopom fugativnosti/masne bilance (8), (9) in (10). Podroben opis takih metod v tem okviru je zajet v Crookes & Brooke (11). Barberjeva publikacija (12), ki se je usmerila v izdelavo modelov za bioakumulacijo na podlagi prehranske absorpcije, je tudi uporabna v tem okviru, saj zajema prispevke na podlagi modelov za hitrost absorpcije prek škrg. Ta vidik je opisan tudi v oddelku referenčnega dokumenta k prehranskem protokolu iz leta 2004 (13).

⁽¹⁾ V naravi pot, ki pomeni največjo izpostavljenost v vodnih okoljih, za zelo hidrofobne snovi najverjetneje poteka prek zaužitja, zato ocenjeni BKF ne predstavlja nujno bioakumulacijski potencial take snovi.

Zdi se, da je večina teh modelov bila izpeljana z uporabo omejene zbirke podatkov. Za modele, pri katerih so na voljo podrobnosti o zbirki podatkov, uporabljeni za izdelavo modela, se zdi, da so vrste uporabljenih snovi pogosto podobne strukture ali razreda (v smislu funkcionalnosti, npr. organoklorne spojine). To prispeva k negotovosti pri uporabi modela za napovedovanje konstante hitrosti absorpcije za drugačno vrsto snovi, poleg drugih vidikov v zvezi s preskusom, kot so vrsta, temperatura itd.

V pregledu tehnik, ki so na voljo (11), je bilo poudarjeno, da ne obstaja metoda, ki bi bila „ustreznejša“ kot druge. Zato je treba jasno utemeljiti uporabljeni model. Kadar je na voljo več metod in je njihovo uporabo mogoče utemeljiti, je morda smotno predstaviti več ocen k_1 (in s tem BKF) ali območje vrednosti k_1 (in BKF) v skladu z več metodami za ocenjevanje absorpcije. Zaradi razlik v vrstah modelov in zbirkah podatkov, uporabljenih za razvoj teh modelov, pa ne bi bilo ustrezno uporabiti povprečne vrednosti ocen, izpeljanih na različne načine.

Nekateri raziskovalci so predpostavili, da je treba ocene BKF te vrste popraviti glede na biološko dostopnost, da se upošteva adsorpcija snovi na raztopljeni organski ogljik pod pogoji vodne izpostavljenosti, in jih uskladiti z rezultati iz študij vodne izpostavljenosti (npr. (13) in (14)). Vendar ta popravek morda ni ustrezen zaradi nizkih ravni raztopljenega organske ogljika, ki so zahtevane pri študiji vodne izpostavljenosti za oceno v „najslabšem primeru“ (tj. razmerje med biološko dostopnostjo snovi in snovjo, izmerjeno v raztopini). Za močno hidrofobne snovi lahko postane absorpcija prek škrg omejena zaradi hitrosti pasivne difuzije blizu površine škrg; v tem primeru je mogoče, da se pri popravku upošteva ta učinek, ne pa ta, za katerega je bil zasnovan.

Priporočeno se je usmeriti v metode, ki zahtevajo parametre, za katere bodo na voljo podatki o preiskovani snoveh v skladu s tukaj opisano prehransko študijo (tj. $\log K_{ow}$, teža ribe). Uporabijo se lahko druge metode, ki zahtevajo kompleksnejše podatke, ampak morda bo treba opraviti dodatne meritve v preskusu ali pridobiti podrobno znanje o preskusni snovi ali vrsti rib, ki mogoče ni splošno dostopno. Poleg tega lahko na izbiro modela vpliva raven validacije in področje uporabe (glej (11) za pregled in primerjavo različnih metod).

Upoštevati je treba, da sta dobljeni oceni k_1 in BKF negotovi ter da jih je morda treba obravnavati s pristopom, ki temelji na zanesljivosti dokazov, skupaj z izpeljanim BMF in parametri snovi (npr. molekulska velikostjo), da se pridobi celoten pregled bioakumulacijskega potenciala snovi. Razlaga in uporaba teh parametrov je morda odvisna od regulativnega okvira.

VIRI

- (1) Sijm D.T.H.M., Pärt P. in 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. in 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. in 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, ZDA: 304-315.

- (6) Arnot J.A. in 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. in 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. in Mackay D. (1997), Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. *Environ. Sci. Technol.* 31: 577-583.
- (10) Arnot J.A. in 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. in Brooke D. (2010), Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Draft Report. Environmental Agency, Bristol, Združeno kraljestvo.
- (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) Anonimni avtor (2004), Background document to the fish dietary study protocol, dokument oddan TC-NES WG o PBT.
- (14) Gobas F. in 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, ZDA: 189-231.“

(17) V delu C se poglavje C.20 nadomesti z naslednjim:

„C.20 Preskus razmnoževanja vrste *Daphnia magna*“

UVOD

Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD (TG) 211 (2012). Preskusne smernice OECD se ob upoštevanju znanstvenega napredka redno pregledujejo. Smernica za preskušanje razmnoževanja 211 temelji na smernici za preskušanje 202, Del II, Preskus razmnoževanja vrste *Daphnia* sp. (1984). Na splošno je bilo ugotovljeno, da so lahko podatki iz preskusov, izvedenih v skladu s to smernico za preskušanje 202, spremenljivi. Zaradi tega so bila precejšnja prizadevanja namenjena temu, da bi se opredelili razlogi za to spremenljivost in da bi se oblikovala boljša preskusna metoda. Smernica za preskušanje 211 temelji na rezultatih teh raziskovalnih dejavnosti, krožnih preskusov in validacijskih študij, izvedenih v letih 1992 (1), 1994 (2) in 2008 (3).

Glavne razlike med prvo (TG 202, 1984) in drugo različico (TG 211, 1998) smernice za preskušanje razmnoževanja so:

- za uporabo je priporočena vrsta vodnih bolh *Daphnia magna*;
- preskus traja 21 dni;
- pri polstatičnih preskusih se je število živali, ki jih je treba uporabiti za vsako preskusno koncentracijo, zmanjšalo s vsaj 40, ki se po možnosti razdelijo v štiri skupine po deset živali, na vsaj deset živali, ki se gojijo ločeno (čeprav se lahko za pretočne preskuse uporabijo drugačni načrti);

- za preskusni medij in pogoje hranjenja so se opredelila bolj določena priporočila.
- Glavne razlike med drugo različico smernice za preskušanje razmnoževanja (TG 211, 1998) in to različico so:
- dodan je bil Dodatek 7 za opis postopkov opredeljevanja spola novorojenih živali, če je to potrebno. V skladu s prejšnjimi različicami te preskusne metode je razmerje med spoloma izbirna končna točka;
- spremenljivka odziva, in sicer število živih potomcev, ustvarjenih na preživelega starša, je bila dopolnjena z dodatno spremenljivko odziva za razmnoževanje vrste *Daphnia*, tj. skupnim številom živih potomcev, ustvarjenih ob koncu preskusa, na starša vodne bolhe na začetku preskusa, pri čemer se je iz analize izključila naključna in/ali nenamerna smrtnost staršev. Namen dodane spremenljivke odziva je uskladiti to spremenljivko odziva z drugimi preskusnimi metodami za razmnoževanje nevretenčarjev. Poleg tega se v zvezi s to spremenljivko odziva lahko odstrani vir napake v tej preskusni metodi, in sicer učinek nenamerne in/ali naključne smrtnosti staršev, če se pojavi v obdobju izpostavljenosti;
- vključene so bile dodatne statistične smernice za načrt preskusa in obdelavo rezultatov za ECx (npr. EC10 ali EC50) in pristop NOEC/LOEC;
- uveden je bil mejni preskus.

Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

NAČELO PRESKUSA

Glavni cilj preskusa je oceniti vpliv kemikalij na sposobnost razmnoževanja vrste *Daphnia magna*. V ta namen se mlade samice vrste *Daphnia* (starši), ki so na začetku preskusa mlajše od 24 ur, izpostavijo preskusni kemikaliji, dodani vodi v različnih koncentracijah. Preskus traja 21 dni. Na koncu preskusa se oceni skupno število ustvarjenih živih potomcev. Sposobnost razmnoževanja staršev je mogoče izraziti tudi na druge načine (npr. število živih potomcev, ki jih ustvari žival na dan od prvega dne, ko so opaženi potomci), vendar je treba te navesti v poročilu poleg skupnega števila živih potomcev, ustvarjenih ob koncu preskusa. Zaradi posebnega načrta polstatičnega preskusa v primerjavi z drugimi preskusnimi metodami za razmnoževanje nevretenčarjev se lahko prešteje tudi število živih potomcev, ki jih ustvari vsak posamezni starš. V nasprotju z drugimi preskusnimi metodami za razmnoževanje nevretenčarjev to omogoča, da se ustvarjanje potomcev starša, ki naključno in/ali nenamerno umre med preskusnim obdobjem, izključi iz ocene podatkov. Če se torej smrtnost staršev pojavi v izpostavljenih ponovljenih vzorcih, je treba obravnavati, ali smrtnost sledi vzorcu odziva na koncentracijo ali ne, npr. če obstaja precejšnja regresija odziva v odvisnosti od koncentracije preskusne kemikalije s pozitivnim naklonom (za to se lahko uporabi statistični preskus, kot je Cochran-Armitageov trendnostni test). Če smrtnost ne sledi vzorcu odziva na koncentracijo, je treba navedene ponovljene vzorce s smrtnostjo staršev izključiti iz analize preskusnega rezultata. Če smrtnost sledi vzorcu odziva na koncentracijo, je treba smrtnost staršev obravnavati kot učinek preskusne kemikalije, ponovljeni vzorci pa se ne smejo izključiti iz analize. Če starš med preskusom umre, tj. naključno zaradi neustreznega ravnanja ali nesreče, ali nenamerno zaradi nepojasnjene dogodka, ki ni povezan z učinkom preskusne kemikalije, ali pa se izkaže, da je samec, se ponovljeni vzorec izključi iz analize (glej več v odstavku 51). Toksični učinek preskusne kemikalije na sposobnost razmnoževanja se izrazi kot ECx, tako da se podatke prilagodi ustreznemu modelu z nelinearno regresijo, da se oceni koncentracija, ki bi povzročila x-odstotno zmanjšanje sposobnosti razmnoževanja, ali pa kot vrednost NOEC/LOEC (4). Preskusne koncentracije morajo po možnosti oklepati najnižjo od uporabljenih učinkovitih koncentracij (npr. EC₁₀), kar pomeni, da se ta vrednost izračuna z interpolacijo, ne pa z ekstrapolacijo.

V poročilu je treba navesti tudi preživetje staršev in trajanje obdobja do ustvarjanja prvega zaroda. Proučijo se lahko tudi drugi učinki, ki so povezani s kemikalijo in vplivajo na parametre, kot so rast (npr. dolžina) in morebiti intrinzična hitrost povečanja populacije (glej odstavke 44).

INFORMACIJE O PRESKUSNI KEMIKALIJI

Rezultati preskusa akutne toksičnosti (glej poglavje C.2 te priloge: Preskus akutne imobilizacije vodnih bolh (*Daphnia* sp.)), izvedeni z vrsto *Daphnia magna*, so lahko uporabni pri izbiri ustreznega območja preskusnih koncentracij v preskusih razmnoževanja. Znana morata biti topnost v vodi in parni tlak preskusne kemikalije ter na voljo mora biti zanesljiva analitska metoda za količinsko opredeljevanje kemikalije v preskusnih raztopinah, za katero obstajajo podatki o izkoristku in meji določljivosti.

Informacije o preskusni kemikaliji, ki so lahko uporabne pri določanju preskusnih pogojev, zajemajo strukturno formulo, čistost kemikalije, obstojnost na svetlobi, obstojnost pod pogoji preskusa, disociacijsko konstanto (pKa), P_{ow} in rezultate preskusa za dobro biorazgradljivost (glej poglavji C.4 (Določanje „dobre“ biorazgradljivosti) in C.29 (Dobra biorazgradljivost – CO₂ v zaprtih posodah) te priloge).

VELJAVNOST PRESKUSA

Za veljavnost preskusa morajo kontrole izpolnjevati naslednja merila za učinkovitost:

- smrtnost staršev (samic vrste *Daphnia*) ob koncu preskusa ne presega 20 %;
- povprečno število živih potomcev na starša, ki preživi do konca preskusa, ≥ 60 .

Opomba: Enako merilo za veljavnost (20 %) se lahko uporabi za naključno ali nenamerno smrtnost staršev za kontrole in vsako od preskusnih koncentracij.

OPIS METODE

Oprema

Preskusne posode in druge naprave, ki pridejo v stik s preskusnimi raztopinami, morajo biti v celoti iz stekla ali drugega kemijsko inertnega materiala. Preskusne posode so navadno steklene čaše.

Potrebna je tudi nekatera ali vsa naslednja oprema:

- oksimeter (z mikroelektrodo ali drugo primerno opremo za merjenje raztopljenega kisika v vzorcih z majhno prostornino);
- ustrezna oprema za uravnavanje temperature;
- merilnik vrednosti pH;
- oprema za določanje trdote vode;
- oprema za določanje koncentracije skupnega organskega ogljika (TOC) v vodi ali oprema za določanje kemijske potrebe po kisiku (KPK);
- primerna naprava za nadzorovanje sistema osvetlitve in merjenje svetilnosti.

Preskusni organizem

V preskusu se uporabi vrsta *Daphnia magna* Straus⁽¹⁾.

Klon mora po možnosti biti opredeljen z genotipiziranjem. Raziskave (1) so pokazale, da sposobnost razmnoževanja klona A (ki izvira iz IRCHA v Franciji) (5) dosledno izpolnjuje merilo za veljavnost, ki zahteva, da je povprečno število živih potomcev na preživelega starša ≥ 60 , če so gojeni v pogojih, opisanih v tej preskusni metodi. Vendar so sprejemljivi tudi drugi kloni, če se dokaže, da kultura vrste *Daphnia* izpolnjuje merila za veljavnost preskusa.

(¹) Lahko se uporabijo druge vrste vodnih bolh, če ustrezno izpolnjujejo merila za veljavnost (merilo za veljavnost v zvezi s sposobnostjo razmnoževanja v kontrolah mora biti ustrezno za vse vrste). Če se uporabijo druge vrste vodnih bolh, jih je treba jasno opredeliti in utemeljiti njihovo uporabo.

Na začetku preskusa morajo biti živali mlajše od 24 ur in ne smejo biti prva generacija potomcev. Izvirati morajo iz zdravega staleža (tj. ne kažejo znakov stresa, kot so visoka smrtnost, navzočnost samcev in zimskih jajc, zamuda pri ustvarjanju prvega zaroda, razbarvane živali itd.). Živali v staležu je treba gojiti v pogojih (svetloba, temperatura, medij, hranjenje in živali na enoto prostornine), podobnim tistim, ki bodo uporabljeni v preskusu. Če se bo v preskusu uporabilo gojišče za vrsto *Daphnia*, ki je drugačno od tistega, ki se uporablja za rutinsko gojenje kulture vrste *Daphnia*, je dobro pred preskusom izvesti obdobje aklimatizacije, ki navadno traja okoli tri tedne (tj. eno generacijo), da se prepreči izpostavljanje staršev stresu.

Preskusni medij

Za ta preskus je priporočljivo uporabiti povsem določen medij. S tem se je mogoče izogniti uporabi dodatkov (npr. morske alge, ekstrakt tal itd.), ki jih je težko opredeliti, s tem pa se izboljšajo možnosti za standardizacijo med laboratoriji. Ugotovljeno je bilo, da sta medija ElenDt M4 (6) in M7 (glej Dodatek 2) primerna za ta namen. Sprejemljivi pa so tudi drugi mediji (npr. (7) in (8)), če je dokazano, da sposobnost kulture vrste *Daphnia* izpolnjuje merila za veljavnost preskusa.

Če se uporabijo mediji, ki vsebujejo neopredeljene dodatke, je treba te dodatke jasno navesti, v poročilu o preskusu pa je treba zagotoviti informacije o sestavi, zlasti v zvezi z vsebnostjo ogljika, saj lahko vpliva na uporabljeno hrano. Priporočeno je določiti skupni organski ogljik (TOC) in/ali kemijsko potrebo po kisiku (KPK) osnovnega pripravka organskega dodatka ter oceniti, kako ta posledično prispeva k TOC/KPK v ustvarjenem preskusnem mediju. Nadalje je priporočeno, da ravni TOC v mediju (tj. pred dodatkom alg) znašajo manj kot 2 mg/l (9).

Pri preskušanju kemikalij, ki vsebujejo kovine, je pomembno vedeti, da lahko lastnosti preskusnega medija (npr. trdota, sposobnost tvorbe kelatov) vplivajo na toksičnost preskusne kemikalije. Zato je zaželen povsem določen medij. Trenutno pa sta edina povsem določena medija, za katera je dokazano, da sta primerna za dolgotrajno gojenje vrste *Daphnia magna*, ElenDt M4 in M7. Oba medija vsebujeta kelatni reagent EDTA. Raziskave so pokazale (2), da je „navidezna toksičnost“ kadmija na splošno manjša, kadar se preskus razmnoževanja izvede v medijih M4 in M7, kot pa če se izvede v medijih, ki ne vsebujejo EDTA. M4 in M7 zato nista priporočljiva za preskušanje kemikalij, ki vsebujejo kovine, izogibati pa se je treba tudi drugim medijem, ki vsebujejo znane kelatne reagente. Za kemikalije, ki vsebujejo kovine, je morda priporočljivo uporabiti drug medij, kot je na primer modelna razredčevalna trda sladka voda ASTM (9), ki ne vsebuje EDTA. Kombinacija modelne razredčevalne trde sladke vode ASTM in ekstrakta morskih alg (10) je primerna za dolgotrajno gojenje vrste *Daphnia magna* (2).

Raztopljena koncentracija kisika mora znašati več kot 3 mg/l ob začetku preskusa in med njim. Vrednost pH mora biti v območju 6–9 in običajno ne sme odstopati za več kot 1,5 enote v katerem koli preskusu. Priporočena je trdota nad 140 mg/l (kot CaCO₃). Pri preskusih na tej ravni in nad njo je bila ugotovljena sposobnost razmnoževanja, ki je v skladu z merili za veljavnost (11) in (12).

Preskusne raztopine

Preskusne raztopine izbranih koncentracij se običajno pripravijo z redčenjem osnovne raztopine. Če je mogoče, se osnovne raztopine pripravijo brez kakršnih koli topil ali disperzijskih sredstev, z mešanjem ali stresanjem preskusne kemikalije v preskusnem mediju z mehanskimi postopki, kot so stresanje, mešanje ali ultrazvočno razbijanje, ali drugimi ustreznimi metodami. Priporočeno je, da se preskusne sisteme izpostavi koncentracijam preskusne kemikalije, ki bodo uporabljene v študiji, za tako dolgo, kot je potrebno, da se dokaže ohranjanje obstojnih koncentracij izpostavljenosti, preden se doda preskusne organizme. Če je preskusno kemikalijo težko raztopiti v vodi, je treba slediti postopkom, ki so opisani v smernici OECD za ravnanje z zahtevnimi snovmi (13). Uporabi topil ali disperzijskih sredstev se je treba izogniti, vendar je v nekaterih primerih morda potrebna za pripravo osnovne raztopine z ustrežno koncentracijo za odmerjanje.

Poleg preskusnih koncentracij je treba izvesti tudi kontrolo z vodo za redčenje z ustreznimi ponovljenimi vzorci in, če se temu ne da izogniti, kontrolo s topilom z ustreznimi ponovljenimi vzorci. V preskusu je treba uporabiti samo topila ali disperzijska sredstva, za katera je bilo dokazano, da nimajo znatnega učinka na spremenljivko odziva ali pa imajo nanjo le manjši učinek. Primeri ustreznih topil (npr. aceton, etanol, metanol, dimetilformamid in trietilen glikol) ter disperzijskih sredstev (npr. Cremophor RH40, 0,01-odstotna metilceluloza in HCO-40) so navedeni v (13). Če se uporabi topilo ali disperzijsko sredstvo, njegova končna koncentracija ne sme biti višja od 0,1 ml/l (13) in v vseh preskusnih posodah mora biti ista koncentracija, razen v kontroli z vodo za redčenje. Čim bolj pa si je treba prizadevati, da so koncentracije topil čim nižje.

POSTOPEK

Pogoji izpostavljenosti

Trajanje

Preskus traja 21 dni.

Obremenitev

Starši se gojijo ločeno, en na preskusno posodo, običajno z 50–100 ml (za vrsto *Daphnia magna*, možne pa so tudi manjše prostornine, zlasti za manjše vrste vodnih bolh, npr. *Ceriodaphnia dubia*) medija v vsaki posodi, razen če je za preskušanje potreben pretočni načrt preskusa.

Včasih so morda potrebne večje prostornine za izpolnitev zahtev analitskega postopka, ki se uporabi za določanje koncentracije preskusne kemikalije, za kemijsko analizo pa se lahko ponovljeni vzorci tudi združijo. Če se uporabijo prostornine, večje od 100 ml, je morda treba povečati obroke za vrsto *Daphnia*, da se zagotovi zadostna dostopnost hrane in skladnost z merili za veljavnost.

Poskusne živali

Pri polstatičnih preskusih se goji vsaj deset živali posamezno za vsako preskusno koncentracijo in vsaj deset živali posamezno za kontrolno serijo.

Pri pretočnih preskusih je bilo ugotovljeno, da je ustrezno razdeliti 40 živali v štiri skupine po deset živali za vsako preskusno koncentracijo (1). Uporabi se lahko manjše število preskusnih organizmov, priporočeno pa je najmanj 20 živali na koncentracijo, ki so razdeljene v dva ali več ponovljenih vzorcev z enakim številom živali (npr. štiri ponovljeni vzorci, vsak s petimi vodnimi bolhami). Opozoriti je treba, da pri preskusih, v katerih se živali gojijo v skupinah, ne bo iz statistične analize mogoče izključiti nobenih potomcev, če pride do nenamerne/naključne smrtnosti staršev po začetku razmnoževanja, zato je v takih primerih treba izraziti sposobnost razmnoževanja kot skupno število živih potomcev, ustvarjenih na starša iz skupine na začetku preskusa.

Tretiranja, ki se dodelijo preskusnim posodam, in vsa nadaljnja ravnanja s preskusnimi posodami, morajo biti naključna. Če ni, lahko pride do pristranskosti, ki bi se lahko razumela kot učinek koncentracije. Zlasti če se s preskusnimi enotami ravna po vrstnem redu tretiranj ali koncentracij, lahko nek učinek, odvisen od časa, kot je utrujenost izvajalca ali druga napaka, pomeni večje učinke pri višjih koncentracijah. Poleg tega, če bodo na rezultate preskusa verjetno vplivali začetni ali okoljski pogoji preskusa, na primer položaj v laboratoriju, je treba obravnavati načrt preskusa z naključnimi bloki.

Hranjenje

Pri polstatičnih preskusih je treba živali po možnosti hraniti vsak dan oziroma vsaj trikrat na teden (tj. skladno s spremembami medija). Upoštevati je treba morebitno razredčenje koncentracij izpostavljenosti zaradi dodajanja hrane in ga čim bolj preprečiti z ustreznimi koncentracijami suspenzij alg. Odstopanja od tega (npr. za pretočne preskuse) je treba navesti v poročilu.

Med preskusom mora biti hrana staršev po možnosti sestavljena iz živih celic alg ene ali več naslednjih vrst: *Chlorella* sp., *Pseudokirchneriella subcapitata* (prej znana kot *Selenastrum capricornutum*) in *Desmodesmus subspicatus* (prej znana kot *Scenedesmus subspicatus*). Hrana mora temeljiti na količini organskega ogljika (C), ki se zagotovi za vsakega starša. Raziskave (14) so pokazale, da je velikost obrokov med 0,1 in 0,2 mg C/vodno bolho/dan za vrsto *Daphnia magna* dovolj, da se doseže zahtevano število živih potomcev in izpolnijo merila za veljavnost preskusa. obroki se lahko zagotavljajo z enako stopnjo hranjenja ves čas trajanja preskusa, po želji pa se lahko na začetku preskusa uporabi nižja stopnja in se nato med preskusom povečuje, da se upošteva rasti staršev. V tem primeru morajo biti obroki še vedno ves čas v priporočenem območju, ki znaša 0,1–0,2 mg C/vodno bolho/dan.

Če se morajo za zagotavljanje zahtevane stopnje obroka uporabiti nadomestne meritve, kot sta število celic alg ali absorbanca svetlobe (tj. zaradi večje pripravnosti, saj je merjenje vsebnosti ogljika zamudno), mora vsak laboratorij pripraviti svoj nomogram, ki povezuje nadomestno meritev z vsebnostjo ogljika v kulturi alg (glej Dodatek 3 za nasvete o izdelavi nomogramov). Nomograme je treba preveriti vsaj enkrat letno in bolj pogosto, če se spremenijo pogoji gojenja alg. Ugotovljeno je bilo, da je absorbanca svetlobe boljše nadomestilo za vsebnost ogljika kot število celic (15).

Vrsto *Daphnia* je treba hraniti s koncentrirano suspenzijo alg, da se čim bolj zmanjša prostornina gojišča alg, ki je bil prenesen v preskusne posode. Koncentracijo alg se lahko doseže s centrifugiranjem, ki mu sledi ponovno suspendiranje v gojišču za vrsto *Daphnia*.

Svetloba

16 ur svetlobe s svetilnostjo, ki ne presega $15\text{--}20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ in se izmeri na površini vode v posodi. Pri merilnikih svetlobe, umerjenih v luksih, enakovredno območje 1 000–1 500 luksov za hladno belo svetlobo približno ustreza priporočeni svetilnosti $15\text{--}20 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Temperatura

Temperatura preskusnega medija mora biti v območju $18\text{--}22 \text{ }^\circ\text{C}$. Pri katerem koli preskusu pa temperatura ne sme odstopati za več kot $2 \text{ }^\circ\text{C}$ od teh mej dnevnega območja (npr. $18\text{--}20$, $19\text{--}21$ ali $20\text{--}22 \text{ }^\circ\text{C}$). Za spremljanje temperature je morda ustrezno uporabiti dodatno preskusno posodo.

Prezračevanje

Preskusne posode se med preskusom ne smejo prezračevati.

Načrt preskusa

Preskus za določanje območja

Po potrebi se preskus za določanje območja izvede na primer s petimi koncentracijami preskusne kemikalije in dvema ponovljenima vzorcema za vsako tretiranje in kontrolo. Pri odločanju o območju koncentracij, ki jih je treba uporabiti pri preskusu za določanje območja, so lahko uporabne tudi dodatne informacije o akutni toksičnosti za vrsto *Daphnia* in/ali druge vodne organizme iz preskusov s podobnimi kemikalijami ali virov.

Preskus za določanje območja traja 21 dni ali tako dolgo, da se lahko zanesljivo predvidijo ravni učinkov. Na koncu preskusa se oceni razmnoževanje vrste *Daphnia*. Zabeležiti je treba število odraslih in pojav potomcev.

Končni preskus

Običajno se uporabi vsaj pet preskusnih koncentracij, ki oklepajo učinkovito koncentracijo (npr. EC_x) in so razvrščene v geometrijskem zaporedju z razmerjem, ki po možnosti ne presega 3,2. Uporabiti je treba ustrezno število ponovljenih vzorcev za vsako preskusno koncentracijo (glej odstavke 24–25). Če se uporabi manj kot pet koncentracij, je treba to utemeljiti. Kemikalije se ne smejo preskušati nad njihovo mejo topnosti v preskusnem mediju. Pred izvedbo preskusa je priporočljivo obravnavati statistično moč načrta preskusov in uporabo ustreznih statističnih metod (4). Pri določanju območja koncentracij je treba upoštevati naslednje:

- (i) kadar se ocenjuje EC_x za učinke na razmnoževanje, je priporočljivo uporabiti zadostne koncentracije, da se lahko EC_x določi z ustrezno stopnjo zaupanja. Preskusne koncentracije morajo po možnosti oklepati ocenjeni EC_x tako, da se EC_x ugotovi z interpolacijo in ne z ekstrapolacijo. Za naslednjo statistično analizo je bolje imeti več preskusnih koncentracij (npr. deset) in manj ponovljenih vzorcev vsake koncentracije (npr. pet, pri čemer skupno število posod ostane enako) ter deset kontrol;
- (ii) pri ocenjevanju LOEC in/ali NOEC mora biti najnižja preskusna koncentracija dovolj nizka, da sposobnost razmnoževanja pri tej koncentraciji ni znatno nižja kot ta v kontroli. Če ni tako, je treba preskus ponoviti z manjšo najnižjo koncentracijo;
- (iii) pri ocenjevanju LOEC in/ali NOEC mora biti najvišja preskusna koncentracija dovolj visoka, da sposobnost razmnoževanja pri tej koncentraciji ni znatno nižja kot ta v kontroli. Če ni tako, je treba preskus ponoviti z večjo najvišjo koncentracijo, razen če je bila kot najvišja preskusna koncentracija v začetnem preskusu uporabljena najvišja zahtevana preskusna koncentracija za preskušanje kroničnih učinkov (tj. 10 mg/l).

Če pri najvišji koncentraciji v preskusu za določanje območja (npr. pri 10 mg/l) niso ugotovljeni učinki ali če je zelo verjetno, da ima preskusna kemikalija nizko toksičnost/ni toksična na podlagi pomanjkanja toksičnosti za druge organizme in/ali nizke absorpcije/ni absorpcije, se lahko preskus razmnoževanja izvede kot mejni preskus, pri čemer se uporabi preskusna koncentracija, ki znaša npr. 10 mg/l, in kontrola. Uporabiti je treba deset ponovljenih vzorcev za tretirano in kontrolno skupino. Če je treba mejni preskus izvesti v pretočnem sistemu, je ustrezno uporabiti manj ponovljenih vzorcev. Z mejnim preskusom se lahko dokaže, da pri mejni koncentraciji ni statistično značilnega učinka, če pa se zabeležijo učinki, je običajno treba izvesti popoln preskus.

Kontrole

Poleg preskusne serije je treba izvesti kontrolno serijo z enim preskusnim medijem in, če je ustrezno, eno kontrolno serijo s topilom ali disperzijskim sredstvom. Če se uporabi topilo ali disperzijsko sredstvo, mora biti njegova koncentracija enaka tisti, ki je uporabljena v posodah s preskusno kemikalijo. Uporabiti je treba ustrezno število ponovljenih vzorcev (glej odstavke 23–24).

Na splošno bi moral pri pravilno izvedenem preskusu koeficient variacije pri povprečnem številu živih potomcev na starša v kontrolah znašati $\leq 25\%$, kar je treba navesti pri načrtih preskusa, pri katerih se uporabljajo živali, ki se gojijo posamezno.

Obnavljanje preskusnega medija

Pogostost obnavljanja medija je sicer odvisna od obstojnosti preskusne kemikalije, vendar ga je treba obnavljati vsaj trikrat na teden. Če je iz predhodnih preskusov obstojnosti (glej odstavek 7) razvidno, da koncentracija preskusne kemikalije ni obstojna (tj. ni v območju 80–120 % nominalne ali pade pod 80 % izmerjene začetne koncentracije) v najdaljšem obdobju obnavljanja (tj. tri dni), je treba obravnavati pogostejše obnavljanje medija ali uporabo pretočnega preskusa.

Kadar se pri polstatičnih preskusih obnavlja medij, se pripravi druga serija preskusnih posod, vanje pa se prenese starše, na primer s stekleno pipeto ustreznega premera. Prostornina medija, prenesenega z vrsto *Daphnia*, mora biti čim manjša.

Opazovanja

Rezultate opazovanj med preskusom je treba zabeležiti na podatkovnih listih (glej primere v Dodatkih 4 in 5). Če so zahtevane druge meritve (glej odstavek 44), bodo morda potrebna dodatna opazovanja.

Potomci

Po možnosti je treba odstraniti potomce vsakega starša in jih prešteti vsak dan od pojava prvega zaroda, da ne bi jedli hrane, namenjene staršem. Za namen te metode je treba prešteti samo število živih potomcev, vendar je treba zabeležiti prisotnost nedozorelih jajčec ali mrtvih potomcev.

Smrtnost

Smrtnost med starši je treba po možnosti beležiti vsak dan ali vsaj tako pogosto, kot se štejejo potomci.

Drugi parametri

Čeprav je ta preskusna metoda zasnovana predvsem za ocenjevanje učinkov na sposobnost razmnoževanja, se morda lahko v zadostni meri količinsko opredelijo tudi drugi učinki, ki omogočajo statistično analizo. Lahko se zabeleži sposobnost razmnoževanja na preživelega starša, tj. število živih potomcev, ustvarjenih med preskusom na preživelega starša. To se lahko primerja z glavno spremenljivko odziva (sposobnost razmnoževanja na starša na začetku preskusa, ki ni nenamerno ali naključno umrl med preskusom). Če se smrtnost staršev pojavi v izpostavljenih ponovljenih vzorcih, je treba obravnavati, ali smrtnost sledi vzorcu odziva na koncentracijo ali ne, npr. če obstaja precejšnja regresija odziva v odvisnosti od koncentracije preskusne kemikalije s pozitivnim naklonom (za to se lahko uporabi statistični preskus, kot je Cochran-Armitagev trendnostni test). Če smrtnost ne sledi vzorcu odziva na koncentracijo, je treba navedene ponovljene vzorce s smrtnostjo staršev izključiti iz analize preskusnega rezultata. Če smrtnost sledi vzorcu odziva na koncentracijo, je treba smrtnost staršev obravnavati kot učinek preskusne kemikalije, ponovljeni vzorci pa se ne smejo izključiti iz analize preskusnega rezultata. Meritve rasti so zelo zaželeno, saj zagotovijo informacije o morebitnih subletalnih učinkih, ki so lahko uporabne poleg zgolj meritev razmnoževanja; priporočeno je merjenje dolžine staršev (tj. dolžine telesa, razen analne osti) na koncu preskusa. Drugi parametri, ki se lahko izmerijo ali izračunajo, zajemajo obdobje do ustvarjanja prvega zaroda (in nadaljnjih zarodov), število in velikost zarodov na žival, število nedozorelih zarodov, prisotnost novorojenih samcev (OECD 2008) ali zimskih jajc ter morebiti intrinzično hitrost povečanja populacije (glej Dodatek 1 za opredelitve in Dodatek 7 za opredeljevanje spola novorojenih živali).

Pogostost analitskega določanja in meritev

Koncentracijo kisika, temperaturo, trdoto in vrednosti pH je treba meriti vsaj enkrat tedensko v svežih in starih medijih, kontrolah in najvišjih koncentracijah preskusne kemikalije.

Med preskusom se v rednih časovnih intervalih določajo koncentracije preskusne snovi.

Kadar se pri polstatičnih preskusih pričakuje, da bo koncentracija preskusne kemikalije ostala v območju ± 20 % nominalne vrednosti (tj. v območju 80–120 % – glej odstavke 6, 7 in 39), je priporočeno, da se analizirajo vsaj najvišje in najnižje preskusne koncentracije, ko so sveže pripravljene, in ob enem obnavljanju v prvem tednu preskusa (tj. analize je treba izvesti na vzorcu iz iste raztopine – ko je sveže pripravljena in ob obnavljanju). Te določitve je nato treba ponavljati najmanj enkrat tedensko.

Kadar se pri preskusih ne pričakuje, da bo koncentracija preskusne kemikalije ostala v območju $\pm 20\%$ nominalne vrednosti, je treba analizirati vse preskusne koncentracije, ko so sveže pripravljene in ob obnavljanju. Kadar pa pri preskusih izmerjena začetna koncentracija preskusne kemikalije ni v območju $\pm 20\%$ nominalne vrednosti, ampak se lahko zagotovijo zadostni dokazi, da so začetne koncentracije ponovljive in obstojne (tj. v območju 80–120 % začetnih koncentracij), se kemijske določitve v drugem in tretjem tednu preskusa lahko zmanjšajo na najvišje in najnižje preskusne koncentracije. V vsakem primeru pa je treba koncentracije preskusne kemikalije pred obnavljanjem določiti samo za eno posodo s ponovljenim vzorcem pri vsaki preskusni koncentraciji.

Če se uporabi pretočni preskus, je ustrezno uporabiti podoben časovni raspored vzorčenja, kot je opisan za polstatične preskuse (toda v tem primeru se ne merijo „stare“ raztopine). Morda pa bi bilo priporočljivo povečati število vzorčenj v prvem tednu (npr. tri serije meritev), da se zagotovi ohranjanje obstojnosti preskusnih koncentracij. Pri teh vrstah preskusa je treba vsakodnevno preverjati pretok razredčila in preskusne kemikalije.

Če obstajajo dokazi, da je bila koncentracija preiskovane kemikalije ves čas trajanja preskusa ustrezno v območju $\pm 20\%$ nominalne ali izmerjene začetne koncentracije, lahko rezultati temeljijo na nominalni ali izmerjeni začetni vrednosti. Če je odstopanje od nominalne ali izmerjene začetne koncentracije večje od $\pm 20\%$, je treba rezultate izraziti v smislu tehtanega povprečja v določenem časovnem intervalu (glej smernice za izračun iz Dodatka 6).

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

Namen tega preskusa je določiti učinke preskusne kemikalije na sposobnost razmnoževanja. Skupno število živih potomcev na starša je treba izračunati za vsako preskusno posodo (tj. ponovljeni vzorec). Poleg se lahko razmnoževanje izračuna na podlagi živih potomcev, ki jih ustvari preživeli starš. Ekološko najpomembnejša spremenljivka odziva pa je skupno število živih potomcev, ustvarjenih na starša, ki ne umre naključno ⁽¹⁾ ali nenamerno ⁽²⁾ med preskusom. Če starš med preskusom naključno ali nenamerno umre, ali pa se izkaže, da je samec, se ponovljeni vzorec izključi iz analize. Analiza bo potem temeljila na zmanjšanem številu ponovljenih vzorcev. Če se smrtnost staršev pojavi v izpostavljenih ponovljenih vzorcih, je treba obravnavati, ali smrtnost sledi vzorcu odziva na koncentracijo ali ne, npr. če obstaja precejšnja regresija odziva v odvisnosti od koncentracije preskusne kemikalije s pozitivnim naklonom (za to se lahko uporabi statistični preskus, kot je Cochran-Armitagev trendnostni test). Če smrtnost ne sledi vzorcu odziva na koncentracijo, je treba navedene ponovljene vzorce s smrtnostjo staršev izključiti iz analize preskusnega rezultata. Če smrtnost sledi vzorcu odziva na koncentracijo, je treba smrtnost staršev obravnavati kot učinek preskusne kemikalije, ponovljeni vzorci pa se ne smejo izključiti iz analize preskusnega rezultata.

Torej kadar se za izražanje učinkov uporabijo LOEC in NOEC ali EC_x , je priporočeno, da se učinek na razmnoževanje izračuna z obema navedenima spremenljivkama odziva, tj.

- kot skupno število živih potomcev, ustvarjenih na starša, ki ne umre naključno ali nenamerno med preskusom, in
- kot število živih potomcev, ustvarjenih na preživelega starša,

nato pa se kot končni rezultat uporabi najnižja vrednost NOEC in LOEC ali EC_x , ki se izračuna z eno od teh dveh spremenljivk odziva.

Preden se uporabi statistična analiza, npr. postopki analize variance, primerjava tretiranj s kontrolami s Studentovim t-testom, Dunnettovim testom, Williamsovim testom ali testom po Jonckheere-Terpstraju, je priporočeno obravnavati pretvorbo podatkov, če je ta potrebna za izpolnitev zahtev določenega statističnega testa. V okviru drugih, neparametričnih možnosti se lahko obravnava Dunnov ali Mann-Whitneyjev test. Za povprečja posameznih tretiranj se izračunajo 95-odstotni intervali zaupanja.

⁽¹⁾ Naključna smrtnost: smrtnost, ki ni povezana s kemikalijo in jo povzroči naključni dogodek (tj. znani vzrok).

⁽²⁾ Nenamerna smrtnost: smrtnost, ki ni povezana s kemikalijo in nima znanega vzroka.

Število preživelih staršev v netretiranih kontrolah je merilo za veljavnost, ki ga je treba dokumentirati in navesti v poročilu. V končnem poročilu je treba navesti tudi vse druge škodljive učinke, npr. nenavadno vedenje in pomembne toksikološke ugotovitve.

EC_x

Vrednosti EC_x, vključno z njihovimi pripadajočimi zgornjimi in spodnjimi mejami zaupanja, se izračunajo z ustreznimi statističnimi metodami (npr. logistično ali Weibullovo funkcijo, prilagojeno Spearman-Kärberjevo metodo ali enostavno interpolacijo). Za izračun EC₁₀, EC₅₀ ali katere koli druge vrednosti EC_x je treba celoten nabor podatkov analizirati z regresijsko analizo.

NOEC/LOEC

Če je namen statistične analize določiti NOEC/LOEC, je treba uporabiti ustrezne statistične metode v skladu z dokumentom OECD št. 54 z naslovom Sodobni pristopi pri statistični analizi podatkov o ekotoksičnosti: smernice za uporabo (4). Na splošno se neželeni učinki preskusne kemikalije v primerjavi s kontrolo proučujejo s preskušanjem enostransko zastavljene hipoteze pri $p \leq 0,05$.

Normalna porazdelitev in homogenost varianc se lahko preskusita z ustreznim statističnim testom, npr. Shapiro-Wilkovim testom oziroma Levenovim testom ($p \leq 0,05$). Izvedejo se lahko enofaktorska analiza variance (ANOVA) in nadaljnje metode večkratne primerjave. Preskusi večkratne primerjave (npr. Dunnettov test) ali večstopenjski trendnostni testi (npr. Williamsov test ali test po Jonckheere-Terpstraju) se lahko uporabijo za izračun, ali obstajajo znatne razlike ($p \leq 0,05$) med kontrolami in različnimi koncentracijami preskusne kemikalije (izbira priporočenega testa v skladu z Dokumentom s smernicami OECD št. 54 (4)). V nasprotnem primeru se lahko za določanje vrednosti NOEC in LOEC uporabijo neparametrične metode (npr. Bonferronijev U-test po Holmu ali trendnostni test po Jonckheere-Terpstraju).

Mejni test

Če je bil izveden mejni test (primerjava kontrole in samo ene tretirane skupine) in so izpolnjeni predpogoji za postopke parametričnih testov (normalnost, homogenost), je mogoče s Studentovim testom (t-testom) ovrednotiti odzive metrik. Če te zahteve niso izpolnjene, se lahko uporabi t-test za neenake variance (na primer Welchov t-test) ali neparametrični test, kot je Mann-Whitneyjev U-test.

Za določanje značilnih razlik med kontrolami (kontrola in kontrola s topilom ali kontrola z disperzijskim sredstvom) se lahko preskusijo ponovljeni vzorci vsake kontrole, kot je opisano za mejni preskus. Če ti preskusi ne zaznajo značilnih razlik, se lahko združijo vsi kontrolni ponovljeni vzorci in kontrolni ponovljeni vzorci s topilom. V nasprotnem primeru je treba vse tretirane vzorce primerjati s kontrolo s topilom.

Poročilo o preskusu

V poročilo o preskusu se vključijo naslednji podatki:

Preskusna kemikalija:

- agregatno stanje in ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;
- kemijski identifikacijski podatki, vključno s čistostjo.

Preskusna vrsta:

- klon (ali je bil genetsko tipiziran), dobavitelj ali vir (če je znano) in uporabljeni pogoji gojenja. Če se ne uporabi vrsta *Daphnia magna*, ampak druga vrsta, je treba to navesti v poročilu in utemeljiti.

Preskusni pogoji:

- uporabljeni preskusni postopek (npr. polstatični ali pretočni, prostornina, obremenitev s številom vodnih bolh vrste *Daphnia* na liter);

- obdobje osvetljenosti in svetilnost;
- načrt preskusa (npr. število ponovljenih vzorcev, število staršev na ponovljeni vzorec);
- podrobnosti o uporabljenem gojišču;
- dodatki organskega materiala, če so uporabljeni, vključno s sestavo, virom, metodo priprave, TOC/KPK osnovnih pripravkov, oceno dobljenega TOC/KPK v preskusnem mediju;
- podrobne informacije o hranjenju, vključno s količino (v mg C/vodna bolha/dan) in časovnim razporedom (npr. vrsta hrane, pri algah vključno z določenim imenom vrste in, če je znano, sevom, pogoji gojenja);
- metoda priprave osnovnih raztopin in pogostost obnavljanja (navesti je treba topilo ali disperzijsko sredstvo in njegovo koncentracijo, če se uporabi).

Rezultati:

- rezultati kakršnih koli predhodnih študij o obstojnosti preskusne kemikalije;
- nominalne preskusne koncentracije in rezultati vseh analiz za določanje koncentracije preskusne kemikalije v preskusnih posodah (glej primer podatkovnih listov iz Dodatka 5); v poročilu je treba navesti tudi izkoristek metode in mejo določljivosti;
- kakovost vode v preskusnih posodah (tj. pH, temperatura in koncentracija raztopljenega kisika ter TOC in/ali KPK in trdota, kadar je to ustrezno) (glej primer podatkovnega lista iz Dodatka 4);
- v celoti je treba zabeležiti ustvarjanje živih potomcev na vsakega starša med preskusom (glej primer podatkovnega lista iz Dodatka 4);
- število smrti pri starših in dan posameznih smrti (glej primer podatkovnega lista iz Dodatka 4);
- koeficient variacije za sposobnost razmnoževanja v kontrolah (na podlagi skupnega števila živih potomcev na živega starša ob koncu preskusa);
- grafični prikaz skupnega števila živih potomcev, ustvarjenih na starša v vsakem ponovljenem vzorcu, pri čemer se izključijo vsi starši, ki so morda naključno ali nenamerno umrli med preskusom, v odvisnosti od koncentracije preskusne kemikalije;
- če je ustrezno, grafični prikaz skupnega števila živih potomcev, ustvarjenih na preživelega starša v vsakem ponovljenem vzorcu v odvisnosti od koncentracije preskusne kemikalije;
- kadar je ustrezno, najnižja koncentracija z opaženim učinkom (LOEC) za razmnoževanje, vključno z opisom uporabljenih statističnih postopkov in pokazateljem tega, zaznava kako močnega učinka se lahko pričakuje (za zagotovitev tega se lahko pred preskusom izvede analiza moči), in koncentracija brez opaznega učinka (NOEC) za razmnoževanje; informacije o tem, katera spremenljivka odziva je bila uporabljena za izračun vrednosti LOEC in NOEC (kot skupno število živih potomcev na mater, ki ni naključno ali nenamerno umrla med preskusom, ali kot skupno število živih potomcev na preživelo mater), kadar je to ustrezno, je v poročilu treba navesti tudi vrednost LOEC ali NOEC za smrtnost staršev;
- kjer je ustrezno, EC_x za razmnoževanje in intervale zaupanja (npr. 90- ali 95-odstotne) ter graf prilagojenega modela, ki je bil uporabljen za izračun te vrednosti, naklon krivulje odziva na koncentracijo in njena standardna napaka;
- drugi opaženi biološki učinki ali meritve: v poročilu je treba navesti vse druge biološke učinke, ki so bili opaženi ali izmerjeni (npr. rast staršev), vključno z ustrezno utemeljitvijo;
- razlaga kakršnega koli odstopanja od preskusne metode.

VIRI

- (1) OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, Združeno kraljestvo, 20–21, marec 1993.
 - (2) OECD (1997). Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment št. 6. OECD, Pariz.
 - (3) OECD (2008). Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, št. 88. OECD, Pariz.
 - (4) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment št. 54. OECD, Pariz.
 - (5) Baird, D. J., idr. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. *Ecotox. and Environ. Safety*, 21, 257–265.
 - (6) Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25–33.
 - (7) EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Peta izdaja. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. 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, 775–782.
 - (9) ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. V: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, zv. 11.04; ASTM E729 – 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA
 - (10) Baird, D. J., idr. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. V: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. København, 1988. (H. Løkke, H. Tyle in F. Bro-Rasmussen. Eds.) str. 144–148.
 - (11) Parkhurst, B. R., J. L. Forte. G. P. in Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.*, 26: 1–8.
 - (12) Cowgill, U. M. in Milazzo, D. P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. *Arch. Hydrobiol.*, 120(2): 185–196.
 - (13) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment št. 23. OECD, Pariz.
 - (14) Sims, I. R., S. Watson in D. Holmes (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 12, 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, 459–466.
-

Dodatek 1

OPREDELITEV POJMOV

Za to preskusno metodo se uporabljajo naslednje opredelitve pojmov:

Naključna smrtnost: smrtnost, ki ni povezana s kemikalijo in jo povzroči naključni dogodek (tj. znani vzrok).

Kemikalija: snov ali zmes.

Ec_x: koncentracija preskusne kemikalije, raztopljene v vodi, ki povzroči x-odstotno zmanjšanje pri razmnoževanju vrste *Daphniav* navedenem obdobju izpostavljenosti.

Nenamerna smrtnost: smrtnost, ki ni povezana s kemikalijo in nima znanega vzroka.

Intrinzična hitrost povečanja populacije: je merilo rasti populacije, ki združuje sposobnost razmnoževanja in smrtnost pri določeni starosti (1), (2) in (3). Pri stacionarnih populacijah je enaka nič. Pri rastočih populacijah je pozitivna, pri upadajočih pa negativna. Slednja seveda ni trajnostna in na koncu vodi k izumrtju.

Meja zaznavnosti: najnižja koncentracija, ki jo je mogoče zaznati, vendar ne količinsko opredeliti.

Meja določljivosti: najnižja koncentracija, ki jo je mogoče količinsko izmeriti.

Najnižja koncentracija z opaženim učinkom (LOEC): je najnižja preskušena koncentracija kemikalije, pri kateri je ugotovljen statistično značilen učinek na razmnoževanje in smrtnost staršev (pri $p < 0,05$) v primerjavi s kontrolo v navedenem obdobju izpostavljenosti. Toda vse koncentracije nad vrednostjo LOEC morajo imeti škodljiv učinek, ki je enak ali večji od škodljivega učinka, opaženega pri vrednosti LOEC. Če ta dva pogoja nista izpolnjena, je treba v celoti pojasniti, kako je bila izbrana vrednost LOEC (in posledično NOEC).

Smrtnost: žival se zabeleži kot mrtva, če se ne premika, tj. če ne more plavati ali če v 15 sekundah po rahlem tresenju preskusne posode ni mogoče opaziti premikanja okončin ali postabdomna. (Če se uporabi druga opredelitev pojmov, jo je treba navesti v poročilu skupaj z virom.)

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

Potomci: so mladiči vodne bolhe vrste *Daphnia*, ki jih starši ustvarijo med preskusom.

Starši: so samice vodne bolhe vrste *Daphnia*, ki so prisotne na začetku preskusa in katerih sposobnost razmnoževanja je predmet te študije.

Sposobnost razmnoževanja: število živih potomcev, ki jih ustvarijo starši med preskusnim obdobjem.

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

Viri

- (1) Wilson, E. O. in 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, New York, str. 532.
- (3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L. L. in Boyce, M. S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156–1166.

Dodatek 2

PRIPRAVA POVSEM DOLOČENIH MEDIJEV ELENDT M7 IN M4

Aklimatizacija na medija Elendt M7 in M4

Nekateri laboratoriji so imeli težave pri neposrednem prenosu vrste *Daphnia* v medija M4 (1) in M7. V določeni meri pa so to uspešno rešili s postopno aklimatizacijo, tj. s prenosom iz lastnega medija v 30-odstotni, 60-odstotni in nato v 100-odstotni medij Elendt. Aklimatizacijska obdobja lahko trajajo tudi do enega meseca.

Priprava

Elementi v sledeh

Ločene osnovne raztopine (I) s posameznimi elementi v sledeh se najprej pripravijo v vodi z ustrežno čistostjo, npr. deionizirani, destilirani ali pridobljeni z obratno osmozo. Iz teh različnih osnovnih raztopin (I) se pripravi druga osnovna raztopina (II), ki vsebuje vse elemente v sledeh (kombinirana raztopina), tj.:

Osnovna raztopina I (ena snov)	Količina, dodana vodi	Koncentracija (glede na medij M4)	Za pripravo kombinirane osnovne raztopine II se vodi doda naslednje količine osnovne raztopine I	
			M4	M7
	mg/l		ml/l	
H ₃ BO ₃	57 190	20 000-kratna	1,0	0,25
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	7 210	20 000-kratna	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-kratna	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000-kratna	1,0	0,25
SrCl ₂ ·6 H ₂ O	3 040	20 000-kratna	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-kratna	1,0	0,25
Mo Na ₂ O ₄ ·2 H ₂ O	1 260	20 000-kratna	1,0	0,25
CuCl ₂ ·2 H ₂ O	335	20 000-kratna	1,0	0,25
ZnCl ₂	260	20 000-kratna	1,0	1,0
CoCl ₂ ·6 H ₂ O	200	20 000-kratna	1,0	1,0
KI	65	20 000-kratna	1,0	1,0
Na ₂ SeO ₃	43,8	20 000-kratna	1,0	1,0
NH ₄ VO ₃	11,5	20 000-kratna	1,0	1,0
Na ₂ EDTA·2 H ₂ O	5 000	2 000-kratna	—	—
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	1 991	2 000-kratna	—	—

Raztopini Na₂EDTA in FeSO₄ se pripravita ločeno, zlijeta skupaj in nato takoj avtoklavirata. S tem se dobi:

raztopina Fe-EDTA		1 000-kratna	20,0	5,0
-------------------	--	--------------	------	-----

Medija M4 in M7

Medija M4 in M7 se pripravita z osnovno raztopino II, makrohranili in vitamini na naslednji način:

	Količina, dodana vodi	Koncentracija (glede na medij M4)	Količina dodane osnovne raztopine za pripravo medija	
			ml/l	
	mg/l		M4	M7
Osnovna raztopina II (skupni elementi v sledih)		20-kratna	50	50
Osnovne raztopine makrohranil (ena snov)				
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	293 800	1 000-kratna	1,0	1,0
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	246 600	2 000-kratna	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-kratna	0,1	0,1
NaHCO ₃	64 800	1 000-kratna	1,0	1,0
Na ₂ SiO ₃ ·9 H ₂ O	50 000	5 000-kratna	0,2	0,2
NaNO ₃	2 740	10 000-kratna	0,1	0,1
KH ₂ PO ₄	1 430	10 000-kratna	0,1	0,1
K ₂ HPO ₄	1 840	10 000-kratna	0,1	0,1
Kombinirana osnovna raztopina vitaminov	–	10 000-kratna	0,1	0,1

Kombinirana osnovna raztopina vitaminov se pripravi z dodajanjem treh vitaminov v en liter vode, kot je prikazano spodaj:

	mg/l			
tiamin hidroklorid	750	10 000-kratna		
Cianokobalamin (B ₁₂)	10	10 000-kratna		
Biotin	7,5	10 000-kratna		

Kombinirana osnovna raztopina vitaminov se hrani zamrznjena v majhnih enakih količinah. Vitamini se medijem dodajo tik pred uporabo.

Opomba: Da se prepreči obarjanje soli pri pripravi celotnega medija, se doda enake količine osnovnih raztopin v približno 500–800 ml deionizirane vode, ki se nato dopolni do enega litra.

Opomba: Prvi opis medija M4 je objavljen v Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25–33.

Dodatek 3

ANALIZA SKUPNEGA ORGANSKEGA OGLJIKA (TOC) IN IZDELAVA NOMOGRAMA ZA VSEBNOST TOC V HRANI IZ ALG

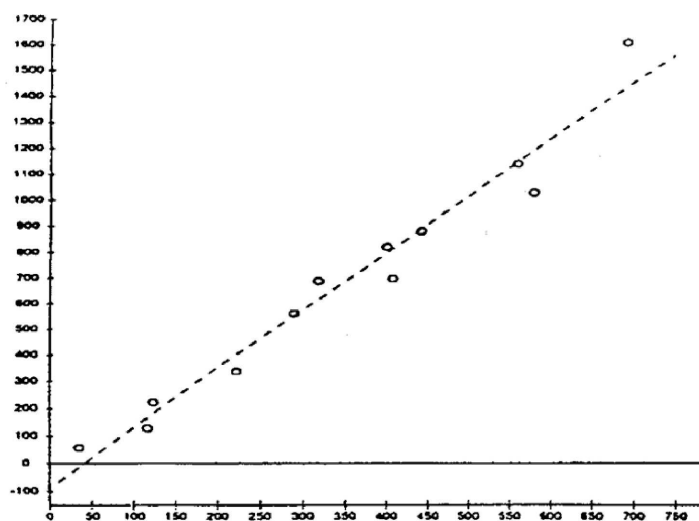
Ugotovljeno je bilo, da se vsebnost ogljika v hrani iz alg običajno ne meri neposredno, ampak na podlagi korelacij (tj. nomogramov) z nadomestnimi meritvami, kot sta število celic alg ali absorbanca svetlobe.

Skupni organski ogljik (TOC) je bolje meriti z visokotemperaturno oksidacijo kot pa z UV ali persulfatnimi metodami. (Za nasvet glej: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Za izdelavo nomograma je treba alge ločiti od gojišča s centrifugiranjem, ki mu sledi ponovno suspendiranje v destilirani vodi. Nadomestni parameter in koncentracija TOC za vsak vzorec se izmerita trikrat. Analizirati je treba slepe kontrolne vzorce z destilirano vodo in izpeljati koncentracijo TOC iz koncentracije TOC v vzorcu alg.

Nomogram mora biti linearen v zahtevanem območju koncentracij ogljika. Primeri so prikazani v nadaljevanju.

OPOMBA: ti primeri se ne smejo uporabiti za pretvorbo; ključnega pomena je, da laboratoriji pripravijo svoje nomograme.



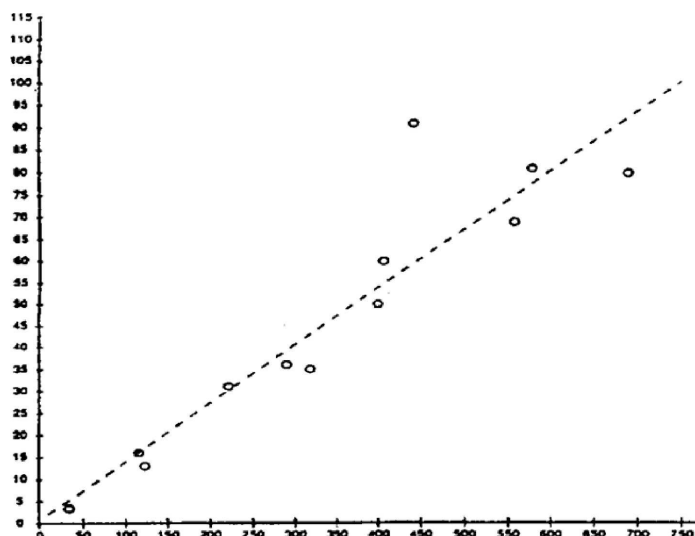
Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regresija mg/l suhe teže na mg C/l. Podatki iz koncentriranih suspenzij v polkontinuirani seriji gojenih celic, ponovno suspendiranih v destilirani vodi.

os x: mg C/l koncentrirane hrane iz alg

os y: mg/l suhe teže koncentrirane hrane iz alg

Korekcijski koeficient -0,980



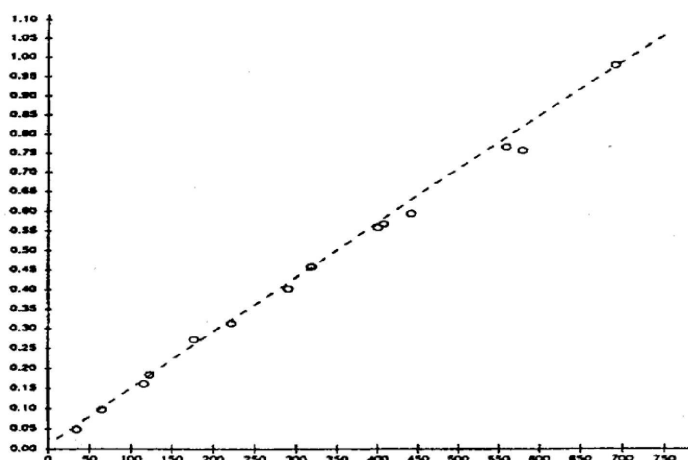
Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regresija števila celic na mg C/1. Podatki iz koncentriranih suspenzij v polkontinuirani seriji gojenih celic, ponovno suspendiranih v destilirani vodi.

os x: mg C/1 koncentrirane hrane iz alg

os y: št. celic/1 koncentrirane hrane iz alg

Korekcijski koeficient -0,926



Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regresija absorbance na mg C/1 (1 cm dolžine poti). Podatki iz koncentriranih suspenzij v polkontinuirani seriji gojenih celic, ponovno suspendiranih v destilirani vodi.

os x: mg C/1 koncentrirane hrane iz alg

os y: absorbanca pri 440 nm pri 1/10 razredčitvi koncentrirane hrane iz alg

Korekcijski koeficient -0,998

Dodatek 4

PRIMER PODATKOVNEGA LISTA ZA BELEŽENJE OBNAVLJANJA MEDIJEV, FIZIKALNIH/KEMIJSKIH PODATKOV O SPREMLJANJU, HRANJENJA, RAZMNOŽEVANJA VODNIH BOLH IN SMRTNOST STARŠEV

Št. preskusa	Datum začetka:					Klon:				Medij:				Vrsta hrane:						Preskusna kemi-kalija:					Nominalna koncentracija:	
	Dan	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21			
Obnavljanje medija (označi)																										
pH (*)																									nova	
																									stara	
O ₂ (mg/l) (*)																									nova	
																									stara	
Temperatura (°C) (*)																									nova	
																									stara	
Zagotovljena hrana (označi)																										
Št. živih potomcev (**)																									Skupaj	
Posoda 1																										
2																										
3																										
4																										
5																										
6																										
7																										
8																										
9																										
10																										
																									Skupaj	
Skupna smrtnost staršev (***)																										

(*) Navedite, katera posoda je bila uporabljena za preskus.
 (**) Zabeležite nedozorele zarode kot „AB“ v ustreznem okencu.
 (***) Zabeležite smrtnost katerega koli starša kot „M“ v ustreznem okencu.

Dodatek 6

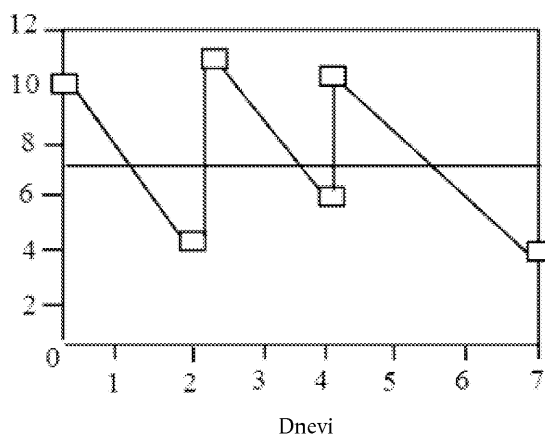
IZRAČUN TEHTANEGA POVPREČJA V DOLOČENEM ČASOVNEM INTERVALU

Tehtano povprečje v določenem časovnem intervalu

Ker lahko koncentracija preskusne kemikalije v obdobju med obnavljanjem medija upade, je treba obravnavati, kakšno koncentracijo je treba izbrati kot reprezentativno za območje koncentracij, ki so jim izpostavljeni starši vrste *Daphnia*. Izbira mora temeljiti na bioloških in statističnih vidikih. Če naj bi na razmnoževanje na primer najbolj vplivala najvišja koncentracija, ki so ji živali izpostavljene, je treba uporabiti najvišjo koncentracijo. Če pa naj bi bil pomembnejši akumulirani ali dolgotrajni učinek toksične kemikalije, je ustrezneje izbrati povprečno koncentracijo. V tem primeru je ustrezno uporabiti tehtano povprečje v določenem časovnem intervalu za koncentracijo, saj ta upošteva spreminjanje trenutne koncentracije v odvisnosti od časa.

Slika 1

Primer tehtanega povprečja v določenem časovnem intervalu



Slika 1 prikazuje primer (poenostavljenega) preskusa, ki je trajal sedem dni, medij pa se je obnavljal na dneve 0, 2 in 4.

- Tanka cikcakasta črta predstavlja koncentracijo v odvisnosti od časa. Predvideva se, da naj bi padec koncentracije sledil eksponentnemu procesu upadanja.
- Šest grafično prikazanih točk predstavlja opažene koncentracije, izmerjene na začetku in koncu vsakega obdobja obnavljanja.
- Ravna debela črta prikazuje položaj tehtanega povprečja v določenem časovnem intervalu.

Tehtano povprečje v določenem časovnem intervalu se izračuna tako, da je površina pod tehtanim povprečjem enaka površini pod krivuljo koncentracije. Izračun za navedeni primer je prikazan v preglednici 1.

Preglednica 1

Izračun tehtanega povprečja v določenem časovnem intervalu

Obnavljanje št.	Dnevi	Koncentracija 0	Koncentracija 1	Ln (koncentracija 0)	Ln(koncentracija 1)	Površina
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544

Obnavljanje št.	Dnevi	Koncentracija 0	Koncentracija 1	Ln (koncentracija 0)	Ln(koncentracija 1)	Površina
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Skupno dni:	7				Skupna površina:	50,092
					Tehtano povprečje:	7,156

Dnevi je število dni v obdobju obnavljanja.

Koncentracija 0 je koncentracija, izmerjena na začetku vsakega obdobja obnavljanja.

Koncentracija 1 je koncentracija, izmerjena na koncu vsakega obdobja obnavljanja.

Ln(koncentracija 0) je naravni logaritem koncentracije 0.

Ln(koncentracija 1) je naravni logaritem koncentracije 1.

Površina je površina pod eksponentno krivuljo za vsako obdobje obnavljanja. Izračuna se z enačbo:

$$Area = \frac{Conc\ 0 - Conc\ 1}{Ln(Conc\ 0) - Ln(Conc\ 1)} \times Day$$

Tehtano povprečje v določenem časovnem intervalu (*tehtano povprečje*) je *skupna površina* deljeno s *skupno dni*.

Seveda je treba za preskus razmnoževanja vrste *Daphnia* preglednico razširiti na 21 dni.

Če se opazovanja opravijo samo na začetku in na koncu vsakega obdobja obnavljanja, seveda ni mogoče potrditi, ali je proces upadanja dejansko eksponenten. Drugačna krivulja bi pomenila drugačen izračun za *površino*. Vendar eksponentni proces upadanja ni nemogoč in je verjetno najboljša krivulja, ki se lahko uporabi, če ni na voljo drugih informacij.

Previdno pa je treba obravnavati rezultate, če se s kemijsko analizo na koncu obdobja obnavljanja ne najde nobene kemikalije. Če ni mogoče oceniti, kako hitro je kemikalija izginila iz raztopine, je nemogoče dobiti realistično površino pod krivuljo, zato je tudi nemogoče dobiti ustrezno tehtano povprečje v določenem časovnem intervalu.

Dodatek 7

SMERNICE ZA OPREDELJEVANJE SPOLA NOVOROJENIH ŽIVALI

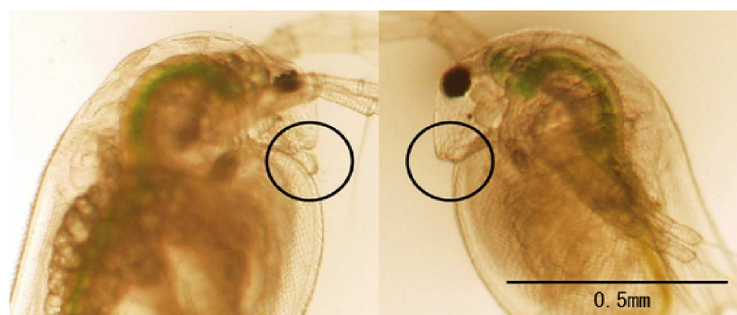
Do ustvarjanja novorojenih samcev lahko pride v spremenljivih okoljskih pogojih, kot so skrajšano obdobje osvetljenosti, temperatura, upadanje koncentracije v hrani in vedno večja gostota populacije (Hobaek in Larson, 1990; Kleiven idr., 1992). Ustvarjanje samcev je tudi znan odziv na določene regulatorje rasti žuželk (Oda idr., 2005). V pogojih, ko kemijski obremenilni dejavniki povzročajo upadanje števila za razmnoževanje sposobnih potomcev partenogenetskih samic, je mogoče pričakovati večje število samcev (OECD, 2008). Na podlagi razpoložljivih informacij ni mogoče predvideti, ali bo občutljivejše razmerje med spoloma ali končna točka razmnoževanja, obstajajo pa pokazatelji (glej „validacijsko poročilo“, del 1), da je to povečanje števila samcev morda manj občutljivo kot pa upadanje števila potomcev. Ker je glavni namen te preskusne metode oceniti število ustvarjenih potomcev, je pojavljanje samcev neobvezno opažanje. Če se ta neobvezna končna točka oceni v študiji, je treba uporabiti dodatno merilo za veljavnost preskusa z ne več kot 5 % samci v kontrolah.

Spol vrste *Daphnia* se najbolj praktično in preprosto ugotovi tako, da se uporabi njihove fenotipske značilnosti, saj so samci in samice genetsko identični, na določitev spola pa vpliva okolje. Samci in samice so si različni po dolžini in morfologiji sprednjih tipalk, ki so pri samcih daljše kot pri samicah (slika 1). Razliko je mogoče prepoznati takoj po rojstvu, med odraščanjem pa se razvijejo tudi druge sekundarne spolne značilnosti (npr. glej sliko 2 v Olmstead in LeBlanc, 2000).

Za ugotavljanje morfološkega spola je treba novorojene živali, ustvarjene na vsako poskusno žival, prenesi s pipeto in jih vstaviti v petrijevko s preskusnim medijem. Prostornina medija je čim manjša, da se omeji gibanje živali. Sprednje tipalke se lahko opazijo pod stereomikroskopom (10–60).

Slika 1

24-ur star samec (levo) in samica (desno) vrste *D. magna*. Samce je mogoče ločiti od samic po dolžini in morfologiji sprednjih tipalk, kot je prikazano v krogih (Tatarazako idr., 2004).



VIRI

Hobaek A. in 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, 197–206.

Oda S., Tatarazako N., Watanabe H., Morita M., in 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. OECD Series on Testing and Assessment, št. 88. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

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. in Iguchi T., 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). *Environmental Science* 17, 439–449.“

(18) V delu C se poglavje C.29, odstavek 66, nadomesti z naslednjim:

„66. Šteje se, da je preskus veljaven, če:

- a) je povprečni odstotek razgradnje v posodah F_C , ki vsebujejo referenčno kemikalijo, > 60-odstoten do 14. dneva inkubacije in
- b) je povprečna količina TIC v slepih kontrolnih vzorcih F_B ob koncu preskusa > 3 mg C/l.

Če tem omejitvam ni zadoščeno, je treba preskus ponoviti z inokulumom iz drugega vira in/ali pregledati uporabljene postopke. Če je na primer težava velika količina nastajanja IC v slepem vzorcu, je treba uporabiti postopek iz odstavkov 27–32.“

(19) V delu C se dodajo naslednja poglavja:

„C.47 Ribe, preskus toksičnosti za zgodnje razvojne stopnje

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD (TG) 210 (2013). Preskusi zgodnjih razvojnih stopenj rib so namenjeni opredelitvi letalnih in subletalnih učinkov kemikalij na stopnje in vrste rib, ki se preskušajo. So pomemben vir informacij za oceno kroničnih letalnih in subletalnih učinkov kemikalije na druge vrste rib.
2. Smernica za preskušanje št. 210 temelji na predlogu Združenega kraljestva, ki je bil obravnavan na srečanju strokovnjakov OECD v Medmenhamu (Združeno kraljestvo) novembra 1988 in posodobljen leta 2013, da bi odražal izkušnje pri uporabi preskusa in priporočila z delavnice OECD o preskušanju toksičnosti za ribe, ki je potekala septembra 2010 (1).

NAČELO PRESKUSA

3. Ribe so v zgodnjih razvojnih stopnjah izpostavljene različnim koncentracijam preskusne kemikalije, raztopljene v vodi. Če je mogoče, se uporabijo pretočni pogoji; če to ni mogoče, so sprejemljivi tudi polstatični pogoji. Za podrobnosti glej dokument s smernicami OECD za preskušanje toksičnosti zahtevnih snovi in zmesi za vodno okolje (2). Preskus se začne tako, da se oplojene ikre vstavijo v preskusne komore, kjer ostanejo toliko časa, kolikor je potrebnega, da kontrolne ribe te vrste dosežejo življenjsko stopnjo mladice. Ocenijo se letalni in subletalni učinki ter se primerjajo s kontrolnimi vrednostmi za določitev najnižje koncentracije z opaženim učinkom (LOEC) ter za posledično določitev (i) koncentracije brez opaznega učinka (NOEC) in/ali (ii) EC_x (npr. EC_{10} , EC_{20}) z regresijskim modelom, s katerim se oceni koncentracija, ki bi povzročila x-odstotno spremembo izmerjenega učinka. Poročanje o pomembnih koncentracijah z učinkom in parametrih je lahko odvisno od regulativnega okvira. Preskusne koncentracije bi morale oklepiti vrednost EC_x , tako da vrednost EC_x nato izvira iz interpolacije in ne iz ekstrapolacije (za opredelitev pojmov glej Dodatek 1).

INFORMACIJE O PRESKUSNI KEMIKALIJI

4. Preskusna kemikalija je kemikalija, ki se preskuša. Poznati je treba topnost v vodi (glej poglavje A.6 te priloge) in parni tlak (glej poglavje A.4 te priloge), na voljo pa mora biti tudi zanesljiva analitska metoda za kvantifikacijo kemikalije v preskusnih raztopinah z znano in izpričano točnostjo ter mejo določljivosti. Čeprav preskus ni obvezen, lahko rezultati preskusa akutne toksičnosti (glej poglavji C.1 in C.49 te priloge), po možnosti izvedenega z vrstami, izbranimi za ta preskus, zagotovijo koristne informacije.

5. Če se preskusna metoda uporablja za preskušanje zmesi, mora biti njena sestava v čim večji meri opredeljena, npr. s kemijsko identiteto sestavin, kvantitativnim pojavljanjem in specifičnimi lastnostmi snovi (kot so tiste, navedene zgoraj). Pred uporabo preskusne metode za regulativno preskušanje zmesi je treba proučiti, ali bo zagotovila sprejemljive rezultate za predvideni regulativni namen.
6. Druge uporabne informacije so strukturna formula, čistost snovi, topnost v vodi, stabilnost v vodi in na svetlobi, pK_a , P_{ow} ter rezultati preskusa za lahko biološko razgradljivost (npr. poglavji C.4 in C.29 te priloge).

VELJAVNOST PRESKUSA

7. Za veljavnost preskusa morajo biti izpolnjeni naslednji pogoji:
 - koncentracija raztopljenega kisika mora biti med celotnim preskusom večja od 60 % nasičenosti z zrakom,
 - razlika v temperaturi vode v različnih preskusnih komorah ali v zaporednih dneh med preskusom nikoli ne sme biti večja od $\pm 1,5$ °C in jo je treba ohranjati znotraj temperaturnih območij, določenih za preskusno vrsto (Dodatek 2),
 - obvezna je analitska meritev preskusnih koncentracij,
 - število vseh preživelih oplojenih iker ter preživetje po izvalitvi v kontrolah in, kadar je primerno, v kontrolah s topilom mora biti večje ali enako mejnim vrednostim iz Dodatka 2.
8. Če se opazi manjše odstopanje od meril za veljavnost preskusa, je treba posledice obravnavati glede na zanesljivost preskusnih podatkov in ta obravnavanja vključiti v poročilo. Poročati je treba o učinkih na preživetje, izvalitev ali rast v kontroli s topilom v primerjavi z negativno kontrolo ter jih obravnavati glede na zanesljivost preskusnih podatkov.

OPIS METODE

Preskusne komore

9. Uporabijo se lahko kakršne koli steklene, nerjavne ali druge kemijsko inertne posode. Ker je znano, da silikon zelo dobro absorbira lipofilne snovi, je treba uporabo silikonskih cevi pri študijah s pretočnimi postopki in uporabo silikonskih tesnil pri stiku z vodo čim bolj omejiti npr. z uporabo steklenih akvarijev iz enega kosa. Posode morajo biti dovolj velike, da omogočajo ustrezno rast v kontroli, vzdrževanje koncentracije raztopljenega kisika (npr. za majhne vrste rib to zagotavlja posoda s prostornino 7 litrov) in skladnost s stopnjo obremenitve iz odstavka 19. Priporočljivo je, da se preskusne komore naključno postavijo v preskusno območje. Bolj kot povsem naključna zasnova se priporoča zasnova naključne razdelitve v bloke, pri kateri se v vsakem bloku izvedejo vsa tretiranja. Preskusne komore morajo biti zaščitene pred neželenimi motnjami. Preskusni sistem mora biti po možnosti dovolj dolgo izpostavljen koncentracijam preskusne kemikalije, da pred vnosom preskusnih organizmov dokaže stabilnost koncentracij za izpostavljanje.

Izbira vrst

10. Priporočene vrste rib so navedene v preglednici 1. To ne izključuje uporabe drugih vrst, vendar bo morda treba temu prilagoditi preskusni postopek, da se zagotovijo primerni preskusni pogoji. V tem primeru je treba utemeljiti izbiro vrste in preskusne metode.

Vzdrževanje plemenskih rib

11. Podrobnosti o vzdrževanju plemenskih rib v zadovoljivih pogojih lahko najdemo v Dodatku 3 in v virih (3) (4) (5).

Ravnanje z oplojenimi ikrami, zarodki in ličinkami

12. Oplojene ikre, zarodki in ličinke se lahko na začetku izpostavijo v glavni posodi v manjših steklenih ali posodah iz nerjavnega jekla, ki imajo mrežaste stranice ali konce, da se lahko skozi posodo pretaka preskusna raztopina. Neturbulentni tok skozi te majhne posode se lahko doseže tako, da se posode obesijo na držalo, nameščeno tako, da premika posodo gor in dol, vendar tako, da so organizmi ves čas potopljeni. Oplojene ikre salmonidnih rib lahko ležijo na podstavkih ali mrežah z dovolj velikimi luknjicami, da lahko ličinke, ko se izležejo, padejo skozi.
13. Kadar se za zadrževanje iker v glavni preskusni posodi uporabljajo posodice, rešetke ali mreže za ikre, je treba te priprave, ko se ličinke izležejo, odstraniti v skladu s smernicami iz Dodatka 3, obdržijo se le mreže, da ličinke ne pobegnejo. Če je treba ličinke prenesti, se te ne smejo izpostaviti zraku in pri spuščanju ličink iz posod za ikre se ne smejo uporabljati lovilne mrežice. Čas prenosa je različen glede na vrsto in ga je treba zapisati v poročilo. Prenos pa ni vedno nujno potreben.

Voda

14. Za preskusno vodo se lahko uporabi katera koli voda, v kateri preskusna vrsta dokaže sposobnost primerne dolgotrajnega preživetja in rasti (glej Dodatek 4). Kakovost vode mora biti ves čas trajanja preskusa konstantna. Da voda za redčenje ne bi neprimerno vplivala na rezultat preskusa (na primer s kompleksacijo preskusne kemikalije) ali škodljivo učinkovala na produktivnost plemenskih rib, je treba v časovnih razmikih jemati vzorce za analizo. Meritve težkih kovin (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), glavnih anionov in kationov (e.g. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), amonijaka, skupnih preostalih kloridnih pesticidov, skupnega organskega ogljika in suspendiranih trdnih snovi je treba izvesti na primer dvakrat letno, kadar je voda za redčenje po svoji kakovosti relativno konstantna. Če je znano, da je kakovost vode spremenljiva, je treba meritve izvajati pogosteje; pogostost je odvisna od tega, kako spremenljiva je kakovost. Nekatere kemijske lastnosti sprejemljive vode za redčenje so navedene v Dodatku 4.

Preskusne raztopine

15. Za pretočne preskuse je potreben sistem, ki stalno odmerja in redči osnovno raztopino preskusne kemikalije (npr. merilna črpalka, proporcionalni razredčevalnik, sistem naprav za nasičenje), da dovaja niz koncentracij v preskusne komore. Pretok osnovnih raztopin in vode za redčenje je treba med preskusom preverjati v časovnih razmikih in se ne sme razlikovati za več kot 10 % med celotnim preskusom. Ugotovljeno je bilo, da je primeren pretok enak prostornini vsaj petih preskusnih komor na 24 ur (3). Ob upoštevanju stopnje obremenitve iz odstavka 19 je za preprečitev hitre odstranitve hrane mogoče uporabiti tudi manjši pretok, npr. 2–3 preskusne komore.
16. Preskusne raztopine izbranih koncentracij se pripravijo z redčenjem osnovne raztopine. Osnovno raztopino je treba po možnosti pripraviti preprosto z mešanjem ali stresanjem preskusne kemikalije v vodi za redčenje z uporabo mehanskih sredstev (npr. z mešanjem in/ali ultrazvokom). Za pridobitev primerno koncentrirane osnovne raztopine se lahko uporabijo kolone za nasičevanje raztopine ali metode pasivnega odmerjanja (6). Uporaba topila kot nosilca ni priporočljiva. Če je topilo potrebno, je treba vzporedno izvajati kontrolo s topilom z enako koncentracijo topila kot pri tretiranjih s kemikalijo; odmerek topila bi moral biti po možnosti enak pri vseh koncentracijah in pri kontroli s topilom. Pri nekaterih sistemih razredčevalnikov je to tehnično težko izvedljivo; pri njih mora biti koncentracija topila pri kontroli s topilom enaka najvišji koncentraciji topila v tretirani skupini. Za snovi, ki jih je težko preskušati, glej Dokument s smernicami OECD št. 23 za preskušanje toksičnosti zahtevnih snovi in zmesi za vodno okolje (2). Če se uporabi topilo, se izbere na podlagi kemijskih lastnosti snovi. V skladu z Dokumentom s smernicami OECD št. 23 se priporoča največja koncentracija 100 $\mu\text{l/l}$. Da bi se izognili možnemu učinku topila na izmerjene končne točke (7), se priporoča čim nižja koncentracija topila.
17. Za polstatični preskus se lahko uporabita dva različna postopka obnove. Bodisi se pripravijo nove preskusne raztopine v čistih posodah ter se preživele ikre in ličinke nežno prenesejo v nove posode bodisi preskusni organizmi ostanejo v preskusnih posodah, medtem ko se zamenja del (vsaj dve tretjini) preskusne raztopine/prostornine kontrole.

POSTOPEK

Pogoji izpostavljenosti

Trajanje

18. Preskus je treba začeti čim prej po tem, ko se ike oplodijo in se po možnosti potopijo v preskusne raztopine pred začetkom brazdanja blastodiska, ali čim prej po tej stopnji. Trajanje preskusa bo odvisno od uporabljene vrste. Nekatera priporočena trajanja so navedena v Dodatku 2.

Obremenitev

19. Število oplojenih iker mora biti na začetku preskusa dovolj veliko, da izpolnjuje statistične zahteve. Ikre je treba naključno porazdeliti med tretiranja in za vsako koncentracijo je treba uporabiti vsaj 80 iker, ki morajo biti enakomerno porazdeljene med vsaj štiri ponovitvene preskusne komore. Stopnja obremenitve (biomasa na prostornino preskusne raztopine) mora biti dovolj nizka, da se lahko v razvojni stopnji ike in ličinke brez prezračevanja ohranja koncentracija raztopljenega kisika, ki znaša vsaj 60 % nasičenosti z zrakom. Za pretočne preskuse je priporočena stopnja obremenitve, ki nikoli ne presega 0,5 g/l mokre teže na 24 ur in ne presega 5 g/l raztopine (3).

Svetloba in temperatura

20. Obdobje osvetljenosti in temperatura vode morata biti ustrezna za preskusno vrsto (glej Dodatek 2).

Hranjenje

21. Hrana in hranjenje sta ključna, zato je bistveno, da se pravilna hrana za posamezno življenjsko stopnjo dovaja v ustreznem trenutku in v količini, ki je ustrezna za normalno rast. Hranjenje mora biti med različnimi ponovljenimi vzorci približno enako, razen če se ne prilagodi zaradi smrtnosti. Ostanke hrane in iztrebke je treba odstraniti, da se prepreči kopičenje odpadkov. Načini hranjenja so podrobno opisani v Dodatku 3, vendar se s pridobljenimi izkušnjami hrana in načini hranjenja stalno izpopolnjujejo, da se izboljšata preživetje in rast. Z živo hrano se bogati okolje, zato jo je treba uporabljati namesto suhe ali zamrznjene hrane ali kot njen dodatek vedno, ko to omogočata vrsta in razvojna stopnja.

Preskusne koncentracije

22. Običajno je potrebnih pet koncentracij preskusne kemikalije z najmanj štirimi ponovljenimi vzorci na koncentracijo, ki se med seboj razlikujejo za konstantni faktor, ki ni večji od 3,2. Če so na voljo informacije o preskušanju akutne toksičnosti, po možnosti z istimi vrstami in/ali preskusom za določanje območja delovanja, jih je treba upoštevati (1) pri izbiri območja preskusnih koncentracij. Pri izbiri območja preskusnih koncentracij je treba upoštevati vse vire informacij, vključno z viri, kot so navzkrižno branje ali podatki preskusa akutne toksičnosti za ribji zarodek. Kadar je treba določiti le empirične NOEC, je kot končni preskus lahko sprejemljiv mejni preskus ali podaljšani mejni preskus z manj kot petimi koncentracijami. Če se uporabi manj kot pet koncentracij, je treba to utemeljiti. Koncentracij preskusne kemikalije, ki so višje od LC₅₀ po 96 urah ali 10 mg/l, katera koli je nižja, ni treba preskušati.

Kontrole

23. Poleg niza koncentracij preskusne kemikalije je treba izvesti tudi kontrolo z vodo za redčenje in po potrebi kontrolo s topilom, ki kot nosilec vključuje le topilo (glej odstavek 16).

Pogostost analitskega določanja in meritev

24. Pred začetkom obdobja izpostavljenosti je treba pri vseh ponovljenih vzorcih zagotoviti ustrezno delovanje sistema za dovajanje kemikalije (na primer z meritvijo preskusnih koncentracij). Vzpostaviti je treba analitske metode, vključno z ustrezno mejo določljivosti (LOQ) in zadostnim znanjem o stabilnosti snovi v preskusnem sistemu. Med preskusom se koncentracije preskusne kemikalije določijo v rednih časovnih razmikih za opredeljevanje izpostavljenosti. Potrebni je najmanj pet določitev. Pri pretočnih sistemih je treba vsaj enkrat tedensko izvesti analitske meritve preskusne kemikalije pri enem ponovljenem vzorcu na koncentracijo, pri čemer je treba ponovljene vzorce sistematično menjavati. Dodatne analitske določitve pogosto izboljšajo kakovost rezultatov preskusa. Vzorce bo morda treba filtrirati (npr. skozi pore, velike 0,45 µm), da se odstranijo delci, ali centrifugirati, da se zagotovijo določitve kemikalije v dejanski raztopini. Za zmanjšanje adsorpcije preskusne kemikalije je treba zagotoviti, da so filtri pred uporabo nasičeni. Če izmerjene koncentracije ne ostanejo v območju 80–120 % nominalne koncentracije, je treba koncentracije z učinkom pri pretočnih preskusih določiti in izraziti glede na aritmetično sredino koncentracij (za izračun aritmetične sredine (8) glej Dodatek 6 k preskusni metodi C.20), pri polstatičnih preskusih pa izraziti glede na geometrijsko sredino izmerjenih koncentracij (glej poglavje 5 Dokumenta s smernicami OECD za preskušanje toksičnosti zahtevnih snovi in zmesi za vodno okolje (2)).
25. Med preskusom je treba raztopljeni kisik, pH in temperaturo v vseh preskusnih posodah meriti vsaj enkrat tedensko, slanost in trdoto, če je to upravičeno, pa na začetku in koncu preskusa. Temperatura se po možnosti stalno spremlja v vsaj eni preskusni posodi.

Opazovanja

26. **Stopnje razvoja zarodka:** embrionalno stopnjo na začetku izpostavljenosti preskusni kemikaliji je treba čim natančneje preveriti. To se lahko naredi z uporabo reprezentativnega vzorca iker, ki so primerno konzervirane in očiščene.
27. **Izvalitev in preživetje:** vsaj enkrat na dan je treba opazovati izvalitev in preživetje ter zapisati vrednosti. Če se v zgodnjem razvoju zarodka (na primer prvi ali drugi dan preskusa) na ikrah opazijo glive, je treba te ikre prešteti in odstraniti. Mrtve zarodke, ličinke in mladice je treba odstraniti čim prej po tem, ko se opazijo, ker se lahko hitro razkrojijo in razpadejo zaradi delovanja drugih rib. Izjemna pazljivost je potrebna pri odstranjevanju posameznih mrtvih osebkov, da se fizično ne poškodujejo sosednje ikre/ličinke. Znaki smrti je razlikujejo glede na vrsto in razvojno stopnjo. Na primer:
- pri oplojenih ikrah: zlasti v zgodnjih stopnjah opazna izguba prosojnosti in sprememba barve, ki jo povzroči koagulacija in/ali obarjanje beljakovin, ki povzročajo bel moten videz;
 - pri zarodkih, ličinkah in mladica: negibnost in/ali odsotnost dihalnega gibanja in/ali odsotnost srčnega utripa in/ali pomanjkanje odzivanja na mehanske dražljaje.
28. **Nenormalen videz:** število ličink ali mladice, pri katerih se kaže nenormalna oblika telesa, je treba zapisovati v ustreznih časovnih razmikih, ki so odvisni od trajanja preskusa, pri čemer je treba opisati naravo anomalije. Opozoriti je treba, da so nenormalne ličinke in mladice lahko naraven pojav in jih je v kontrolah pri nekaterih vrstah lahko več odstotkov. Kadar so deformacije in z njimi povezano nenormalno vedenje tako hudi, da organizem znatno trpi in si ne bo več mogel opomoči, se lahko izloči iz preskusa. Te živali je treba evtanazirati in jih v nadaljnji analizi podatkov zajeti v odstotek smrtnosti. Normalen razvoj zarodka je evidentiran za večino vrst, priporočenih za to preskusno metodo (9) (10) (11) (12).
29. **Nenormalno vedenje:** anomalije, npr. hiperventilacijo, nekoordinirano plavanje, netipično mirovanje in netipično vedenje pri hranjenju, je treba zapisovati v rednih časovnih razmikih, ki so odvisni od trajanja preskusa (npr. enkrat na dan pri toplovodnih vrstah). Čeprav je te učinke težko kvantificirati, lahko, če so opaženi, pripomorejo k razlagi podatkov o smrtnosti.

30. **Teža:** na koncu preskusa se vse preživle ribe tehtajo vsaj na podlagi ponovljenih vzorcev (v poročilo se vključita število živali v ponovljenem vzorcu in srednja vrednost teže na žival): priporoča se, da se v poročilo vključi mokra teža (osušena s pivnikom), vendar se lahko vanj vključijo tudi podatki o suhi teži (13).
31. **Dolžina:** na koncu preskusa se izmeri dolžina posameznih osebkov. Priporočljiva je meritev skupne dolžine, če pa pride do razpada repne plavuti ali erozije plavuti, se lahko uporabi standardna dolžina. Izbrano metodo je treba uporabiti pri vseh ribah v danem preskusu. Dolžina posameznega osebkca se lahko izmeri na primer s kljunastim merilom, digitalnim fotoaparatom ali kalibriranim okularnim mikrometrom. Običajne najmanjše dolžine so opredeljene v Dodatku 2.

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

32. Priporočljivo je, da zasnova preskusa in izbira statističnega testa zagotavljata ustrezno moč (80 % ali več) opažanja biološko pomembnih sprememb pri končnih točkah, kjer se poroča o NOEC. Poročanje o pomembnih koncentracijah z učinkom in parametrih je lahko odvisno od regulativnega okvira. Če se poroča o EC_x , morata zasnova preskusa in izbira regresijskega modela omogočati oceno vrednosti EC_x , tako da (i) 95-odstotni interval zaupanja za EC_x ne bo vseboval ničle in ne bo preširok, (ii) da 95-odstotni interval zaupanja za napovedano srednjo vrednost EC_x ne bo vseboval srednje vrednosti kontrole in (iii) da ne bo statistično značilne neprilagojenosti regresijskega modela podatkom. Pri obeh pristopih je treba opredeliti odstotek spremembe pri vsaki končni točki, ki je pomemben za zaznavanje ali oceno. Preskus mora biti zasnovan tako, da to omogoča. Kadar zgoraj navedeni pogoji za določitev EC_x niso izpolnjeni, je treba uporabiti pristop NOEC. Enak odstotek spremembe najverjetneje ne bo veljal za vse končne točke, poleg tega izvedljivega preskusa najverjetneje ne bo mogoče zasnovati tako, da bodo ta merila izpolnjena pri vseh končnih točkah, zato se je treba pri ustreznem načrtovanju preskusa osredotočiti na končne točke, ki so pomembne za preskus. Statistični diagrami in smernice za oba pristopa so na voljo v dodatkih 5 in 6; namenjeni so pomoči pri obdelavi podatkov in izbiri najustreznejšega statističnega testa ali modela. Lahko se uporabijo tudi drugi statistični pristopi, vendar le, če so znanstveno utemeljeni.
33. Variacije je treba v vsakem nizu ponovljenih vzorcev analizirati z analizo variance ali s postopki kontingenčne tabele ter na podlagi zgornje izbire izbrati ustrezne metode statistične analize. Da bi naredili večkratno primerjavo med rezultati pri posameznih koncentracijah in rezultati kontrol, se za zvezne odzive priporoča uporaba regresijskega testa po Jonckheere-Terpstraju ali Williamsov test, za kvantizirane odzive, ki so skladni z monotonim odzivom na koncentracijo in ki ne kažejo ekstra-binomske variance (14), pa se priporoča uporaba regresijskega Cochran-Armitagevega testa. Pri ekstra-binomskih variancah se priporoča Rao-Scottova prilagoditev Cochran-Armitagevega testa (15) (16) ali pa se pri deležih ponovljenih vzorcev uporabi Williamsov test, Dunnettov test (po arkus sinus-korenski pretvorbi) ali test po Jonckheere-Terpstraju. Kadar podatki niso skladni z monotonim odzivom na koncentracijo, je za zvezne odzive uporabna Dunnettova, Dunnova ali Mann-Whitneyjeva metoda, za kvantizirane odzive pa Fisherjev eksaktni test (14) (17) (18). Pri uporabi statističnih metod ali modelov je treba paziti, da so izpolnjene vse zahteve za posamezno metodo ali model (npr. da je v osnovi preskusa ter uporabljenem preskusu ali modelu ocenjena in upoštevana variabilnost med različnimi komorami). Ovrednotiti je treba normalnost podatkov; v Dodatku 5 je navedeno, kaj je treba storiti z ostanki iz analize variance. V Dodatku 6 so navedeni dodatni napotki za obravnavo regresijskega pristopa. Upoštevati je treba pretvorbe, ki omogočajo izpolnjevanje zahtev statističnega testa. Pri pretvorbah, ki omogočajo ustreznost regresijskega modela, pa je potrebna previdnost, saj na primer 25-odstotna sprememba nepretvorjenega odziva ni enaka 25-odstotni spremembi pretvorjenega odziva. Pri vseh analizah je enota analize in preskusna enota preskusna komora in ne posamezna riba, kar morajo odražati tudi preskusi domnev in regresija (3) (14) (19) (20).

Poročilo o preskusu

34. V poročilo o preskusu se vključijo naslednji podatki:

Preskusna kemikalija:

Snov iz ene sestavine:

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

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

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

Preskusna vrsta:

- znanstveno ime, sev, vir, metoda zbiranja oplojenih iker in nadaljnje ravnanje.

Preskusni pogoji:

- uporabljeni preskusni postopek (npr. polstatični ali pretočni, obremenitev);
- obdobje osvetljenosti;
- zasnova preskusa (npr. število preskusnih komor in ponovljenih vzorcev, število iker na ponovljeni vzorec, material in velikost preskusnih komor (višina, širina, prostornina), prostornina vode na preskusno komoro);
- metoda priprave osnovnih raztopin in pogostost obnove (navesti je treba sredstvo za raztapljanje in njegovo koncentracijo, če je to uporabljeno);
- metoda odmerjanja preskusne kemikalije (npr. črpalke, sistemi za redčenje);
- analitski izkoristek metode in nominalne preskusne koncentracije, meja določljivosti, srednje izmerjene vrednosti in njihovi standardni odkloni v preskusnih posodah ter metoda, po kateri so bile pridobljene, in dokazi, da se meritve nanašajo na koncentracije preskusne kemikalije v dejanski raztopini;
- značilnosti vode za redčenje: pH, trdota, temperatura, koncentracija raztopljenega kisika, ravni preostalega klora (če so bile merjene), skupni organski ogljik (če je bil merjen), suspendirane trdne snovi (če so bile merjene), slanost preskusnega medija (če je bila merjena) in druge izvedene meritve;
- kakovost vode v preskusnih posodah: pH, trdota, temperatura in koncentracija raztopljenega kisika;
- podrobne informacije o hranjenju (npr. vrsta hrane, vir, dana količina in pogostost).

V poročilu se navedejo posamezni rezultati (ali rezultati na podlagi ponovljenih vzorcev) ter srednja vrednost in koeficient variacije, kot je ustrezno, za naslednje končne točke:

- dokazi, da kontrole ustrezajo standardom sprejemljivega preživetja za to preskusno vrsto (Dodatek 2);
- podatki o smrtnosti za posamezne stopnje (zarodek, ličinka, mladica) in skupna smrtnost;
- število dni, potrebno, da se izležejo ličinke, število izleženih ličink na dan, konec izvalitve;
- število zdravih rib na koncu preskusa;
- podatki o dolžini (opredeliti je treba, ali je bila uporabljena standardna ali skupna dolžina) in teži preživelih živali;
- pojav, opis in število morebitnih morfoloških anomalij;
- pojav, opis in število morebitnih učinkov na vedenje;

- pristop k statistični analizi (regresijska analiza ali analiza variance) in obdelava podatkov (uporabljeni statistični test ali model);
- koncentracija brez opaznega učinka za vsak ocenjeni odziv (NOEC);
- najnižja koncentracija z opaženim učinkom ($p = 0,05$) za vsak ocenjeni odziv (LOEC);
- EC_x za vsak ocenjeni odziv, če je ustrezno, intervali zaupanja (npr. 90-odstotni ali 95-odstotni) in graf prilagojenega modela, uporabljenega za izračun, naklon krivulje odziva na koncentracijo, formula regresijskega modela, ocenjeni parametri modela in njihove standardne napake.

Odstopanja od preskusne metode

Razprava o rezultatih, vključno z vsemi vplivi odstopanj od preskusne metode na rezultat preskusa

Preglednica 1

Ribje vrste, priporočene za preskušanje

SLADKOVODNE RIBE	ESTUARSKE in MORSKE RIBE
<i>Oncorhynchus mykiss</i> šarenka	<i>Cyprinodon variegatus</i> ovčjeglavci zobati krapovec
<i>Pimephales promelas</i> črnoglavci pisanec	<i>Menidia</i> sp. gavun
<i>Danio rerio</i> cebrica	
<i>Oryzias latipes</i> japonska medaka	

VIRI

- (1) OECD (2012). Fish Toxicity Testing Framework, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, št. 171. OECD, Pariz.
- (2) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, št. 23. OECD, Pariz.
- (3) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials, E 1241–88. 26 str.
- (4) Brauhn, J. L. in 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. in 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, zv. 76, 69–92.
- (8) Poglavje C.20 te priloge, Preskus razmnoževanja vrste *Daphnia magna*.

- (9) Hansen, D. J. in P. R. Parrish (1977). Suitability of sheepshead minnows (*Cyprindon variegatus*) for life-cycle toxicity tests. V: Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (ur. F. L. Mayer in 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 in 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, 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, št. 54, OECD, Pariz.
 - (15) Rao, J. N. K. in A. J. Scott (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data, *Biometrics*, zv. 48, 577–585.
 - (16) Rao, J. N. K. in A. J. Scott (1999). A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data. *Statistics in Medicine* 18, 1373–1385.
 - (17) Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *Journal of American Statistical Association*, 50, 1096–1121.
 - (18) Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, zv. 20, 482–491.
 - (19) Rand, G. M. in S. R. Petrocelli (1985). *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Publication Corporation, New York.
 - (20) McClave, J. T., J. H. Sullivan in J. G. Pearson (1980). *Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data*, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium. ASTM, Philadelphia.
-

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

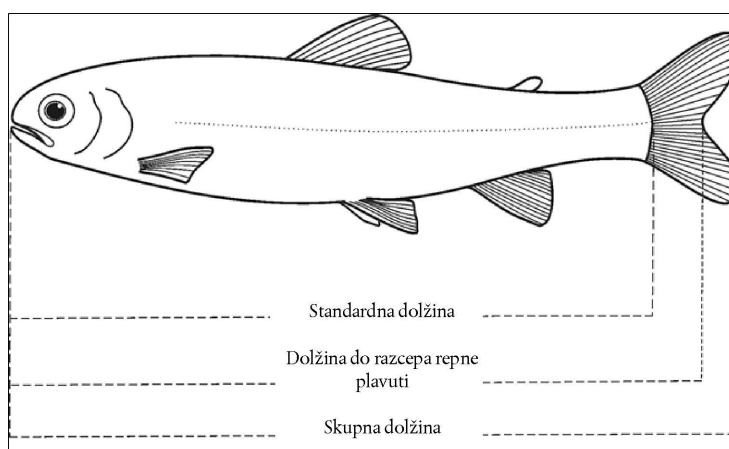
Dolžina do razcepa repne plavuti (FL): je dolžina od konice nosu do konca zajede med repnima plavutnicama in se uporablja za ribe, pri katerih je težko določiti, kje se konča hrbtenica (www.fishbase.org).

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

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

Slika 1

Opis različnih uporabljenih dolžin



Kemikalija: snov ali zmes.

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

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

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

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

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

IUPAC: Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo.

SMILES: sistem za poenostavljen zapis strukture molekul.

PRESKUSNI POGOJI, TRAJANJE IN MERILA PREŽIVETJA ZA PRIPOROČENE VRSTE

VRSTE	PRESKUSNI POGOJI			PRIPOROČENO TRAJANJE PRESKUSA	Tipična najmanjša srednja skupna dolžina kontrolnih rib na koncu študije (mm) (1)	PREŽIVETJE V KONTROLAH (najmanjši %)	
	Temperatura (°C)	Slanost (‰)	Obdobje osvetlje- nosti (ure)			Uspeh izvalitve	Preživetje po izva- litvi
Sladkovodne ribe:							
<i>Oncorhynchus mykiss</i> šarenka	10 ± 1,5 (2)		12–16 (3)	2 tedna po tem, ko se kontrolne ribe začnejo hraniti same (ali 60 dni po izvalitvi)	40	75 %	75 %
<i>Pimephales promelas</i> črnoglavi pisanec	25 ± 1,5		16	32 dni od začetka preskusa (ali 28 dni po izvalitvi)	18	70 %	75 %
<i>Danio rerio</i> cebrica	26 ± 1,5		12–16 (4)	30 dni po izvalitvi	11	70 %	75 %
<i>Oryzias latipes</i> japonska medaka	25 ± 2		12–16 (4)	30 dni po izvalitvi	17	80 %	80 %
Estuarske in morske ribe:							
<i>Cyprinodon variegatus</i> ovčjeglati zobati krapovec	25 ± 1,5	15–35 (5)	12–16 (4)	32 dni od začetka preskusa (ali 28 dni po izvalitvi)	17	75 %	80 %
<i>Menidia sp.</i> gavun	22–25	15–35 (5)	13	28 dni	20	80 %	60 %

Legenda:

- (1) Tipična najmanjša srednja skupna dolžina sicer ni merilo za veljavnost, vendar je treba odstopanja, ki so nižja od navedenih vrednosti, skrbno proučiti glede na občutljivost preskusa. Najmanjša srednja skupna dolžina se izpelje na podlagi nabora trenutno razpoložljivih podatkov.
- (2) Določeni sevi preskušanih šarenk bodo morda zahtevali uporabo drugačne temperature. Plemenske ribe je treba vzdrževati pri enaki temperaturi kot ike. Po prejemu iker od komercialnega gojitelja je potrebno krajše prilagajanje (npr. 1–2 h) na preskusno temperaturo.
- (3) Ličinke morajo biti do enega tedna po izvalitvi v temi, razen kadar se izvaja pregled, nato pa ves čas preskusa (12- do 16-urno obdobje osvetljenosti) v blagi svetlobi. (4)
- (4) Režim osvetlitve mora biti stalen pri vseh preskusnih pogojih.
- (5) Pri vseh preskusih se to izvede pri ± 2 ‰.

NAVODILA ZA HRANJENJE PLEMENSKIH RIB IN PRESKUSNIH ŽIVALI PRIPOROČENIH VRST TER RAVNANJE Z NJIMI

VRSTE	HRANA (*)				ČAS PRENOSA PO IZVALITVI	ČAS DO PRVEGA HRANJENJA
	Plemenske ribe	Pravkar izležene ličinke	Mladice			
			Vrsta	Pogostost		
Sladkovodne ribe:						
<i>Oncorhynchus mykiss</i> šarenka	hrana za postrvi	brez ^(a)	začetna hrana za postrvi BSN	2–4 hranjenja na dan	14–16 dni po izvalitvi ali ob splavanju (ni nujno)	19 dni po izvalitvi ali splavanju
<i>Pimephales promelas</i> črnoglav pisanec	BSN, hrana v kosmičih, FBS	BSN	BSN48, hrana v kosmičih	2–3 hranjenja na dan	ob 90-odstotni izvalitvi	2 dneva po izvalitvi
<i>Danio rerio</i> cebrica	BSN, hrana v kosmičih	komercialna hrana za ličinke, praživali ^(b) , beljakovine ^(c)	BSN48, hrana v kosmičih	BSN enkrat na dan, hrana v kosmičih dvakrat na dan	ob 90-odstotni izvalitvi	2 dneva po izvalitvi
<i>Oryzias latipes</i> japonska medaka	hrana v kosmičih	BSN, hrana v kosmičih (ali praživali ali kotačniki)	BSN48, hrana v kosmičih (ali kotačniki)	BSN enkrat na dan, hrana v kosmičih dvakrat na dan ali hrana v kosmičih in kotačniki enkrat na dan	ni relevantno	6–7 dni po drstitvi
Estuarske in morske ribe:						
<i>Cyprinodon variegatus</i> ovčjeglav zobati krapovec	BSN, hrana v kosmičih, FBS	BSN	BSN48	2–3 hranjenja na dan	ni relevantno	1 dan po izvalitvi/splavanju
<i>Menidia sp.</i> gavun	BSN48, hrana v kosmičih	BSN	BSN48	2–3 hranjenja na dan	ni relevantno	1 dan po izvalitvi/splavanju

Legenda:

(*) Hrana se odmerja tako, da so živali site. Ostanke hrane in iztrebke je treba odstraniti, da se prepreči kopičenje odpadkov.

FBS zamrznjeni morski rakci (angl. frozen brine shrimps); odrasli rakci vrste *Artemia sp.*

BSN navplji morskih rakcev (angl. brine shrimp nauplii); pravkar izlegli

BSN48 navplji morskih rakcev (angl. brine shrimp nauplii); stari 48 ur

^(a) ličinke z vrečico rumenjaka ne potrebujejo hrane

^(b) prefiltrirane iz mešane kulture

^(c) granule, pridobljene v postopku fermentacije

Dodatek 4

NEKATERE KEMIJSKE LASTNOSTI SPREJEMLJIVE VODE ZA REDČENJE

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

Dodatek 5

STATISTIČNE SMERNICE ZA DOLOČITEV VREDNOSTI NOEC

Splošno

Enota analize je ponovitveni akvarij. Pri neprekinjenih meritvah, kot je meritev velikosti, je treba izračunati srednjo vrednost ali mediano ponovljenih vzorcev, te vrednosti ponovljenih vzorcev pa so podatki, ki se uporabijo za analizo. Dokazati je treba moč uporabljenih preskusov, po možnosti na podlagi ustrezne zbirke preteklih podatkov za vsak laboratorij. Za vsako končno točko pri statističnem testu, ki bo uporabljen, je treba navesti učinek na velikost, ki ga je mogoče opaziti s 75- do 80-odstotno močjo.

V zbirkah podatkov, ki so bile na voljo v času razvoja te preskusne metode, se določi možna moč ob uporabi priporočljivih statističnih postopkov. Posamezni laboratorij mora dokazati, da lahko izpolnjuje to zahtevo po moči, tako da sam izvede analizo moči ali dokaže, da koeficient variacije (v nadaljnjem besedilu: KV) za vsak odziv ne presega 90. centila KV, uporabljenih pri pripravi smernic za preskušanje. Ti KV so navedeni v preglednici 1. Če so na voljo le srednje vrednosti ali mediane ponovljenih vzorcev, KV znotraj ponovljenega vzorca ni treba upoštevati.

Preglednica 1

90. centil KV pri izbranih sladkovodnih vrstah

Vrsta	Odziv	KV med ponovljenimi vzorci	KV znotraj ponovljenega vzorca
šarenka	dolžina	17,4	9,8
	teža	10,1	28
črnoglav pisanec	dolžina	16,9	13,5
	teža	11,7	38,7
cebrica	dolžina	43,7	11,7
	teža	11,9	32,8

Pri skoraj vseh statističnih testih, ki se uporabljajo za oceno laboratorijskih toksikoloških študij, so najpogostejše primerjave med tretiranimi skupinami in kontrolo. Zato ni ustrezno zahtevati F-testa statistične značilnosti z analizo variance pred uporabo Dunnettovega ali Williamsovega testa oziroma Kruskal-Wallisovega testa statistične značilnosti pred uporabo testa po Jonckheere-Terpstraju, Mann-Whitneyjevega testa ali Dunnovega testa (Hochberg in Tamhane 1987; Hsu 1996; Dunnett 1955, 1964; Williams 1971, 1972, 1975, 1977; Robertson *et al.* 1988; Jonckheere 1954; Dunn 1964).

Dunnettov test vključuje prilagoditev številčnosti, na deleža lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov pri njem pa negativno vpliva uporaba F-testa za referenco. Podobno regresijski Williamsov test in regresijski test po Jonckheere-Terpstraju, pri katerih se ves čas uporablja stopnja značilnosti 0,05, ohranjata splošni 5-odstotni delež lažnih pozitivnih rezultatov, na ta delež in moč preskusov pa negativno vpliva uporaba F-testa ali Kruskal-Wallisovega testa za referenco. Mann-Whitneyjev in Dunnov test je treba prilagoditi številčnosti, pri čemer se priporoča Bonferroni-Holmova prilagoditev.

Za podrobno razpravo o večini priporočil glede preskušanja domnev in preverjanja predpostavk, na katerih temeljijo ti testi, glej OECD (2006), ki vsebuje tudi obširno bibliografijo.

Tretiranje kontrol, če se uporabi topilo

Če se uporabi topilo, je treba vključiti kontrolo z vodo za redčenje in kontrolo s topilom. Obe kontroli je treba primerjati pri vsakem odzivu in ju združiti za statistično analizo, če med njima niso bile ugotovljene značilne razlike. Sicer je treba za določitev vrednosti NOEC ali oceno EC_x uporabiti kontrolo s topilom, kontrolo z vodo pa se ne uporabi. Glej omejitve meril za veljavnost preskusa (odstavek 7).

Pri dolžini, teži in deležu izleženih iker, umrlih ličink ali nenormalnih ličink ter prvem ali zadnjem dnevu valitve ali splavanja je treba uporabiti T-test ali Mann-Whitneyjev test za primerjavo kontrole z vodo za redčenje in kontrole s topilom z ravno značilnosti 0,05, pri čemer tretirane skupine niso upoštevane. Rezultate teh testov je treba vključiti v poročilo.

Meritve velikosti (dolžina in teža)

Podatki o dolžini in teži posameznih rib so lahko porazdeljeni normalno ali logaritemsko normalno. V obeh primerih so srednje vrednosti ponovljenih vzorcev običajno normalno porazdeljene s centralnim limitnim izrekom in potrjene na podlagi podatkov iz več kot 100 študij o zgodnjih razvojnih fazah treh sladkovodnih vrst. Kadar podatki ali zbirke preteklih podatkov kažejo na logaritemsko normalno porazdelitev podatkov o velikosti posameznih rib, se lahko namesto tega za vrednosti pri posameznih ribah logaritmirajo srednje vrednosti ponovljenih vzorcev, podatki za analizo pa so lahko nato antilogaritem teh logaritmov srednjih vrednosti ponovljenih vzorcev.

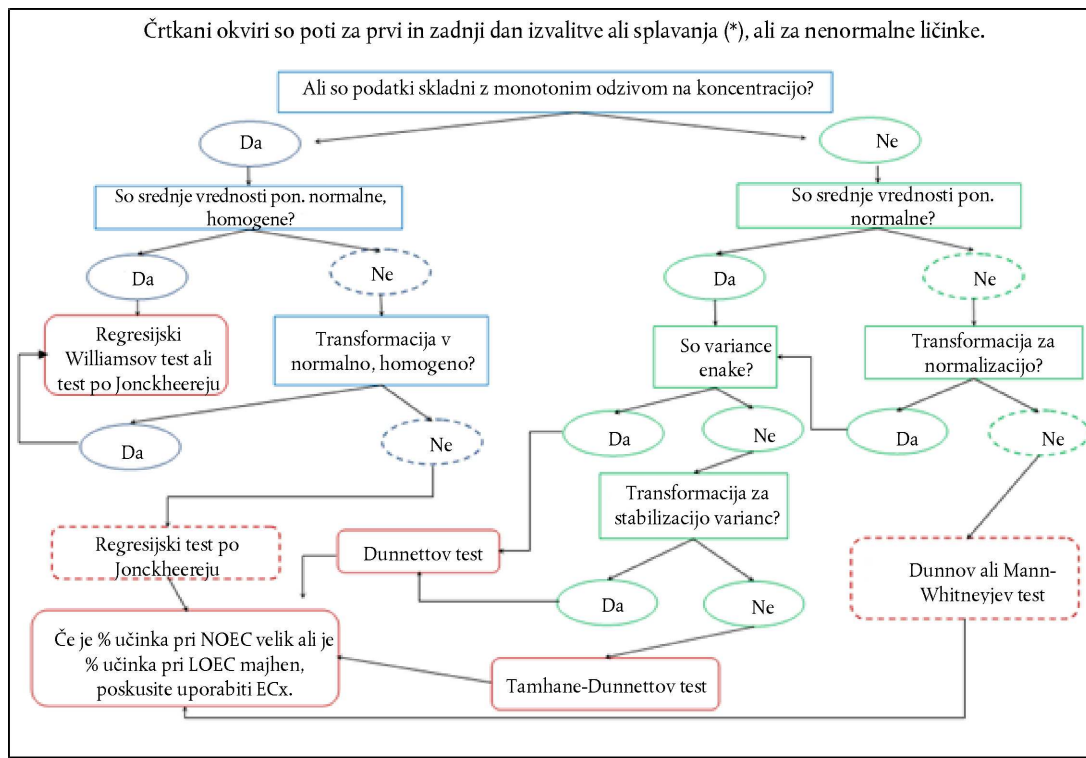
Oceniti je treba skladnost podatkov z normalno porazdelitvijo in homogenostjo variance. Za ta namen je treba uporabiti ostanke iz analize variance, pri čemer je koncentracija edina razlagalna razredna spremenljivka. Lahko se uporabi vizualno določanje z razsevnih grafikonov in histogramov ali histogramov s številkami. Namesto tega se lahko uporabi formalni test, na primer Shapiro-Wilkov ali Anderson-Darlingov test. Skladnost s homogenostjo variance se lahko oceni z vizualnim pregledom omenjenega razsevnega grafikona ali formalno z Levenejevim testom. Normalnost ali homogenost variance je treba oceniti samo pri parametričnih testih (npr. Williamsov ali Dunnettov test).

Pozornost je treba nameniti možnim osamelcem in njihovemu vplivu na analizo. Uporabita se lahko Tukeyjev test osamelcev in vizualni pregled zgoraj opisanih prikazov ostankov. Opozoriti je treba, da opazovanja vključujejo celotne ponovljene vzorce, zato se osamelci izločijo iz analize šele po temeljitem premisleku.

Statistični testi, ki upoštevajo značilnosti zasnove preskusa in biološka pričakovanja, so regresijski trendnostni testi, kot sta Williamsov test ali test po Jonckheere-Terpstraju. Ti testi predvidevajo monoton odziv na koncentracijo, zato je treba skladnost podatkov oceniti ob upoštevanju te predpostavke. Mogoča je vizualna ocena razsevnega grafikona srednjih vrednosti ponovljenih vzorcev v odvisnosti od preskusnih koncentracij. Pri tem se lahko razsevni grafikon prekrije z razdeljenim linearnim grafom, kar omogoči povezavo srednjih vrednosti koncentracij, uteženih z velikostjo ponovljenega vzorca. Veliko odstopanje razdeljenega linearnega grafa od monotonosti pomeni, da bo morda treba uporabiti netrendnostne teste. Namesto tega se lahko uporabijo formalni testi. Preprost formalni test je izračun linearnih in kvadratnih kontrastov srednjih vrednosti koncentracij. Če je kvadratni kontrast statistično značilen, linearni kontrast pa ni, to pomeni, da morda obstaja težava, povezana z monotonostjo, ki jo je treba nadalje ovrednotiti na podlagi prikazov. Pri težavah z normalnostjo ali homogenostjo variance se lahko ti kontrasti oblikujejo na podlagi podatkov o pretvorbi porazdelitve. Uporabijo se lahko tudi drugi postopki, na primer Bartholomewjev test monotonosti, vendar so ti kompleksnejši.

Slika 2

Diagram poteka za določitev vrednosti NOEC pri meritvah velikosti (dolžina in teža)



(*) Ti odzivi nikoli ne izpolnjujejo predpostavk za parametrične analize ali modele.

Razen če podatki niso skladni z zahtevami zanj, se vrednosti NOEC določijo z regresijsko uporabo Williamsovega testa ali testa po Jonckheere-Terpstraju. Za podrobnosti o teh postopkih glej OECD (2006). Za podatke, ki niso skladni z zahtevami za regresijski trendnostni test, se lahko uporabita Dunnettov test ali Tamhane-Dunnettov (T3) test, ki vključujeta prilagoditev številčnosti. Oba testa predpostavljata normalnost, Dunnettov test pa tudi homogenost variance. Kadar navedeni pogoji niso izpolnjeni, se lahko uporabi Dunnov neparametrični test. Za podrobnosti o teh testih glej OECD (2006). Slika 2 prikazuje, kako se odločiti za pravi test.

Izvalitev iker in preživetje ličink

Podatki se nanašajo na delež iker, ki se izležejo, ali ličink, ki preživijo v posameznih ponovljenih vzorcih. Pri teh deležih je treba oceniti ekstrabinomsko varianco, ki je pri takih meritvah običajna, ni pa splošna. Diagram poteka na sliki 3 je smernica za izbiro ustreznega testa; glej besedilo za podrobne opise.

Običajno se uporabljata dva testa. To sta Taronejev $C(\alpha)$ -test (Tarone 1979) in test hi-kvadrat, ki se posebej uporabita pri vsaki preskusni koncentraciji. Če se ekstra-binomska varianca odkrije celo pri eni sami preskusni koncentraciji, je treba uporabiti metode, ki so primerne za to.

Formula 1

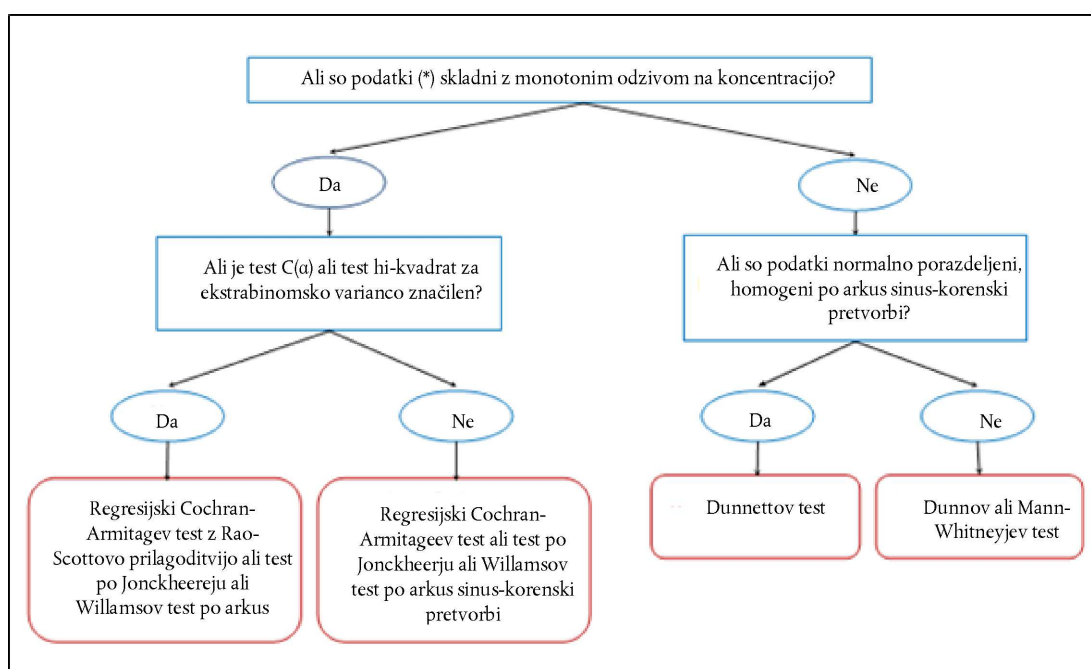
Taronejev $C(\alpha)$ -test (Tarone 1979)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^m \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1 - \hat{p})} - \sum_{j=1}^m n_j}{\left\{ 2 \sum_{j=1}^m n_j (n_j - 1) \right\}^{1/2}}$$

pri čemer je \hat{p} srednja vrednost deleža pri določeni koncentraciji, m je število ponovitvenih akvarijev, n_j je število osebkov v ponovljenem vzorcu j , x_j pa število osebkov v navedenem ponovljenem vzorcu, ki se na primer niso izlegli ali so umrli. Ta test se uporabi za vsako koncentracijo posebej. Ta test nekateri vidijo kot prilagojeni test hi-kvadrat, vendar so omejene simulacije moči, ki jih je izvedel Tarone, pokazale, da ima večjo moč od testa hi-kvadrat.

Slika 3

Diagram poteka za določitev vrednosti NOEC pri izvalitvi iker in smrtnosti ličink



(*) Podatki vključujejo delež ponovljenih vzorcev .

Kadar ne obstajajo statistično značilni dokazi o ekstra-binomski varianci, se lahko uporabi regresijski Cochran-Armitagev test. Ta test ne upošteva ponovljenih vzorcev, zato se pri obstoju takih dokazov priporoča uporaba Rao-Scottove prilagoditve Cochran-Armitagevega testa (RSCA), ki upošteva ponovljene vzorce, velikost ponovljenih vzorcev in ekstra-binomsko varianco. Uporabiti je mogoče tudi regresijski Willamsov test, regresijski test po Jonckheere-Terpstraju in Dunnettov test, kakor so opisani za meritve velikosti. Ti testi se lahko uporabijo ne glede na to, ali obstaja ekstra-binomska varianca, vendar je njihova moč nekoliko manjša (Agresti 2002; Morgan 1992; Rao in Scott 1992, 1999; Fung *et al.* 1994, 1996).

Prvi ali zadnji dan valitve ali splavanja

Odziv je celo število, ki označuje preskusni dan, ko je bila opažena navedena opazka za določen ponovitveni akvarij. Območje vrednosti je običajno zelo omejeno in deleži povezanih vrednosti so običajno visoki, npr. vsi ponovljeni kontrolni vzorci imajo isti prvi dan valitve, ta pa je isti tudi pri eni ali dveh nizkih preskusnih koncentracijah. Parametrični testi, kot sta Willamsov in Dunnettov test, niso primerni za te podatke. Če ni dokazov o resni nemonotonosti, ima regresijski test po Jonckheere-Terpstraju veliko moč zaznavanja učinkov preskusne kemikalije. V nasprotnem primeru se lahko uporabi Dunnettov test.

Anomalije pri ličinkah

Odziv je število ličink, pri katerih se odkrijejo kakršne koli anomalije. Ta odziv ima pogosto nizko pojavnost, pri njem se pojavljajo nekatere težave, ki so prisotne pri določanju prvega dneva valitve, včasih pa je zanj značilna tudi neenakomernost pri odzivu na koncentracijo. Če podatki vsaj približno sledijo monotoni krivulji koncentracije, je regresijski test po Jonckheere-Terpstraju dovolj močan za zaznavanje učinkov. V nasprotnem primeru se lahko uporabi Dunnov test.

Viri

Agresti, A. (2002). *Categorical Data Analysis*, druga izdaja. Wiley, Hoboken.

Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. American Statistical Association*, št. 50, 1096–1121.

Dunn, O. J. (1964). Multiple Comparisons Using Rank Sums. *Technometrics*, št. 6, 241–252.

Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, zv. 20, 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*, št. 14, 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*, št. 24, 431–454.

Hochberg, Y. in A. C. Tamhane (1987). *Multiple Comparison Procedures*. Wiley, New York.

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*, št. 41, 133.

Morgan, B. J. T. (1992). *Analysis of Quantal Response Data*. Chapman and Hall, London.

OECD (2006). *Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application*. Series on Testing and Assessment, št. 54. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj (OECD), Pariz.

Rao, J. N. K. in Scott A. J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics*, zv. 48, 577–585.

Rao, J. N. K. in Scott A. J. (1999). A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data. *Statistics in Medicine*, št. 18, 1373–1385.

Robertson, T., Wright F. T. in Dykstra R. L. (1988). *Order restricted statistical inference*. Wiley.

Tarone, R. E. (1979). Testing the goodness of fit of the Binomial distribution. *Biometrika*, št. 66, 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*, zv. 27, 103–117.

Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, zv. 28, 519–531.

Williams, D. A. (1975). The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratology. *Biometrics* zv. 31, 949–952.

Williams, D. A. (1977). Some inference procedures for monotonically ordered normal means. *Biometrika* št. 64, 9–14.

Dodatek 6

STATISTIČNE SMERNICE ZA REGRESIJSKE OCENE

Splošno

Opazovanja, uporabljena za prilagoditev modela, so srednje vrednosti ponovljenih vzorcev (dolžina in teža) ali deleži ponovljenih vzorcev (izležene iker in smrtnost ličink) (OECD 2006).

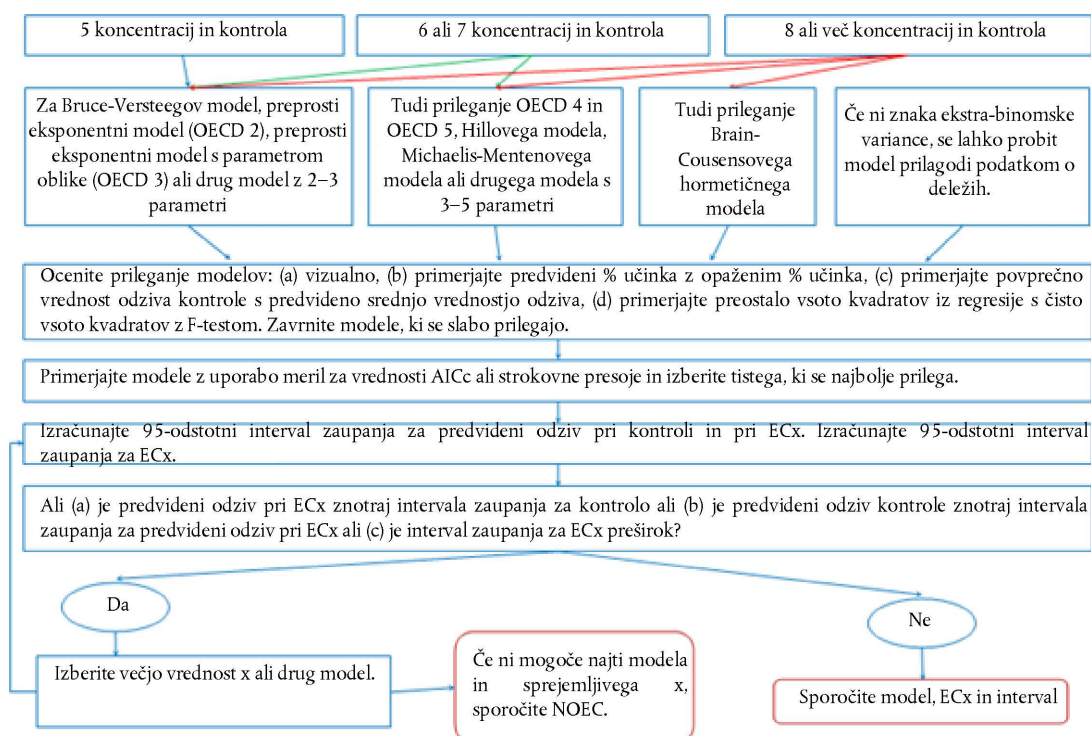
Običajno se priporoča utežena regresija, ki za utež uporablja velikost ponovljenega vzorca. Mogoči so tudi drugi načrti uteženja, kot je uteženje s predvideno srednjo vrednostjo odziva ali kombinacija tega in velikosti ponovljenega vzorca. Uteženje z obratno vrednostjo variance znotraj vzorca koncentracije ni priporočljivo (Bunke *et al.* 1999; Seber in Wild 2003; Motulsky in Christopoulos 2004; Huet *et al.* 2003).

Pri vseh pretvorbah odzivov pred analizo je treba ohraniti neodvisnost opazovanj in EC_x , njihove meje zaupanja pa je treba izraziti v izvornih enotah meritve in ne v pretvorjenih enotah. 20-odstotna sprememba logaritma dolžine na primer ne ustreza 20-odstotni spremembi dolžine (Lyles *et al.* 2008; Draper in Smith 1999).

V diagramu poteka na sliki 4 je predstavljen pregled ocen EC_x . Podrobnosti so opisane v spodnjem besedilu.

Slika 4

Diagram poteka za oceno EC_x srednjih vrednosti ponovljenih vzorcev pri meritvah dolžine, teže, deleža izleženih iker ali umrlih ličink; za več podrobnosti glej besedilo



Obravnavanja izvalitve iker in smrtnosti ličink

Za izvalitev iker in smrtnost ličink je običajno najbolje prilagoditi padajoči model, lahko pa se prilagodi probit model, kot je opisano spodaj. To pomeni, da je treba modelirati delež iker, ki se ne izležejo, ali ličink, ki umrejo. EC_x se namreč nanaša na koncentracijo, pri kateri se zgodi sprememba, ki ustreza x % srednje vrednosti odziva v kontroli. Če se ne izleže 5 % kontrolnih iker in se modelira neuspešnost izvalitve, se EC_{20} nanaša na koncentracijo, pri kateri se zgodi sprememba, ki ustreza 20 % 5-odstotne neuspešnosti izvalitve v kontroli, to pa je sprememba v višini $0,2 * 0,05 = 0,01$ ali 1 odstotne točke 6-odstotne neuspešnosti izvalitve. Tako majhna sprememba se ne more smiselno oceniti na podlagi razpoložljivih podatkov in ni biološko pomembna. Če pa bi se modeliral delež izleženih iker, bi bil kontrolni delež v zgornjem primeru 95 %, 20-odstotno zmanjšanje srednje vrednosti v kontroli pa bi pomenilo spremembo v višini $0,95 * 0,2 = 0,18$, tj. spremembo s 95-odstotne uspešnosti izvalitve na 77-odstotno (= 95 – 18) uspešnost izvalitve, to pa je koncentracija z učinkom, ki se lahko oceni in bo za raziskovalce najverjetneje zanimivejša. To ne velja za meritve velikosti, čeprav škodljivi učinki na velikost običajno pomenijo zmanjšanje velikosti.

Modeli za velikost (dolžina ali teža), uspešnost izvalitve iker in preživetje ličink

Razen Brain-Cousensovega hormetičnega modela so vsi modeli opisani in priporočeni v OECD (2006). Tako imenovani modeli OECD 2–5 so poleg tega obravnavani v okviru preskusov ekotoksičnosti v Slob (2002). Seveda obstajajo tudi številni drugi modeli, ki bi lahko bili uporabni. Bunke *et al.* (1999) navajajo številne modele, ki niso navedeni tukaj, poleg tega obstaja mnogo sklicevanj na druge modele. Spodaj navedeni modeli so predlagani kot posebej ustrezni za ekotoksikološke preskuse in se pogosto uporabljajo.

Pri 5 preskusnih koncentracijah in kontroli:

- Bruce-Versteegov model,
- preprosti eksponentni model (OECD 2),
- eksponentni model s parametrom oblike (OECD 3),
- preprosti eksponentni model s spodnjo mejo (OECD 4).

Pri 6 ali več preskusnih koncentracijah in kontroli:

- eksponentni model s parametrom oblike in spodnjo mejo (OECD 5),
- Michaelis-Mentenov model,
- Hillov model.

Kadar je vidna hormeza (najverjetneje ne pri uspešnosti izvalitve iker ali preživetju ličink, včasih pa pri opazovanjih velikosti):

- Brain-Cousensov hormetični model (Brain in Cousens 1989).

Drugi modeli za neuspešnost izvalitve iker in smrtnost ličink

- Modeli za naraščajoče vrednosti teh odzivov se lahko ob odsotnosti ekstra-binomske variance prilagodijo s probit (ali logističnimi) modeli, nato se v prilagoditvi modela oceni kontrolna pojavnost. To ni najbolj priporočljiva metoda, saj kot enoto analize upošteva posamezni osebek in ne ponovljeni vzorec (Morgan 1992; O'Hara Hines in Lawless 1993; Collett 2002, 2003).

Prileganje posameznih modelov

- Vizualno je treba primerjati opaženo in predvideno odstotno zmanjšanje pri vsaki preskusni koncentraciji (Motulsky in Christopoulos 2004; Draper in Smith 1999).

- Z F-testom se srednja kvadratna napaka regresije primerja s čisto srednjo kvadratno napako (Draper in Smith 1999).
- Preveriti je treba, ali se vse postavke v modelu statistično značilno razlikujejo od ničle (tj. določite, ali so postavke modela statistično značilne) (Motulsky in Christopoulos 2004).
- Pregled ostankov iz regresije se primerja s preskusnimi koncentracijami, po možnosti na logaritemski skali za koncentracije. Ta pregled ne sme vsebovati vzorcev; točke morajo biti naključno razporejene okoli vodoravne črte pri ničelni višini.
- Oceniti je treba skladnost podatkov z normalno porazdelitvijo in homogenostjo variance, kot je navedeno v Dodatku 5.
- Poleg tega je treba oceniti normalnost ostankov iz regresijskega modela, pri čemer se uporabijo metode, ki so v Dodatku 5 navedene za ostanke iz analize variance.

Primerjava modelov

- Uporabiti je treba Akaikejev informacijski kriterij AICc. Manjše vrednosti AICc pomenijo boljše prilaganje, in če je $AICc(B) - AICc(A) \geq 10$, je model A skoraj zagotovo boljši od modela B (Motulsky in Christopoulos 2004).
- Vizualna primerjava obeh modelov bo razkrila, kako dobro izpolnjujeta zgornja merila za posamezne modele.
- Priporoča se upoštevanje načela varčnosti, po katerem se uporabi najpreprostejši model, ki se razmeroma dobro prilaga podatkom (Ratkowsky 1993; Lyles *et al.* 2008).

Kakovost ocene EC_x

Interval zaupanja za EC_x ne sme biti preširok. Za določitev največje širine intervala zaupanja, ki bo še zagotavljala uporabnost EC_x , je potrebna statistična presoja. Simulacije regresijskih modelov, prilagojenih validni ikeri in podatkom o velikosti, kažejo, da približno 75 % intervalov zaupanja za EC_x ($x = 10, 20$ ali 30) zajema največ dve preskusni koncentraciji. To je splošna smernica o tem, kaj je sprejemljivo, in praktična smernica o tem, kaj je mogoče doseči. Številni avtorji trdijo, da bi bilo treba intervale zaupanja za vse parametre modelov vključiti v poročilo in da široki intervali zaupanja za parametre modelov kažejo nesprejemljivost modelov (Ott in Longnecker 2008; Alvord in Rossio 1993; Motulsky in Christopoulos 2004; Lyles *et al.* 2008; Seber in Wild 2003; Bunke *et al.* 1999; Environment Canada 2005).

Interval zaupanja za EC_x (ali kateri koli drug parameter modela) ne sme vključevati ničle (Motulsky in Christopoulos 2004). V regresijskih modelih je to ekvivalent najmanjše značilne razlike, ki se pogosto navaja pri pristopih s preskušanjem predpostavk (npr. Wang *et al.* 2000). Ustreza tudi intervalu zaupanja za srednje vrednosti odzivov pri LOEC, ki niso zajete v srednjo vrednost v kontroli. Treba se je vprašati, ali je parametre mogoče znanstveno oceniti. Če je interval zaupanja za y_0 na primer ± 20 %, ocena EC_{10} ni verodostojna. Če model predvideva 20-odstotni učinek pri koncentraciji C, največji opaženi učinek pri koncentraciji C in nižjih koncentraciji pa je 10-odstoten, ocena EC_{20} ni verodostojna (Motulsky in Christopoulos 2004; Wang *et al.* 2000; Environment Canada 2005).

EC_x ne bi smela zahtevati ekstrapolacije zunaj območja pozitivnih koncentracij (Draper in Smith 1999; OECD 2006). Splošna smernica bi lahko bila, da EC_x ne sme biti za več kot približno 25 % nižja od najnižje ali višja od najvišje preskušene koncentracije.

Viri

Alvord, W. G., Rossio, J. L. (1993). Determining confidence limits for drug potency in immunoassay. *Journal of Immunological Methods* št. 157, 155–163.

Brain, P. in Cousens, R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed res.* zv. 29: 93–96.

- Bunke, O., Droge, B. in Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics*, št. 33, 197–240.
- Collett, D. (2002). *Modelling Binary Data*, druga izdaja. Chapman and Hall, London.
- Collett, D. (2003). *Modelling Survival Data in Medical Research*, druga izdaja. Chapman and Hall, London.
- Draper, N. R., in Smith, H. (1999). *Applied Regression Analysis*, tretja izdaja. New York: John Wiley & Sons.
- Environment Canada (2005). *Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests*, Report 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, New York.
- Lyles, R. H., C. Poindexter, A. Evans, M. Brown in C. R. Cooper (2008). Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data. *Contemp Clin Trials*, november 2008, št. 29(6): 878–886.
- Morgan, B. J. T. (1992). *Analysis of Quantal Response Data*. Chapman and Hall, London.
- Motulsky, H., A. Christopoulos (2004). *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting*. Oxford University Press, ZDA.
- O'Hara Hines, R. J. and J. F. Lawless (1993). Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time. *Biometrics*, zv. 49, str. 107–121.
- OECD (2006). *Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application*. Series Testing and Assessment, št. 54. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, OECD, Pariz.
- Ott, R. L., M. T. Longnecker (2008). *An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis*, šesta izdaja. Brooks-Cole, Belmont, California.
- Ratkowsky, D. A. (1993). Principles of nonlinear regression. *Journal of Industrial Microbiology*, št. 12, 195–199.
- Seber, G. A. F., C. J. Wild (2003). *Nonlinear Regression*. Wiley.
- Slob W. (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.*, št. 66, 298–312.
- Wang, Q., D. L. Denton in R. Shukla (2000). Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program. *Environmental Toxicology and Chemistry*, zv. 19, str. 113–117, 2000.
-

C.48 Kratkotrajni preskus razmnoževanja rib.

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD (TG) 229 (2012). Preskus z ribami, s katerim je mogoče zaznati nekatere kemikalije z endokrinim delovanjem, je treba razviti in validirati zaradi pomislekov, da bi lahko okoljske ravni kemikalij zaradi interakcije teh kemikalij z endokrinim sistemom povzročile škodljive učinke za ljudi in prostoživeče živali. OECD se je leta 1998 začela ukvarjati s prednostno nalogo revidiranja obstoječih smernic ter priprave novih smernic za presejalne preskuse in preskušanje možnih povzročiteljev endokrinih motenj. Del naloge je bila priprava smernic za presejalno preskušanje kemikalij, ki so aktivne v endokrinem sistemu ribjih vrst. Kratkotrajni preskus razmnoževanja rib je prestal obsežen validacijski program, ki je vključeval medlaboratorijske študije z izbranimi kemikalijami, s katerimi sta bili dokazani ustreznost in zanesljivost preskusa za zaznavanje kemikalij, ki vplivajo na razmnoževanje rib z različnimi mehanizmi, vključno z endokrinimi načini (1) (2) (3) (4) (5). Vse končne točke iz smernic za preskušanje OECD so bile potrjene pri črnoglavem pisancu, podniz končnih točk pa je bil potrjen pri japonski medaki (tj. vitelogenin in sekundarne spolne značilnosti) in cebrici (tj. vitelogenin). Delo v zvezi s potrditvijo je delno medsebojno strokovno pregledala skupina strokovnjakov, ki so jih imenovali nacionalni koordinatorji programa smernic za preskušanje OECD (6), delno pa neodvisna skupina strokovnjakov, ki jih je najela Agencija ZDA za varstvo okolja (29). Preskus ni namenjen opredelitvi posebnih mehanizmov hormonskih motenj, ker imajo preskusne živali nepoškodovano os hipotalamus – hipofiza – spolne žleze (v nadaljnjem besedilu: os HPG), ki se lahko odziva na kemikalije, ki vplivajo na os HPG na različnih ravneh.
2. V tej preskusni metodi je opisan presejalni preskus *in vivo*, v katerem se spolno zreli ribji samci in drsteče se ribje samice zadržujejo skupaj ter so izpostavljeni kemikaliji v omejenem delu svojega življenjskega cikla (21 dni). Ob koncu 21-dnevnega obdobja izpostavljenosti se pri samcih in samicah izmerita dve biološko označevalni končni točki kot indikatorja endokrinega delovanja preskusne kemikalije; ti končni točki sta vitelogenin in sekundarne spolne značilnosti. Vitelogenin se meri pri črnoglavem pisancu, japonski medaki in cebrici, sekundarne spolne značilnosti pa pri črnoglavem pisancu in japonski medaki. Poleg tega se vsak dan med celotnim preskusom spremlja kvantitativna plodnost. Spolne žleze se shranijo in lahko se oceni histopatologija, da se ugotovi, ali so preskusne živali sposobne za razmnoževanje, in se okrepi zanesljivost dokazov za druge končne točke.
3. Ta biološki preskus je presejalna študija razmnoževanja *in vivo*, njegovo uporabo pa je treba obravnavati v okviru temeljnega okvira OECD za preskušanje in oceno kemikalij, ki povzročajo endokrine motnje (ang. *OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals*) (30). V tem temeljnem okviru je kratkotrajni preskus razmnoževanja rib predlagan na ravni 3 kot preskus *in vivo*, ki zagotavlja podatke o izbranih endokrinih mehanizmih/poteh.

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

4. Vitelogenin (v nadaljnjem besedilu: VTG) običajno proizvajajo jetra samic oviparnih vretenčarjev kot odziv na endogeni estrogen v krvnem obtoku. Je predhodna sestavina beljakovin jajčnega rumenjaka, ki po nastanku v jetrih potuje po krvožilju do jajčnika, kjer jo absorbirajo in spremenijo razvijajoča se jajčeca. Vitelogenina v plazmi nezrelih ribjih samic in samecev skoraj ni mogoče zaznati, ker nimajo dovolj estrogena v obtoku; jetra pa so sposobna sinteze in izločanja vitelogenina kot odziv na spodbujanje z eksogenim estrogenom.
5. Meritev vitelogenina je namenjena zaznavanju kemikalij z različnimi estrogenimi načini delovanja. Estrogene kemikalije je mogoče zaznati z merjenjem indukcije vitelogenina pri ribjih samcih in je bilo obsežno dokumentirano v medsebojno strokovno pregledani znanstveni literaturi (npr. (7)). Indukcija vitelogenina je bila dokazana tudi po izpostavljenosti androgenom, ki se lahko aromatizirajo (8) (9). Zaradi zmanjšanja ravni estrogena v krvnem obtoku pri samicah, na primer z zaviranjem aromataze, ki spremeni endogeni androgen v naravni estrogen 17 β -estradiol, se zmanjša raven VTG, ki se uporablja za zaznavanje kemikalij, ki imajo lastnosti zaviranja aromataze (10) (11). Biološka pomembnost odziva vitelogenina na zaviranje estrogena/aromataze je bila dokazana in obsežno dokumentirana. Vendar je mogoče, da lahko na nastajanje VTG pri samicah vplivajo tudi splošna toksičnost in neendokrini toksični načini delovanja, npr. hepatotoksičnost.

6. Več merilnih metod je bilo uspešno pripravljenih in standardiziranih za redno uporabo. Med njimi so metode encimskega imunskega testa (ELISA), ki so specifične za posamezne vrste in uporabljajo imunokemijo za kvantifikacijo VTG, nastalega v majhnih vzorcih krvi ali jeter, ki so bili odvzeti pri posameznih ribah (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18). Za meritev VTG se vzorčijo kri črnoglavega pisanca, kri ali homogenat glave/repa cebrice in jetra medake. Pri medaki je korelacija med VTG, izmerjenim v krvi, in VTG, izmerjenim v jetrih, dobra (19). V Dodatku 6 so navedeni priporočeni postopki za odvzem vzorcev za analizo VTG. Kompleti za merjenje VTG so splošno dostopni; taki kompleti morajo temeljiti na validirani metodi ELISA, specifični za posamezno vrsto.
7. Sekundarne spolne značilnosti ribjih samcev nekaterih vrst so vidne že navzven, mogoče jih je kvantificirati in se odzivajo na ravni endogenih androgenov v krvnem obtoku; to velja za črnoglavega pisanca in medako, vendar ne za cebrico, ki nima sekundarnih spolnih značilnosti, ki bi jih bilo mogoče kvantificirati. Samice so sposobne razviti moške sekundarne spolne značilnosti, če so izpostavljene androgenim kemikalijam v vodi. V znanstveni literaturi je na voljo več študij, ki dokumentirajo te vrste odziva pri črnoglavem pisancu (20) in medaki (21). Zmanjšanje sekundarnih spolnih značilnosti pri samcih je treba zaradi majhne statistične moči razlagati previdno, pri čemer mora razlaga temeljiti na strokovni presoji in zanesljivosti dokazov. Ker cebrica nima sekundarnih spolnih značilnosti, ki bi jih bilo mogoče kvantificirati in bi se odzivale na kemikalije z androgenim delovanjem, je njena uporaba v tem preskusu omejena.
8. Pri črnoglavem pisancu je glavni indikator eksogene izpostavljenosti androgenom število drstnih izpuščajev na nosu ribje samice. Pri medaki je glavni označevalec eksogene izpostavljenosti androgenim kemikalijam pri ribjih samicah število bradavičastih podaljškov. V Dodatku 5A in Dodatku 5B so navedeni priporočeni postopki za oceno spolnih značilnosti pri črnoglavem pisancu oziroma medaki.
9. 21-dnevni preskus z ribami vključuje oceno kvantitativnega proizvajanja iker in shranitev spolnih žlez za neobvezno histopatološko preiskavo. Nekateri regulativni organi lahko zahtevajo to dodatno končno točko za celovitejšo oceno sposobnosti preskusnih živali za razmnoževanje ali kadar izpostavljenost kemikaliji ni vplivala na vitelogenin in sekundarne spolne značilnosti. Čeprav so nekatere končne točke zelo diagnostične (npr. indukcija VTG pri samcih in tvorjenje izpuščajev pri samicah), vse končne točke (npr. plodnost in histopatologija spolnih žlez) v preskusu niso namenjene nedvoumni določitvi specifičnih celičnih mehanizmov delovanja. Šele ko so končne točke obravnavane skupaj, omogočajo sklepanje o možnih endokrinih motnjah in zagotovijo smernice za nadaljnje preskušanje. Čeprav plodnost ni izrecno povezana z endokrinim delovanjem, je zaradi dokazane občutljivosti na poznane kemikalije z endokrinim delovanjem (5) pomembna končna točka, ki jo je treba vključiti, saj je ob odsotnosti vpliva na to in druge končne točke mogoče z večjo gotovostjo trditi, da spojina najverjetneje ne deluje endokrino. Kadar pa vpliv na plodnost obstaja, to močno okrepi zanesljivost dokazov in sklepanje. Smernice glede razlage podatkov in sprejemljivosti rezultatov preskusa so navedene pozneje v okviru te preskusne metode.
10. Pojmi, uporabljeni pri tej preskusni metodi, so opredeljeni v Dodatku 1.

NAČELO PRESKUSA

11. V preskusu so ribji samci in samice v razmnoževalnem stanju skupaj izpostavljeni v preskusnih posodah. Njihova odraslost in razmnoževalno stanje omogočata jasno razlikovanje po spolu in zato s spolom povezano analizo posamezne končne točke ter zagotavljata njihovo občutljivost na eksogene kemikalije. Na koncu preskusa se spol potrdi z makroskopskim pregledom spolnih žlez po ventralnem odprtju trebuha s škarjami. Pregled ustreznih pogojev biološkega preskusa je naveden v Dodatku 2. Preskus se običajno začne z ribo, ki je bila vzorčena iz populacije, ki je zmožna drstenja; starajoče se živali se ne smejo uporabiti. Smernice glede

starosti rib in razmnoževalnega stanja so navedene v razdelku Izbira rib. Preskus se izvede s tremi koncentracijami kemikalije za izpostavljanje, kontrolo z vodo in po potrebi kontrolo s topilom. Pri cebričah se uporabita dve posodi ali ponovljena vzorca na tretiranje (vsaka posoda vsebuje 5 samcev in 5 samic). Pri črnoglavem pisanču se uporabijo štiri posode ali ponovljeni vzorci na tretiranje (vsaka posoda vsebuje 2 samca in 4 samice). To je namenjeno prilagoditvi teritorialnega vedenja samcev črnoglavega pisanča ob hkratni ohranitvi ustrezne moči preskusa. Pri medaki se uporabijo štiri posode ali ponovljeni vzorci na tretiranje (vsaka posoda vsebuje 3 samce in 3 samice). Izpostavljenost traja 21 dni, vzorčenje rib pa se izvede 21. dan izpostavljenosti. Kvantitativna plodnost se spremlja na dnevni ravni.

12. Pri vzorčenju na 21. dan se vse živali humano usmrtijo. Sekundarne spolne značilnosti se merijo pri črnoglavem pisanču in medaki (glej Dodatek 5A in Dodatek 5B); vzorci krvi se za določanje VTG odvzamejo pri cebriči in črnoglavem pisanču, pri čemer se lahko pri cebričah namesto tega za določanje VTG odvzame glava/rep (Dodatek 6), za analizo VTG pri medaki pa se odvzamejo jetra (Dodatek 6); spolne žleze se fiksirajo cele ali secirane za morebitno histopatološko oceno (22).

MERILA ZA SPREJEMLJIVOST PRESKUSA

13. Za sprejemljivost rezultatov preskusa morajo biti izpolnjeni naslednji pogoji:

- smrtnost v kontrolah z vodo (ali topilom) ob koncu obdobja izpostavljenosti ne sme presegati 10 %,
- koncentracija raztopljenega kisika mora biti v obdobju izpostavljenosti ves čas vsaj 60 % nasičenosti z zrakom (ASV),
- razlika v temperaturi vode v različnih preskusnih posodah v obdobju izpostavljenosti nikoli ne sme biti večja od $\pm 1,5$ °C in jo je treba vzdrževati v območju 2 °C znotraj temperaturnih območij, določenih za preskusno vrsto (Dodatek 2),
- na voljo morajo biti dokazi, da so se koncentracije preskusne kemikalije v raztopini zadovoljivo vzdrževale v okviru ± 20 % srednjih vrednosti meritev,
- na voljo morajo biti dokazi, da se ribe aktivno drstijo v vseh ponovljenih vzorcih pred začetkom izpostavljenosti kemikaliji in v ponovljenih kontrolnih vzorcih ves čas trajanja preskusa.

OPIS METODE

Oprema

14. Običajna laboratorijska oprema in zlasti naslednje:
- a. oksimetri in merilniki pH,
 - b. oprema za določanje trdote in alkalnosti vode,
 - c. ustrezne naprave za nadzor temperature in, po možnosti, stalno spremljanje,
 - d. akvariji iz kemijsko inertnih materialov in primerne prostornine glede na priporočeno obremenitev in gostoto rib (glej Dodatek 2),
 - e. substrat za drstenje pri črnoglavem pisanču in cebriči, za podrobnosti glej Dodatek 4,
 - f. ustrezno natančna tehtnica (tj. natančna na 0,5 mg).

Voda

15. Za preskusno vodo se lahko uporabi katera koli voda, v kateri kaže preskusna vrsta primerno dolgotrajno preživetje in rast. Kakovost vode mora biti ves čas trajanja preskusa konstantna. Vrednost pH vode mora biti med 6,5 in 8,5, znotraj enega preskusa pa mora biti v območju $\pm 0,5$ pH enote. Za zagotovitev, da voda za redčenje ne bi neprimerno vplivala na rezultat preskusa (na primer s kompleksacijo preskusne kemikalije), je treba redno odvezemati vzorce za analizo. Izvajati je treba meritve težkih kovin (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd in Ni), glavnih anionov in kationov (npr. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- in SO_4^{2-}), pesticidov (npr. skupnih organofosfornih in skupnih organoklorinih pesticidov), skupnega organskega ogljika in suspendiranih trdnih snovi, na primer vsake tri mesece, kadar se ve, da je voda za redčenje relativno konstantne kakovosti. Če se dokaže, da je bila kakovost vode konstantna vsaj eno leto, se lahko meritve izvajajo manj pogosto, časovni razmiki pa se lahko podaljšajo (npr. na vsakih šest mesecev). Nekatere kemijske značilnosti sprejemljive vode za redčenje so navedene v Dodatku 3.

Preskusne raztopine

16. Preskusne raztopine izbranih koncentracij se pripravijo z redčenjem osnovne raztopine. Osnovno raztopino je treba po možnosti pripraviti preprosto z mešanjem ali stresanjem preskusne kemikalije v vodi za redčenje z uporabo mehanskih sredstev (npr. z mešanjem ali ultrazvokom). Za pridobitev primerno koncentrirane osnovne raztopine se lahko uporabijo kolone za nasičevanje raztopine. Uporaba topila kot nosilca ni priporočljiva. Če je topilo potrebno, je treba vzporedno izvajati kontrolo s topilom z enako koncentracijo topila kot pri tretiranjih s kemikalijami. Za kemikalije, ki jih je težko preskusiti, je lahko topilo tehnično najboljša rešitev; upoštevati je treba dokument s smernicami OECD za preskušanje toksičnosti zahtevnih snovi in zmesi v vodnem okolju (23). Topilo se izbere na podlagi kemijskih lastnosti snovi ali zmesi. V dokumentu s smernicami OECD se priporoča največ 100 $\mu\text{l/l}$, kar je treba upoštevati. Vendar so bili v zadnjem pregledu (24) izraženi dodatni pomisleki glede uporabe topil za preskušanje endokrinega delovanja. Zato se priporoča, da se koncentracije topila, če je to sploh potrebno, kar najbolj zmanjšajo, kadar koli je to tehnično izvedljivo (glede na fizikalno-kemijske lastnosti preskusne kemikalije).
17. Uporabi se pretočni preskusni sistem. Ta sistem stalno odmerja in redči osnovno raztopino preskusne kemikalije (npr. merilna črpalka, proporcionalni razredčevalnik in sistem naprav za nasičenje), da dovaja niz koncentracij v preskusne komore. Pretok osnovnih raztopin in vode za redčenje je treba med preskusom preverjati v ustreznih časovnih razmikih, po možnosti vsak dan, in se ne sme razlikovati za več kot 10 % med celotnim preskusom. Izogibati se je treba uporabi nizkokakovostnega plastičnega cevne materiala ali drugih materialov, ki lahko vsebujejo biološko aktivne kemikalije. Pri izbiri materiala za pretočni sistem je treba upoštevati morebitno adsorpcijo preskusne kemikalije v ta material.

Vzdrževanje rib

18. Preskusne ribe je treba izbrati iz laboratorijske populacije, po možnosti iz enega staleža, ki se je vsaj dva tedna pred preskusom aklimatizirala v podobnih pogojih kakovosti vode in osvetljenosti, kot so tisti, ki se uporabijo v preskusu. Pomembno je, da sta stopnja obremenitve in gostota rib (za opredelitvi glej Dodatek 1) primerni za uporabljene preskusne vrste (glej Dodatek 2).
19. Po 48 urah prilaganja se zabeleži smrtnost in uporabijo se naslednja merila:
- smrtnost v sedmih dneh je večja od 10 % populacije: celotna serija se zavrne;
 - smrtnost med 5 % in 10 % populacije: aklimatizacija dodatnih sedem dni; če je v teh dodatnih sedmih dneh smrtnost večja od 5 %, se celotna serija zavrne;
 - smrtnost v sedmih dneh je manjša od 5 % populacije: serija se sprejme.
20. Bolezni rib se v obdobju aklimatizacije, obdobju pred izpostavljenostjo ali v obdobju izpostavljenosti ne smejo zdraviti.

Obdobje pred izpostavljenostjo in izbira rib

21. Priporoča se eno- do dvotedensko obdobje pred izpostavljenostjo, pri čemer so živali v posodah, podobnim posodam v dejanskem preskusu. Ribe je treba v celotnem obdobju vzdrževanja in med fazo izpostavljenosti hraniti *ad libitum*. Faza izpostavljenosti se začne s spolno dimorfnimi odraslimi ribami iz laboratorijske zaloge razmnoževalno zrelih živali (npr. z jasno vidnimi sekundarnimi spolnimi značilnostmi pri črnoglavem pisancu in medaki) in aktivnim drstenjem. V splošnem (vendar se to ne sme upoštevati brez opazovanja dejanskega razmnoževalnega stanja zadevne serije rib) morajo biti črnoglavi pisanci stari približno 20 (\pm 2) tednov, če so bili v celotni življenjski dobi gojeni pri 25 \pm 2 °C. Japonske medake morajo biti stare približno 16 (\pm 2) tednov, če so bile v celotni življenjski dobi gojene pri 25 \pm 2 °C. Cebrice morajo biti stare približno 16 (\pm 2) tednov, če so bile v celotni življenjski dobi gojene pri 26 \pm 2 °C. V fazi pred izpostavljenostjo je treba vsak dan oceniti proizvajanje iker. Priporoča se, da se pred vključitvijo v fazo izpostavljenosti v preskusu v vseh ponovitvenih akvarijih opazuje drstenje. V tej fazi ni mogoče zagotovi kvantitativnih smernic glede želenega dnevnega proizvajanja iker, vendar je precej običajno povprečno drstenje > 10 iker dnevno na samico pri vsaki vrsti. Za porazdelitev ponovljenih vzorcev na različne stopnje preskusa je treba uporabiti zasnovo naključne porazdelitve v bloke glede na proizvajanje iker, s čimer se bo zagotovila uravnotežena porazdelitev ponovljenih vzorcev.

ZASNOVA PRESKUSA

22. Uporabijo se tri koncentracije preskusne kemikalije, ena kontrola (z vodo) in po potrebi ena kontrola s topilom. Podatki se lahko analizirajo, da se določijo statistično značilne razlike med odzivi na tretiranje in odzivi v kontrolah. Te analize bodo pokazale, ali je za kemikalijo potrebno nadaljnje dolgotrajno preskušanje glede škodljivih učinkov (in sicer na preživetje, razvoj, rast in razmnoževanje) namesto uporabe za oceno tveganja (25).
23. Pri cebrici se na 21. dan preskusa samci in samice iz posameznih stopenj tretiranja (5 samcev in 5 samic v vsakem od dveh ponovljenih vzorcev) ter kontrol vzorčijo za meritev vitelogenina. Pri medaki se na 21. dan preskusa samci in samice iz posameznih stopenj tretiranja (3 samci in 3 samice v vsakem od štirih ponovljenih vzorcev) ter kontrol vzorčijo za meritev vitelogenina in sekundarnih spolnih značilnosti. Pri črnoglavem pisancu se na 21. dan izpostavljenosti samci in samice iz posameznih stopenj tretiranja (2 samca in 4 samice v vsakem od štirih ponovljenih vzorcev) in kontrol vzorčijo za meritev vitelogenina in sekundarnih spolnih značilnosti. Potrebna je kvantitativna ocena plodnosti, tkivo spolnih žlez pa je po potrebi treba fiksirati cele ali secirane za morebitno histopatološko oceno.

Izbira preskusnih koncentracij

24. Za namen tega preskusa je treba najvišjo preskusno koncentracijo določiti z najvišjo tolerančno koncentracijo (v nadaljnjem besedilu: MTC), ki se določi s študijo za določanje območja delovanja ali na podlagi drugih podatkov o toksičnosti, ali 10 mg/l ali največjo topnostjo v vodi, pri čemer se uporabi najnižja od teh vrednosti. MTC je opredeljena kot najvišja preskusna koncentracija kemikalije, ki povzroči manj kot 10-odstotno smrtnost. Pri uporabi tega pristopa se domneva, da obstajajo empirični podatki o akutni toksičnosti ali drugi podatki o toksičnosti, na podlagi katerih se lahko oceni MTC. Ocena MTC je lahko netočna in običajno zahteva strokovno presojo.
25. Potrebne so tri preskusne koncentracije, ki se med seboj razlikujejo za konstantni faktor, ki ne presega 10, in kontrola z vodo za redčenje (ter po potrebi kontrola s topilom). Priporoča se območje faktorjev razmika med 3,2 in 10.

POSTOPEK

Izbira in tehtanje preskusnih rib

26. Pomembno je, da se že na začetku preskusa čim bolj zmanjša variacija teže rib. Primerna območja velikosti za različne vrste, priporočene za uporabo v tem preskusu, so navedena v Dodatku 2. Za celotno serijo rib, uporabljenih v preskusu, je treba teže posameznih ribjih samcev in samic na začetku preskusa po možnosti vzdrževati v območju ± 20 % aritmetične sredine teže istega spola. Priporočljivo je, da se pred preskusom stehta podvzorec staleža rib, da se oceni srednja vrednost teže.

Pogoji izpostavljenosti

Trajanje

27. Preskus traja 21 dni po obdobju pred izpostavljenostjo. Priporočeno obdobje pred izpostavljenostjo traja en teden do dva tedna.

Hranjenje

28. Ribe je treba hraniti *ad libitum* s primerno hrano (Dodatek 2) dovolj pogosto, da se vzdržuje telesna kondicija. Paziti je treba, da ne pride do rasti mikrobov in motnosti vode. Kot splošna smernica se lahko dnevni obrok razdeli na dva ali tri enake dele za večkratno krmljenje, pri čemer morajo med posameznimi krmljenji preteči vsaj tri ure. En večji obrok je sprejemljiv zlasti ob koncih tedna. Hranjenje rib je treba prekiniti 12 ur pred vzorčenjem/nekropsijo.
29. Pri ribji hrani je treba oceniti prisotnost onesnaževal, kot so organoklorni pesticidi, policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH) in poliklorirani bifenili (PCB). Izogibati se je treba hrani z višjo ravnjo fitoestrogenov, ki bi lahko ogrozili odziv preskusa na znani agonist estrogena (npr. 17 β -estradiol).
30. Nezaužito hrano in iztrebke je treba odstraniti iz preskusnih posod vsaj dvakrat na teden, npr. s previdnim čiščenjem dna posameznega akvarija z uporabo sifona.

Svetloba in temperatura

31. Obdobje osvetljenosti in temperatura vode morata biti ustrezna za preskusno vrsto (glej Dodatek 2).

Pogostost analitskega določanja in meritev

32. Pred začetkom obdobja izpostavljenosti je treba zagotoviti ustrezno delovanje sistema za dovajanje kemikalije. Vzpostaviti je treba vse potrebne analitske metode, vključno z zadostnim znanjem o stabilnosti kemikalije v preskusnem sistemu. Med preskusom se koncentracije preskusne kemikalije določijo v rednih časovnih razmikih, kot sledi: pretoke redčila in osnovne raztopine toksične snovi je treba po možnosti preveriti vsak dan, vendar vsaj dvakrat na teden, pri čemer se med celotnim preskusom ne smejo razlikovati za več kot 10 %. Priporoča se, da se dejanske koncentracije preskusne kemikalije izmerijo v vseh posodah na začetku preskusa in nato v tedenskih časovnih razmikih.
33. Priporoča se, da rezultati temeljijo na izmerjenih koncentracijah. Če pa se je koncentracija preskusne kemikalije v raztopini zadovoljivo vzdrževala znotraj ± 20 % nominalne koncentracije ves čas preskusa, lahko rezultati temeljijo na nominalnih ali izmerjenih vrednostih.

34. Vzorce bo morda treba filtrirati (npr. z uporabo filtra z velikostjo por 0,45 μm) ali centrifugirati. Če je filtracija potrebna, je priporočeni postopek centrifugiranje. Če pa se preskusni material ne adsorbira na filtri, je lahko sprejemljivo tudi filtriranje.
35. Med preskusom je treba vsaj enkrat na teden v vseh preskusnih posodah izmeriti raztopljeni kisik, temperaturo in vrednost pH. Skupno trdoto in alkalnost je treba vsaj enkrat na teden izmeriti v kontrolah in eni posodi pri najvišji koncentraciji. Temperatura se po možnosti stalno spremlja v vsaj eni preskusni posodi.

Opazovanja

36. Med potekom preskusa ali ob prekinitvi preskusa se ocenijo številni splošni (npr. preživetje) in biološki odzivi (npr. ravni VTG). Vsak dan je treba kvantitativno spremljati plodnost. Merjenje in ocena teh končnih točk ter njihova uporabnost so opisani v nadaljevanju.

Preživetje

37. Ribe je treba v obdobju preskusa pregledati vsak dan, zabeležiti vsako umrlo ribo, mrtve ribe pa čim prej odstraniti. Mrtve ribe se ne smejo nadomestiti niti v kontrolnih posodah niti v tretiranih posodah. Spol rib, ki poginejo med preskusom, je treba določiti z makroskopsko oceno spolnih žlez.

Vedenje in videz

38. Zapisati je treba vsako nenormalno vedenje (glede na kontrole); to lahko vključuje znake splošne toksičnosti, vključno s hiperventilacijo, nekoordiniranim plavanjem, izgubo ravnotežja in netipičnim mirovanjem ali hranjenjem. Zapisati je treba tudi zunanje anomalije (kot sta hemoragija in razbarvanje). Take znake toksičnosti je treba pri razlagi podatkov previdno obravnavati, ker lahko nakazujejo koncentracije, pri katerih biomarkerji endokrinega delovanja niso zanesljivi. Taka opažanja v zvezi z vedenjem lahko zagotovijo tudi koristne kvalitativne informacije, ki kažejo možne zahteve za prihodnje preskušanje rib. Pri črnoglavem pisanecu, ki je bil izpostavljen androgenom, je bila na primer opažena teritorialna agresivnost normalnih samcev ali maskuliniziranih samic; pri cebrici se značilno vedenje pri parjenju in drstenju po svitanju zmanjša ali ga ovira izpostavljenost estrogenom ali antiandrogenom.
39. Ker se lahko nekateri vidiki videza (zlasti barva) pri rokovanju hitro spremenijo, je pomembno, da se kvalitativno opazovanje izvede pred odstranitvijo živali iz preskusnega sistema. Dosedanje izkušnje s črnoglavim pisanecem kažejo, da lahko nekatere kemikalije z endokrinim delovanjem na začetku povzročijo spremembe naslednjih zunanjih značilnosti: barve telesa (svetla ali temna), vzorcev obarvanja (prisotnost navpičnih prog) in oblike telesa (glava in območje prsi). Zato je treba opazovanje fizičnega videza rib izvesti med potekom preskusa in ob koncu študije.

Plodnost

40. Dnevna kvantitativna opazovanja drstenja je treba zapisati za vsak ponovljeni vzorec. Proizvajanje iker je treba zapisati kot število iker dnevno na preživelo samico za vsak ponovljeni vzorec. Ikre se vsak dan odstranijo iz preskusnih komor. Pri črnoglavem pisanecu in cebrici se v preskusno komoro namestijo substrati za drstenje, ki ribam omogočajo normalne pogoje drstenja. V Dodatku 4 je na voljo več podrobnosti o priporočenih substratih za drstenje za cebrico (Dodatek 4A) in črnoglavega pisanca (Dodatek 4B). Substrat za drstenje pri medaki ni potreben, zato ga ni treba namestiti.

Humana usmrtilitev rib

41. Ribe je treba 21. dan, tj. ob prekinitvi izpostavljenosti, evtanazirati s primernimi količinami trikaina (trikain metan sulfonat, metakain, MS-222 (št. CAS 886-86-2), 100–500 mg/l, pufran s 300 mg/l NaHCO₃ (natrijev bikarbonat, št. CAS 144-55-8)), da se zmanjša draženje sluznice; kri ali tkivo se nato vzorči za določitev VTG, kot je pojasnjeno v razdelku o vitelogeninu.

Opazovanje sekundarnih spolnih značilnosti

42. Nekateri kemikalije z endokrinim delovanjem lahko povzročijo spremembe pri določenih sekundarnih spolnih značilnostih (število drsnih izpuščajev pri samcih črnoglavega pisanca, bradavičasti podaljški pri samcih medake). Kemikalije z nekaterimi načini delovanja lahko povzročijo nenormalno pojavnost sekundarnih spolnih značilnosti pri živalih nasprotnega spola; agonisti receptorjev za androgene, kot so trenbolon, metiltestosteron in dihidrotestosteron, lahko na primer pri samici črnoglavega pisanca povzročijo razvoj izrazitih drsnih izpuščajev, pri samici medake pa razvoj bradavičastih podaljškov (11) (20) (21). Obstajajo tudi poročila, da lahko agonisti receptorjev za estrogene zmanjšajo število drsnih izpuščajev in velikost dorzalne strani trupa pred hrbtno plavutjo pri odraslih samcih črnoglavega pisanca (26) (27). Taka splošna morfološka opažanja lahko zagotovijo koristne kvalitativne in kvantitativne informacije, ki kažejo možne zahteve za prihodnje preskušanje rib. Število in velikost drsnih izpuščajev pri črnoglavem pisancu in bradavičastih podaljškov pri medaki se lahko kvantificira neposredno ali bolj praktično na shranjenih vzorcih. Priporočeni postopki za oceno sekundarnih spolnih značilnosti pri črnoglavem pisancu in medaki so navedeni v Dodatku 5A oziroma Dodatku 5B.

Vitelogenin (VTG)

43. Kri se odvzame iz repne arterije/vene s heparinizirano mikrohematokritsko kapilarno cevko ali namesto tega s srčno punkcijo z brizgo. Količine zbrane krvi so odvisne od velikosti ribe ter so običajno v območju 5–60 μ l na posameznega črnoglavega pisanca in 5–15 μ l na posamezno cebrico. Plazma se od krvi loči s centrifugiranjem in shrani z zaviralci proteaze pri -80 °C, dokler se pri njej ne izvede analiza vitelogenina. Alternativno se lahko pri medaki kot tkivni vir za določanje VTG uporabijo jetra in pri cebrici homogenat glave/repa (Dodatek 6). Meritev VTG mora temeljiti na validirani homologni metodi ELISA, pri čemer se uporabijo homologni standard VTG in homologna protitelesa. Priporoča se uporaba metode, s katero je mogoče zaznati tako nizke ravni VTG, kot je nekaj ng/ml plazme (ali ng/mg tkiva), kar je raven ozadja pri neizpostavljenih ribjih samcih.
44. Nadzor kakovosti analize VTG se zagotovi z uporabo standardov, slepih vzorcev in vsaj dvema analizama. Za vsako metodo ELISA je treba izvesti preskus vpliva matriksa (učinek razredčenja vzorca), da se določi najmanjši faktor razredčenja vzorca. Vsaka plošča ELISA, uporabljena za preskuse VTG, mora vsebovati naslednje vzorce za nadzor kakovosti: vsaj 6 kalibracijskih standardov, ki zajemajo območje pričakovanih koncentracij VTG, in vsaj en nespecifično vezalni preskus slepega vzorca (analiziran v dveh ponovitvah). Absorpcija teh slepih vzorcev mora biti manj kot 5 % največje absorpcije kalibracijskega standarda. Analizirana bosta vsaj dva alikvota (jamice s ponovljenimi vzorci) posameznega razredčenja vzorca. Jamice s ponovljenimi vzorci, ki se razlikujejo za več kot 20 %, je treba ponovno analizirati.
45. Korelacijski koeficient (R^2) za umeritvene krivulje mora biti večji od 0,99. Vendar visoka korelacija ni dovolj za zagotovitev ustrezne napovedi koncentracije v vseh območjih. Poleg dovolj visoke korelacije za umeritveno krivuljo mora biti koncentracija posameznega standarda, kot je izračunana po umeritveni krivulji, med 70 in 120 % nominalne koncentracije. Če se nominalne koncentracije oddaljujejo od regresijske premice kalibracije (npr. pri nižjih koncentracijah), bo umeritveno krivuljo morda treba razdeliti na nizke in visoke razpone ali uporabiti nelinearni model, ki bo ustrezal podatkom o absorpciji. Če se krivulja razdeli, mora biti R^2 na obeh delih $> 0,99$.
46. Meja zaznavnosti (LOD) je opredeljena kot koncentracija najnižjega analitskega standarda, meja določljivosti (LOQ) pa je opredeljena kot koncentracija najnižjega analitskega standarda, pomnoženega z najnižjim faktorjem razredčenja.
47. Vsak dan izvedbe preskusa VTG se analizira obogateni vzorec, pripravljen z med preskusnim referenčnim standardom (Dodatek 7). Razmerje med pričakovano koncentracijo in izmerjeno koncentracijo se sporoči skupaj z rezultati posameznih nizov preskusov, izvedenih isti dan.

Ocena histopatologije spolnih žlez

48. Regulativni organi lahko zahtevajo izvedbo histopatologije spolnih žlez, da se prouči ciljni organ na osi HPG po izpostavljenosti kemikaliji. Zato se spolne žleze fiksirajo cele ali secirane. Kadar je potrebna histopatologija, se pri oceni endokrinega delovanja preskusne kemikalije iščejo posebni odzivi na spolnih žlezah, povezani z endokrinim sistemom. Ti diagnostični odzivi vključujejo predvsem prisotnost oocitov na modih, hiperplazijo Leydigovih celic, slabše tvorjenje rumenjaka, povečanje spermatogonijev in perifolikularno hiperplazijo. Za druge lezije spolnih žlez, kot so atrezija oocitov, degeneracija mod in spremembe glede na razvojno stopnjo, lahko obstajajo različni vzroki. V dokumentu s smernicami za histopatologijo spolnih žlez rib so podrobno opredeljeni postopki, ki se uporabljajo pri seciranju, fiksiranju, odstranitvi in histopatološki oceni spolnih žlez (22).

PODATKI IN POROČANJE

Ocena odzivov biomarkerja z analizo variance

49. Za opredelitev možnega endokrinega delovanja kemikalije se z analizo variance primerjajo odzivi med tretiranimi in kontrolnimi skupinami. Kadar se uporabi kontrola s topilom, je treba za vsako končno točko izvesti primeren statistični test med vodo za redčenje in kontrolami s topilom. Smernice za obravnavanje podatkov o vodi za redčenje in kontroli s topilom pri nadaljnji statistični analizi so navedene v OECD, 2006c (28). Vse podatke o biološkem odzivu je treba analizirati in vključiti v poročilo za vsak spol posebej. Če niso izpolnjene zahtevane domneve za parametrske metode – nenormalna porazdelitev (npr. Shapiro-Wilkov test) ali heterogena varianca (Bartlettov ali Levenejev test), je potreben razmislek o preoblikovanju podatkov, da se poenotijo variance pred izvedbo analize variance ali pred izvedbo tehtane analize variance. Za nemonoton odziv na odmerek se lahko uporabi Dunnettov test (parametrski) večkratnih primerjav med pari ali Mann-Whitneyjev test z Bonferronijevo prilagoditvijo (neparametrski). Če je odziv na odmerek približno monoton, se lahko uporabijo drugi statistični testi (npr. test po Jonckheere-Terpstraju ali Williamsov test). Za lažjo izbiro najprimernejšega statističnega testa je v Dodatku 8 zagotovljen diagram poteka za statistično analizo. Dodatne informacije so na voljo tudi v dokumentu OECD z naslovom „Sodobni pristopi pri statistični analizi podatkov o ekotoksičnosti: smernice za uporabo“ (ang. *Document on Current Approaches to Statistical Analysis of Ecotoxicity Data*) (28).

Poročanje o rezultatih preskusa

50. Podatki študije morajo vključevati naslednje:

Preskusni laboratorij:

- odgovorno osebe in njihove obveznosti v zvezi s študijo;
- vsak laboratorij mora dokazati usposobljenost s sklopom reprezentativnih kemikalij.

Preskusna kemikalija:

- opredelitev lastnosti preskusne kemikalije;
- fizikalno stanje in ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;
- metoda in pogostost priprave preskusnih koncentracij;
- informacije o stabilnosti in biološki razgradljivosti.

Topilo:

- opredelitev lastnosti topila (vrsta, uporabljena koncentracija);
- utemeljitev izbire topila (če to ni voda).

Preskusne živali:

- vrsta in sev;
- dobavitelj in specifični objekt dobavitelja;
- starost rib na začetku preskusa in razmnoževalno stanje/stanje drstenja;
- podrobnosti o postopku aklimatizacije živali;
- telesna teža rib na začetku izpostavljenosti (iz podvzorca staleža rib).

Preskusni pogoji:

- uporabljeni preskusni postopek (vrsta preskusa, stopnja obremenitve, gostota rib itd.);
- metoda priprave osnovnih raztopin in pretok;
- nominalne preskusne koncentracije, tedensko izmerjene koncentracije preskusnih raztopin in uporabljena analitska metoda, sredine izmerjenih vrednosti in standardnih odklonov v preskusnih posodah ter dokazi, da se meritve nanašajo na koncentracije preskusne kemikalije v dejanski raztopini;
- značilnosti vode za redčenje (vključno s pH, trdoto, alkalnostjo, temperaturo, koncentracijo raztopljenega kisika, ravnmi preostalega klora, skupnim organskim ogljikom, suspendiranimi trdnimi snovmi in drugimi izvedenimi meritvami);
- kakovost vode v preskusnih posodah: pH, trdota, temperatura in koncentracija raztopljenega kisika;
- podrobne informacije o hranjenju (npr. vrsta hrane, vir, dana količina in pogostost dajanja ter analiza zadevnih onesnaževal, če je na voljo (npr. PCB, PAH in organoklorni pesticidi)).

Rezultati:

- dokazi, da kontrole izpolnjujejo merila za sprejemljivost preskusa;
- podatki o smrtnosti za posamezne preskusne koncentracije in kontrole;
- uporabljene tehnike statistične analize, obdelava podatkov in utemeljitev uporabljenih tehnik;
- podatki o bioloških opažanjih splošne morfologije, vključno s sekundarnimi spolnimi značilnostmi, proizvodnjem iker in VTG;
- rezultati analiz podatkov, po možnosti v obliki tabel in grafov;
- pojav kakršnih koli neobičajnih reakcij rib in kakršnih koli vidnih učinkov, ki jih povzroči preskusna kemikalija.

SMERNICE ZA RAZLAGO IN SPREJEMLJIVOST REZULTATOV PRESKUSA

51. V tem razdelku je navedenih nekaj preudarkov, ki jih je treba upoštevati pri razlagi rezultatov preskusa za različne izmerjene končne točke. Rezultate je treba razlagati previdno, kadar se zdi, da preskusna kemikalija povzroča očitno toksičnost ali vpliva na splošno stanje preskusne živali.
52. Pri določanju območja preskusnih koncentracij je treba paziti, da se ne preseže najvišja tolerančna koncentracija, da bo mogoča smiselna razlaga podatkov. Kadar ni znakov toksičnih učinkov, je pomembno, da se izvede vsaj eno tretiranje. Znake bolezni in znake toksičnih učinkov je treba temeljito oceniti in o njih poročati. Možno je na primer, da na nastajanje VTG pri samicah vplivajo tudi splošna toksičnost in neendokrini toksični načini delovanja, npr. hepatotoksičnost. Vendar se lahko razlaga učinkov podkrepi z drugimi stopnjami tretiranja, na katere ne vpliva sistemska toksičnost.

53. V zvezi s sprejemljivostjo rezultatov preskusa je treba upoštevati nekaj vidikov. Ravni VTG v kontrolnih skupinah samcev in samic morajo biti praviloma izrazite ter ločene za približno tri rede velikosti pri črnozglavem pisancu in cebrici ter približno en red velikosti pri medaki. Primeri območja vrednosti v kontrolnih in tretiranih skupinah so navedeni v validacijskih poročilih (1) (2) (3) (4). Visoke vrednosti VTG pri kontrolnih samcih bi lahko ogrozile odzivnost preskusa in njegovo zmožnost zaznavanja šibkih agonistov estrogena. Nizke vrednosti VTG pri kontrolnih samicah bi lahko ogrozile odzivnost preskusa ter njegovo zmožnost zaznavanja zaviralcev aromataze in antagonistov estrogena. Pri pripravi zadevnih smernic so bile uporabljene validacijske študije.
54. Pri kvantifikaciji proizvajanja iker lahko pride do pomembnih variacij [koeficient variacije (KV) je lahko v območju 20–60 %], ki omejujejo zmožnost preskusa za zaznavanje statistično značilnega zmanjšanja proizvajanja iker, manjšega od 70 %, ko se KV približa 50 % ali jih preseže. Kadar je KV omejen na nižje vrednosti (približno 20–30 %), ima preskus sprejemljivo moč (80 %) zaznavanja 40–50-odstotnega zmanjšanja proizvajanja iker. Zasnova preskusa, ki se uporablja za črnozglavega pisanca in vključuje štiri ponovljene vzorce na stopnjo tretiranja, bi morala omogočati večjo moč za končno točko plodnosti v primerjavi z zasnovo preskusa z le dvema ponovljenima vzorcema.
55. Če laboratorij še ni izvedel preskusa ali je prišlo do znatnih sprememb (npr. sprememba seva ali dobavitelja rib), se priporoča izvedba študije tehnične usposobljenosti. Priporočljivo je, da se uporabijo kemikalije, ki zajemajo različne načine delovanja ali vplive na številne preskusne končne točke. V praksi se spodbuja, naj vsak laboratorij vzpostavi lastne podatke o kontrolah iz preteklih preskusov za samce in samice ter pozitivno kontrolo za estrogeno delovanje (npr. 17 β -estradiol pri 100 ng/l ali znan šibek agonist), ki povzroči povečanje VTG pri ribjih samcih, pozitivno kontrolo za zaviranje aromataze (npr. fadrozol ali prokloraz pri 300 μ g/l), ki povzroči zmanjšanje VTG pri ribjih samicah, in pozitivno kontrolo za androgeno delovanje (npr. 17 β -trenbolon pri 5 μ g/l), ki povzroči indukcijo sekundarnih spolnih značilnosti pri samicah črnozglavega pisanca in medake. Vsi ti podatki se lahko primerjajo z razpoložljivimi podatki iz validacijskih študij (1) (2) (3), da se zagotovi usposobljenost laboratorija.
56. Na splošno je treba meritve VTG šteti za pozitivne, če je pri samcih prišlo do statistično značilnega povečanja ($p < 0,05$) ali pri samicah do statistično značilnega zmanjšanja ($p < 0,05$) vsaj pri največjem preskušenem odmerku v primerjavi s kontrolno skupino ter ob odsotnosti znakov splošne toksičnosti. Pozitiven rezultat je nadalje podprt s prikazom biološko verjetnega razmerja med odmerkom in krivuljo odziva. Kot je bilo navedeno, zmanjšanje VTG morda ni v celoti endokrinega izvora; vendar je treba pozitiven rezultat na splošno razlagati kot dokaz endokrinega delovanja *in vivo* ter si prizadevati za nadaljnjo pojasnitev.
57. Regulatorni organi lahko zahtevajo oceno histopatologije spolnih žlez, da se določi, ali so preskusne živali sposobne za razmnoževanje, in da se omogoči ocena zanesljivosti dokazov pri rezultatih preskusov. Izvedba histopatologije spolnih žlez morda ne bo potrebna, kadar so VTG ali sekundarne spolne značilnosti pozitivne (tj. povečanje ali zmanjšanje VTG ali indukcija sekundarnih spolnih značilnosti).

VIRI

- (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). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, št. 60, Pariz.
- (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). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, št. 61, Pariz.
- (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. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, št. 78, Pariz.

- (4) Owens, J. W. (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> (prevzeto 18.9.2008).
- (5) US EPA (2007). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. 15. december 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC, 104 str.
- (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. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, št. 94, Pariz.
- (7) Sumpter, J. P. in S. Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*, zv. 103/Dop. 7:173–8 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*, zv. 68(3): 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*, zv. 76 (3–4): 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): 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*, zv. 70(1): 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): 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 research report reference AQ001. CEFIC, Bruselj, Belgija.
- (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): 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: 119–131.
- (16) Rose, J. *et al.* (2002). Vitellogenin induction by 17b-estradiol and 17a-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 131: 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*, zv. 21: 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: 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: 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): 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): 774–81.
 - (22) OECD (2010). Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, št. 123, Pariz.
 - (23) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, št. 23, Pariz.
 - (24) Hutchinson, T. H. *et al.* (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Review. Aquatic Toxicology*, zv. 76, str. 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*, zv. 114/Dop. 1: 106–14.
 - (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, 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, 478–488.
 - (28) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, št. 54, OECD, Pariz.
 - (29) US EPA (2008). Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay, z dne 30. januarja 2008. US Environmental Protection Agency, Washington DC, 110 str.
 - (30) OECD (2012). *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters*. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, št. 150, OECD, Pariz.
-

Dodatek 1

OKRAJŠAVE IN OPREDELITEV POJMOV

Kemikalija: snov ali zmes.

KV: koeficient variacije.

ELISA: encimski imunski test (ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Os HPG: os hipotalamus – hipofiza – spolne žleze.

Stopnja obremenitve: mokra teža rib na prostornino vode.

MTC: najvišja tolerančna koncentracija, ki predstavlja približno 10 % LC₅₀.

Gostota rib: število rib na prostornino vode.

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

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

Dodatek 2

PRESKUSNI POGOJI ZA PRESEJALNI ENDOKRINI PRESKUS RIB

1. Priporočene vrste	Črnoglavi pisanec (<i>Pimephales promelas</i>)	Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	Cebrica (<i>Danio rerio</i>)
2. Vrsta preskusa	pretočni	pretočni	pretočni
3. Temperatura vode	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Kakovost osvetlitve	fluorescenčne sijalke (široki spekter)	fluorescenčne sijalke (široki spekter)	fluorescenčne sijalke (široki spekter)
5. Jakost svetlobe	10–20 μE/m ² /s, 540–1 000 luksov ali 50–100 ft-c (ravni v laboratoriju)	10–20 μE/m ² /s, 540–1 000 luksov ali 50–100 ft-c (ravni v laboratoriju)	10–20 μE/m ² /s, 540–1 000 luksov ali 50–100 ft-c (ravni v laboratoriju)
6. Obdobje osvetljenosti (svitanje in mrak sta neobvezna, vendar se ne štejeta za potrebna)	16 ur svetlobe, 8 ur teme	12–16 ur svetlobe, 12–8 ur teme	12–16 ur svetlobe, 12–8 ur teme
7. Stopnja obremenitve	< 5 g/l	< 5 g/l	< 5 g/l
8. Velikost preskusne komore	10 l (vsaj)	2 l (vsaj)	5 l (vsaj)
9. Količina preskusne raztopine	8 l (vsaj)	1,5 l (vsaj)	4 l (vsaj)
10. Zamenjave količin preskusnih raztopin	vsaj 6 na dan	vsaj 5 na dan	vsaj 5 na dan
11. Starost preskusnih organizmov	glej odstavek 21	glej odstavek 21	glej odstavek 21
12. Približna mokra teža odrasle ribe (g)	samice: 1,5 ± 20 % samci: 2,5 ± 20 %	samice: 0,35 ± 20 % samci: 0,35 ± 20 %	samice: 0,65 ± 20 % samci: 0,4 ± 20 %
13. Št. rib na preskusno posodo	6 (2 samca in 4 samice)	6 (3 samci in 3 samice)	10 (5 samcev in 5 samic)
14. Št. tretiranj	= 3 (plus ustrezno št. kontrol)	= 3 (plus ustrezno št. kontrol)	= 3 (plus ustrezno št. kontrol)
15. Št. posod na tretiranje	najmanj 4	najmanj 4	najmanj 2
16. Št. rib na preskusno koncentracijo	16 odraslih samic in 8 samcev (4 samice in 2 samca v vsaki ponovitveni posodi)	12 odraslih samic in 12 samcev (3 samice in 3 samci v vsaki ponovitveni posodi)	10 odraslih samic in 10 samcev (5 samice in 5 samcev v vsaki ponovitveni posodi)

17. Način hranjenja	živi ali zamrznjeni odrasli solinski rakci ali njihovi navpliji dvakrat ali trikrat na dan (<i>ad libitum</i>), komercialno dostopna hrana ali kombinacija navedenega	navpliji morskih rakcev dvakrat ali trikrat na dan (<i>ad libitum</i>), komercialno razpoložljiva hrana ali kombinacija navedenega	navpliji solinskih rakcev dvakrat ali trikrat na dan (<i>ad libitum</i>), komercialno dostopna hrana ali kombinacija navedenega
18. Prezračevanje	brez, razen če koncentracija raztopljenega kisika pade pod 60 % nasičenosti z zrakom	brez, razen če koncentracija raztopljenega kisika pade pod 60 % nasičenosti z zrakom	brez, razen če koncentracija raztopljenega kisika pade pod 60 % nasičenosti z zrakom
19. Voda za redčenje	čista površinska voda, voda iz vodnjaka ali modelna razredčevalna voda ali deklorirana vodovodna voda	čista površinska voda, voda iz vodnjaka ali modelna razredčevalna voda ali deklorirana vodovodna voda	čista površinska voda, voda iz vodnjaka ali modelna razredčevalna voda ali deklorirana vodovodna voda
20. Obdobje pred izpostavljenostjo	priporočeno 7–14 dni	priporočeno 7–14 dni	priporočeno 7–14 dni
21. Trajanje izpostavljenosti kemikaliji	21 dni	21 dni	21 dni
22. Biološke končne točke	<ul style="list-style-type: none"> — preživetje — vedenje — plodnost — 2y spolne značilnosti — VTG — histopatologija spolnih žlez (neobvezno) 	<ul style="list-style-type: none"> — preživetje — vedenje — plodnost — 2y spolne značilnosti — VTG — histopatologija spolnih žlez (neobvezno) 	<ul style="list-style-type: none"> — preživetje — vedenje — plodnost — VTG — histopatologija spolnih žlez (neobvezno)
23. Sprejemljivost preskusa	raztopljeni kisik > 60 % nasičenosti; srednja vrednost temperature 25 ± 2 °C; 90-odstotno preživetje rib v kontrolah; izmerjene preskusne koncentracije v območju 20 % srednje vrednosti meritev na stopnjo tretiranja	raztopljeni kisik > 60 % nasičenosti; srednja vrednost temperature 25 ± 2 °C; 90-odstotno preživetje rib v kontrolah; izmerjene preskusne koncentracije v območju 20 % srednje vrednosti meritev na stopnjo tretiranja	raztopljeni kisik > 60 % nasičenosti; srednja vrednost temperature 26 ± 2 °C; 90-odstotno preživetje rib v kontrolah; izmerjene preskusne koncentracije v območju 20 % srednje vrednosti meritev na stopnjo tretiranja

Dodatek 3

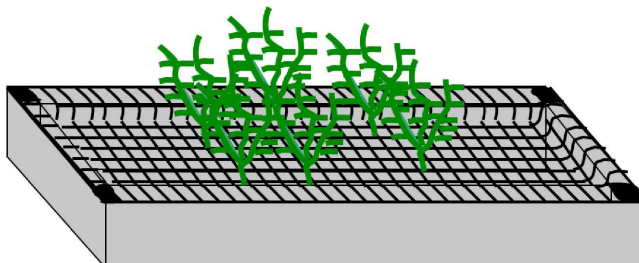
NEKATERE KEMIJSKE LASTNOSTI SPREJEMLJIVE VODE ZA REDČENJE

SESTAVINA	KONCENTRACIJE
delci	< 20 mg/l
skupni organski ogljik	< 2 mg/l
neionizirani amonijak	< 1 µg/l
preostali klor	< 10 µg/l
skupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/l
skupni organoklorni pesticidi in poliklorirani bifenili	< 50 ng/l
skupni organski klor	< 25 ng/l

Dodatek 4A

SUBSTRAT ZA DRSTENJE CEBRICE

Drstilni pladenj: popolnoma steklena laboratorijska posoda, na primer 22 x 15 x 5,5 cm (d x š x g), pokrita z odstranljivo rešetko iz nerjavnega jekla (širina mreže 2 mm). Rešetka mora prekriti odprtino laboratorijske posode pod robom.



Na rešetko je treba pritrditi substrat za drstenje. Zagotoviti mora strukturo, v katero se lahko premaknejo ribe. Primerne so na primer umetne akvarijske rastline iz zelene plastike (opomba: proučiti je treba morebitno adsorpcijo preskusne kemikalije na plastičnem materialu). Plastični material je treba dovolj dolgo izpirati v zadostni količini tople vode za zagotovitev, da v preskusno vodo ne bo prešla nobena kemikalija. Pri uporabi steklenih materialov je treba zagotoviti, da se ribe med intenzivnim premikanjem ne poškodujejo in niso utesnjene.

Razdalja med pladnjem in steklenimi ploščami mora biti vsaj 3 cm za zagotovitev, da se ribe ne drstijo zunaj pladnja. Ikre, odložene na pladenj, padejo skozi rešetko in se lahko vzorčijo 45–60 minut po začetku osvetlitve. Prozorne ikre niso sprijete in se lahko enostavno štejejo z uporabo prečne svetlobe. Če je v posodi pet samic, se do 20 iker na dan lahko šteje za nizko število, do 100 iker kot srednje in več kot 100 iker kot visoko število. Drstilni pladenj je treba odstraniti, zbrati ikre in drstilni pladenj ponovno postaviti v preskusno posodo čim pozneje zvečer ali zelo zgodaj zjutraj. Čas do ponovne postavitve rešetke ne sme presegati ene ure, saj bi sicer lahko substrat za drstenje spodbudil posamezna parjenja in drstenja ob neobičajnem času. Če je treba zaradi razmer drstilni pladenj vstaviti pozneje, je treba to storiti vsaj 9 ur po začetku osvetljenosti. Drstenje se tako pozno ne začne več.

Dodatek 4B

SUBSTRAT ZA DRSTENJE ČRNOGLAVEGA PISANCA

V vsako preskusno komoro se postavijo dve ali tri kombinirane plastične/keramične/steklene plošče ali plošče iz nerjavnega jekla in drstilni pladnji (npr. 80 mm dolg siv polkrožen žleb na pladenj z robovi, dolg 130 mm) (glej sliko). Ustrezno pripravljene plošče iz PVC ali keramike so dokazano primerne za substrat za drstenje (Thorpe *et al.* 2007).

Priporočeno je, da so plošče obrušene, da se izboljša oprijem. Pladenj mora biti tudi zaščiten, da se ribam prepreči dostop do iker, ki padejo skozi, razen če je bil pri uporabljenem substratu za drstenje dokazan učinkovit oprijem.



Podlaga je zasnovana tako, da zadrži vse iker, ki se ne primejo površine plošče in bi zato padle na dno akvarija (ali tiste iker, ki so odložene neposredno na ravno plastično podlago). Vse substrate za drstenje je treba pred uporabo vsaj 12 ur izpirati v vodi za redčenje.

Thorpe, K. L., Benstead, R., Hutchinson, T. H., Tyler, C. R., 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Aquatic Toxicology*, zv. 81, 90–98.

Dodatek 5A

OCENA SEKUNDARNIH SPOLNIH ZNAČILNOSTI PRI ČRNOGLAVEM PISANCU ZA ZAZNAVANJE NEKATERIH KEMIKALIJ Z ENDOKRINIM DELOVANJEM**Pregled**

Potencialno pomembne značilnosti fizičnega videza odraslih črnoglavih pisancev pri preskušanju povzročiteljev endokrinih motenj vključujejo barvo telesa (tj. svetla/temna), vzorce obarvanja (tj. prisotnost ali odsotnost navpičnih prog), obliko telesa (tj. oblika glave in območja prsi, napetost trebuha) in posebne sekundarne spolne značilnosti (tj. število in velikost drstnih izpuščajev, velikost dorzalne strani trupa pred hrbtno plavutjo in leglice).

Drstni izpuščaji so na glavi (dorzalna stran trupa pred hrbtno plavutjo) razmnoževalno aktivnih samcev črnoglavega pisanca in so običajno razporejeni v dvostransko simetrični vzorec (Jensen *et al.* 2001). Kontrolne samice ter mladi samci in samice razvoja izpuščajev ne kažejo (Jensen *et al.* 2001). Okoli oči in med nosnicama samcev je lahko do osem posameznih izpuščajev. Največ izpuščajev in največji izpuščaji so v dveh vzporednih linijah neposredno pod nosnicama in nad usti. Pri številnih ribah so skupine izpuščajev pod spodnjo čeljustjo; izpuščaji, ki so najbližje ustom, se običajno pojavljajo kot par, medtem ko lahko bolj ventralni sklop sestavljajo do štiri izpuščaji. Dejansko število izpuščajev je redko večje od 30 (območje 18–28; Jensen *et al.* 2001). Prevladujoči izpuščaji (v smislu števila) so prisotni kot posamezne, razmeroma okrogle strukture, katerih višina je približno enaka polmeru. Večina razmnoževalno aktivnih samcev ima tudi vsaj nekaj izpuščajev, ki so večji in izraziti, da jih ni mogoče razlikovati kot posamezne strukture.

Nekatere vrste kemikalij, ki povzročajo endokrine motnje, lahko povzročijo nenormalen pojav nekaterih sekundarnih spolnih značilnosti pri nasprotnem spolu; na primer, agonisti receptorjev za androgene, kot je 17 α -metiltestosteron ali 17 β -trenbolon, lahko povzročijo razvoj drstnih izpuščajev pri samicah črnoglavega pisanca (Smith 1974; Ankley *et al.* 2001, 2003), medtem ko lahko agonisti receptorjev za estrogene zmanjšajo število ali velikost drstnih izpuščajev pri samcih (Miles-Richardson *et al.* 1999; Harries *et al.* 2000).

V nadaljevanju je naveden opis opredelitve lastnosti drstnih izpuščajev pri črnoglavem pisancu na podlagi postopkov, uporabljenih v laboratoriju Agencije ZDA za varstvo okolja v Duluthu (Minnesota). Posebni izdelki in/ali oprema se lahko nadomestijo s primerljivimi materiali, ki so na voljo.

Opazovanje je najboljšo z uporabo osvetljenega povečevalnega stekla ali trikratno osvetljenega stereomikroskopa. Ribe se opazujejo dorzalno in anteriorno naprej (glava proti opazovalcu).

- Ribe se postavijo v majhno petrijevko (npr. s premerom 100 mm) anteriorno naprej in ventralno navzdol. Iskalo se usmeri tako, da se omogoči prepoznavanje izpuščajev. Za določitev območij z izpuščaji se riba nežno in počasi obrne z ene strani na drugo. Izpuščaji se preštejejo in ocenijo.
- Opazovanje se ponovi na ventralni površini glave, tako da se riba v petrijevko postavi dorzalno anteriorno naprej.
- Opazovanje posamezne ribe je treba zaključiti v 2 minutah.

Štetje in ocenjevanje izpuščajev

Za ocenjevanje prisotnosti in razvoja izpuščajev pri odraslih črnoglavih pisancih je bilo opredeljenih šest specifičnih območij. Za določitev lokacije in števila prisotnih izpuščajev je bila pripravljena predloga (glej konec tega dodatka). Število izpuščajev se zapiše, njihova velikost pa se lahko za vsak organizem kvantitativno razvrsti, kot sledi: 0 – odsoten, 1 – prisoten, 2 – povečan in 3 – izrazit (slika 1).

Ocena 0 – odsotnost izpuščajev. Ocena 1 – prisoten, tj. vsak izpuščaj z eno točko, pri kateri je višina skoraj enaka polmeru. Ocena 2 – povečan, tj. tkivo, ki je po videzu podobno zvezdici in ima običajno veliko zvezdasto osnovo z brazdami ali gubami, ki izhajajo iz središča. Izpuščaj je v višjem delu pogosto bolj nazobčan, vendar je lahko občasno nekoliko zaokrožen. Ocena 3 – izrazit, tj. običajno razmeroma velik in zaokrožen izpuščaj z manj definirano strukturo. Ti izpuščaji so občasno skupaj in tvorijo celoto s posameznimi ali kombiniranimi območji (B, C in D, opisana v nadaljevanju). Obarvanost in oblika sta podobni kot pri oceni 2, vendar sta občasno razmeroma nedoločljivi. S tem ocenjevalnim sistemom je skupna ocena izpuščajev običajno < 50 pri normalnih kontrolnih samcih s številom izpuščajev od 18 do 20 (Jensen *et al.* 2001).

Slika 1



Dejansko število izpuščajev je lahko pri nekaterih ribah večje od polj v predlogi za določeno območje ocenjevanja. V tem primeru se lahko označijo dodatne ocene, in sicer desno ali levo od polja. Zato ni treba, da je predloga simetrična. Dodatna tehnika označevanja izpuščajev, ki so v parih ali združeni navpično ob vodoravni ravnini ust, se lahko izvede z dvojnimi označevanjem dveh ocen izpuščajev v enem polju.

Območja označevanja:

A – izpuščaji okoli oči. Označeni dorzalno do ventralno okoli anteriornega očesnega obroča. Pri odraslih kontrolnih samcih jih je pogosto več, pri kontrolnih samicah jih ni, na splošno so v parih (en blizu vsakega očesa) ali sami pri samicah, izpostavljenih androgenom.

B – izpuščaji med nosnicama (pore senzornega kanala). Pri kontrolnih samcih v višjih razvojnih stopnjah so običajno v parih (2 – povečani ali 3 – izraziti). Niso prisotni pri kontrolnih samicah, pri čemer se pojavljajo in razvijajo pri samicah, izpostavljenih androgenom.

C – izpuščaji neposredno anteriorno od nosnic, vzporedno z usti. Pri odraslih kontrolnih samcih so običajno povečani ali izraziti. Pri manj razvitih samcih ali samicah, tretiranih z androgenom, so prisotni ali povečani.

D – izpuščaji vzporedno z ustno linijo. Pri kontrolnih samcih so običajno ocenjeni kot razviti. Pri kontrolnih samicah niso prisotni, vendar so prisotni pri samicah, izpostavljenih androgenom.

E – izpuščaji na spodnji čeljusti, blizu ust, so običajno majhni in pogosto v parih. Pri kontrolnih ali tretiranih samcih in tretiranih samicah se razlikujejo.

F – izpuščaji, locirani ventralno od E. Pogosto so majhni in v parih. Prisotni so pri kontrolnih samcih in samicah, izpostavljenih androgenom.

Viri

- (1) Ankley, G. T., Jensen, K. M., Kahl, M. D., Korte, J. J., Makynen, M. E. (2001). Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem*, št. 20: 1276–1290.
- (2) Ankley, G. T., Jensen, K. M., Makynen, E. A., Kahl, M. D., Korte, J. J., Hornung, M. W., Henry, T. R., Denny, J. S., Leino, R. L., Wilson, V. S., Cardon, M. C., Hartig, P. C., Gray, E. L. (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17- β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem*, št. 22: 1350–1360.
- (3) Harries, J. E., Runnalls, T., Hill, E., Harris, C. A., Maddix, S., Sumpter, J. P., Tyler, C. R. (2000). Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem*, št. 34: 3003–3011.

- (4) Jensen, K. M., Korte, J. J., Kahl, M. D., Pasha, M. S., Ankley, G. T. (2001). Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp Biochem Physiol C*, št. 128: 127–141.
- (5) Kahl, M. D., Jensen, K. M., Korte, J. J., Ankley, G. T. (2001). Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol*, št. 59: 515–523.
- (6) Miles-Richardson, S. R., Kramer, V. J., Fitzgerald, S. D., Render, J. A., Yamini, B., Barbee, S. J., Giesy, J. P. (1999). Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol*, št. 47: 129–145.
- (7) Smith, R. J. F. (1974). Effects of 17 α -methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Can J Zool*, št. 52: 1031–1038.

Predloga za izpuščaje:

Oznaka _____

Datum _____

Skupna ocena _____

Številaska ocena

1- prisoten

2- povečan

3- izrazit

	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	X1

Dodatek 5B

OCENA SEKUNDARNIH SPOLNIH ZNAČILNOSTI PRI MEDAKI ZA ZAZNAVANJE NEKATERIH KEMIČALIJ Z ENDOKRINIM DELOVANJEM

V nadaljevanju je naveden opis meritve bradavičastih podaljškov (*), ki so sekundarna spolna značilnost pri medaki (*Oryzias latipes*).

- (1) Po odstranitvi jeter (Dodatek 6) se telo postavi v konično epruveto, ki vsebuje približno 10 ml 10-odstotnega nevtralnega pufranega formalina (glava navzgor in rep navzdol). Če so spolne žleze fiksirane v raztopini, ki ni 10-odstotni nevtralno pufran formalin, se z rezilom naredi prečni rez čez telo med anteriornim območjem predrepne plavuti in anusom, pri čemer je treba paziti, da se ne poškodujejo gonopora in spolne žleze (slika 3). Kranialna stran telesa ribe se vstavi v fiksirno raztopino, da se ohranijo spolne žleze, repna stran telesa ribe pa se vstavi v 10-odstotni nevtralno pufran formalin, kot je opisano zgoraj.
- (2) Ko se telo ribe vstavi v 10-odstotni nevtralno pufran formalin, se anteriorno območje predrepne plavuti prime s pinceto in za približno 30 sekund prepogne, da je predrepna plavut odprta. Pri prijemu predrepne plavuti s pinceto se nekaj plavutnic v anteriornem območju previdno prime, da se bradavičasti podaljški ne opraskajo.
- (3) Ko je predrepna plavut približno 30 sekund odprta, se telo ribe shrani v 10-odstotnem nevtralno pufranem formalinu pri sobni temperaturi do meritve bradavičastih podaljškov (meritev je treba izvesti po vsaj 24-urni fiksaciji).

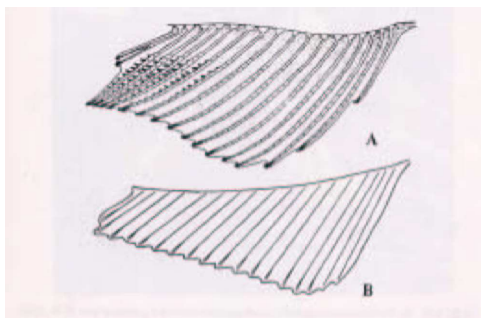
Merjenje

- (1) Po vsaj 24-urni fiksaciji telesa ribe v 10-odstotnem nevtralnem pufranem formalinu se telo ribe vzame iz konične epruvete in formalin obriše s filtrirnim papirjem (ali papirnato brisačo).
- (2) Riba se obrne s trebušno stranjo navzgor. Nato se predrepna plavut previdno odreže z majhnimi secirnimi škarjami (predrepna plavut se po možnosti odreže z nekaj radii (*pterygiophore*)).
- (3) Anteriorni del odrezane predrepne plavuti se prime s pinceto in položi na objektno stekelce z nekaj kapljicami vode. Nato se predrepna plavut prekrije s krovnim stekelcem. Med prijemanjem predrepne plavuti s pinceto je treba paziti, da se bradavičasti podaljški ne opraskajo.
- (4) S števcem se pod biološkim mikroskopom (pokončni mikroskop ali obrnjeni mikroskop) prešteje število ploščic z bradavičastimi podaljški. Bradavičasti podaljški se prepoznajo, če je na posteriornem robu ploščice vidna majhna tvorba podaljškov. Na delovni list se zapiše število ploščic z bradavičastimi podaljški na vsaki plavutnici (npr. prva plavutnica: 0, druga plavutnica: 10, tretja plavutnica: 12 itd.), vsota teh števil po posameznih ribah pa se vnese v Excelovo preglednico. Po potrebi se predrepna plavut fotografira in na fotografiji prešteje število ploščic z bradavičastimi podaljški.
- (5) Po meritvi se predrepna plavut vstavi v konično epruveto, opisano v (1), in shrani.

(*) Bradavičasti podaljški se običajno pojavijo le pri odraslih samcih na plavutnicah, in sicer od druge do sedme ali osme s posteriornega konca predrepne plavuti (sliki 1 in 2). Vendar se podaljški redko pojavijo na prvi plavutnici s posteriornega konca predrepne plavuti. Ta standardni operativni postopek zajema meritev podaljškov na prvi plavutnici (v tem standardnem operativnem postopku se številka plavutnice nanaša na zaporedje od posteriornega konca predrepne plavuti).

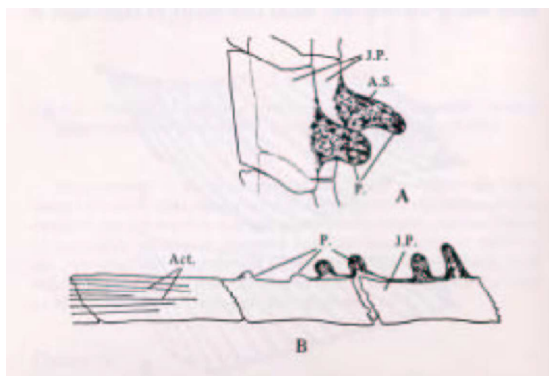
Slika 1

Diagram, na katerem so prikazane razlike v obliki in velikosti predrepne plavuti glede na spol. A: samec, 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., Tokyo Univ., IV, 2: 209–218.



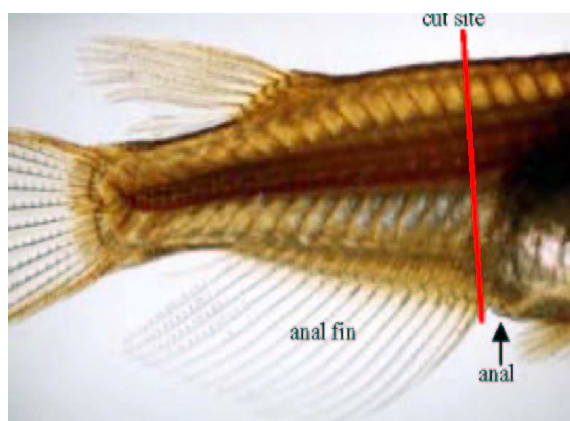
Slika 2

A: podaljški na ploščicah predrepne plavutnice, J.P.: ploščica, A.S.: aksialni prostor, P.: podaljšek, B: distalna okončina plavutnice. Actinotrichia (Act.) so na vrhu. 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., Tokyo Univ., IV, 2: 209–218.



Slika 3

Fotografija telesa ribe, na kateri je prikazana stran reza, če so spolne žleze fiksirane v raztopini za fiksiranje, ki ni 10-odstotni nevtraln pufran formalin. V tem primeru se preostalo telo z rezilom (rdeča) prereže med anteriornim delom predrepne plavuti in anusom, sprednji del ribe se vstavi v raztopino za fiksiranje spolnih žlez, zadnji del ribe pa se vstavi v 10-odstotni nevtraln pufran formalin.



Dodatek 6

PRIPOROČENI POSTOPKI ZA ODVZEM VZORCEV ZA ANALIZO VITELOGENINA

Preprečiti je treba navzkrižno kontaminacijo med vzorci VTG samcev in samic.

Postopek 1A: Črnoglav pisanec, odvzem krvi iz repne vene/arterije

Po anesteziji se repno steblo delno prereže z rezilom skalpela, pri čemer se kri odvzame iz repne vene/arterije s heparinizirano mikrohematokritsko kapilarno cevko. Ko je kri odvzeta, se plazma hitro izolira s 3-minutnim centrifugiranjem pri 15 000 g (ali z 10-minutnim centrifugiranjem pri 15 000 g in 4 °C). Po želji se lahko po centrifugiranju določi odstotek hematokrita. Plazemski del se nato odstrani iz mikrohematokritske cevke in shrani v centrifugalni epruveti z 0,13 enotami aprotinina (zaviralec proteaze) pri –80 °C, dokler ni mogoče določiti VTG. Glede na velikost črnoglavega pisanca (ki je odvisna od spola) se običajno lahko odvzame od 5 do 60 mikrolitrov plazme na ribo (Jensen *et al.* 2001).

Postopek 1B: Črnoglav pisanec, odvzem krvi iz srca

Namesto tega se lahko kri odvzame tudi s srčno punkcijo s heparinizirano brizgo (1 000 enot heparina na ml). Kri se prenese v Eppendorfove epruvete (shranjene na ledu) in nato centrifugira (5 minut, 7 000 g, sobna temperatura). Plazmo je treba prenesti v čiste Eppendorfove epruvete (v alikvotih, če količina plazme to omogoča) in takoj zamrzniti pri –80 °C, dokler se ne analizira (Panter *et al.* 1998).

Postopek 2A: Japonska medaka, odstranitev jeter pri medaki

Odstranitev preskusne ribe iz preskusne komore

- (1) Preskusno ribo je treba iz preskusne komore odstraniti z lovilno mrežico. Paziti je treba, da preskusna riba ne pade v druge preskusne komore.
- (2) Načeloma je treba preskusne ribe odstraniti po naslednjem vrstnem redu: kontrola, kontrola s topilom (kadar je to ustrezno), najnižja koncentracija, srednja koncentracija, najvišja koncentracija in pozitivna kontrola. Poleg tega je treba odstraniti vse samce iz ene preskusne komore, preden se odstranijo preostale samice.
- (3) Spol posamezne preskusne ribe se določi na podlagi zunanjih spolnih značilnosti (npr. oblike predrepne plavuti).
- (4) Preskusna riba se vstavi v posodo za prenos in prenese na delovno postajo za odstranitev jeter. Preveri se, ali so oznake preskusne komore in posode za prenos točne, ter potrdi, da sta število rib, ki so bile odstranjene iz preskusne komore, in število rib, ki ostanejo v preskusni komori, skladni s pričakovanji.
- (5) Če spola ni mogoče določiti na podlagi zunanjega videza rib, se iz preskusne komore odstranijo vse ribe. V tem primeru je treba spol določiti z opazovanjem spolnih žlez ali sekundarnih spolnih značilnosti pod stereomikroskopom.

Odstranitev jeter

- (1) Preskusna riba se iz posode za prenos z lovilno mrežico prenese v raztopino za anestezijo.
- (2) Ko je preskusna riba anestezirana, se s pinceto (za splošno rabo) prenese na filtrirni papir (ali papirnato brisačo). S pinceto se prime glava preskusne ribe, da se prepreči poškodba repa.
- (3) S površine preskusne ribe se s filtrirnim papirjem (ali papirnato brisačo) obriše voda.

- (4) Riba se obrne s trebušno stranjo navzgor. Nato se z majhnimi secirnimi škarjami naredi majhen prečni rez na sredini med ventralnim delom vratu in srednjim trebušnim delom.
- (5) V majhni rez se vstavijo secirne škarje, s katerimi se zareže v trebuh od točke pod škržnim plaščem do kranialne strani anusa po sredini trebuha. Paziti je treba, da se secirne škarje ne vstavijo pregloboko, s čimer se prepreči poškodba jeter in spolnih žlez.
- (6) Pod stereomikroskopom se izvedejo naslednji postopki.
- (7) Preskusna riba se s trebušno stranjo navzgor postavi na papirnato brisačo (pri roki imejte tudi petrijevko ali objektno stekelce).
- (8) Stene trebušne votline se razprejo z natančno pinceto, notranji organi pa se eksteriorizirajo. Po potrebi je sprejemljiva tudi eksteriorizacija notranjih organov z odstranitvijo ene strani stene trebušne votline.
- (9) Z drugo natančno pinceto se izpostavijo jetra in žolčnik. Nato se prime žolčevod in odreže žolčnik. Paziti je treba, da se žolčnik ne poškoduje.
- (10) Na enak način se prime požiralnik in prebavni trakt odreže od jeter. Paziti je treba, da iz prebavnega trakta ne uide vsebina. Odreže se repni prebavni trakt od anusa in odstrani trakt iz trebušne votline.
- (11) Z obrobja jeter se odrežeta masa maščobe in drugo tkivo. Paziti je treba, da se jetra ne opraskajo.
- (12) Z natančno pinceto se prime jetrno portalno polje, jetra pa se odstranijo iz trebušne votline.
- (13) Jetra se položijo na objektno stekelce. Po potrebi se s površine jeter z natančno pinceto odstranita vsa preostala maščoba in nepripadajoče tkivo (npr. trebušna mrena).
- (14) Teža jeter se izmeri s tarirano 1,5-mililitrsko mikroepreveto z uporabo elektronske analitske tehtnice. Vrednost se zapiše na delovni list (na 0,1 mg natančno). Potrdijo se identifikacijski podatki na nalepki mikroeprevete.
- (15) Pokrov mikroeprevete z jetri se zapre. Shrani se na rešetki za hlajenje (ali rešetki za zamrzovanje).
- (16) Po odstranitvi enih jeter se instrumenti za seciranje očistijo ali nadomestijo s čistimi.
- (17) Jetra se iz vseh rib v posodi za prenos odstranijo, kot je opisano zgoraj.
- (18) Ko se jetra odstranijo iz vseh rib v posodi za prenos (tj. vseh samcev ali samic v preskusni komori), se vsi vzorci jeter postavijo na stojalo za epruvete z identifikacijsko nalepko in shranijo v zamrzovalniku. Če se jetra donirajo za predhodno tretiranje kmalu po odstranitvi, se vzorci prenesejo na naslednjo delovno postajo na hladilnem (ali zamrzovalnem stojalu).

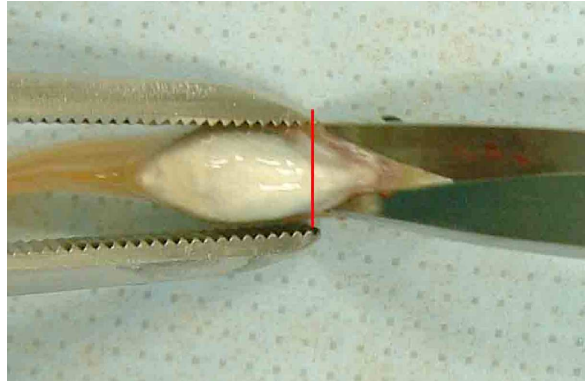
Po odstranitvi jeter je telo ribe na voljo za histologijo spolnih žlez in meritev sekundarnih spolnih značilnosti.

Vzorec

Vzorci jeter, odvzeti pri preskusnih ribah, se shranijo pri ≤ -70 °C, če se ne uporabijo za predhodno tretiranje kmalu po odstranitvi.

Slika 1

Rez se naredi s škarjami neposredno anteriorno od prsne plavuti.



Slika 2

Po sredinski črti trebuha se s škarjami zareže do točke, ki se nahaja približno 2 mm kranialno od anusa.

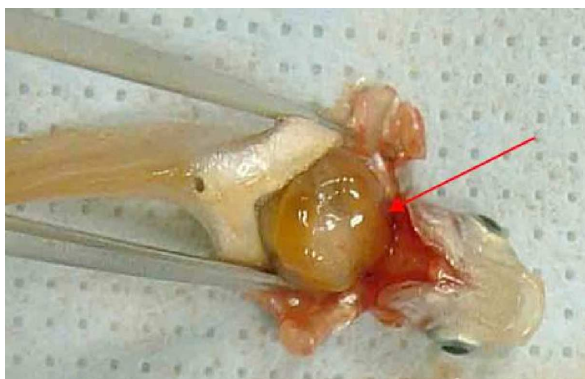


Slika 3

Trebušne stene se razširijo s prijemalkami, da se izpostavijo jetra in drugi notranji organi.

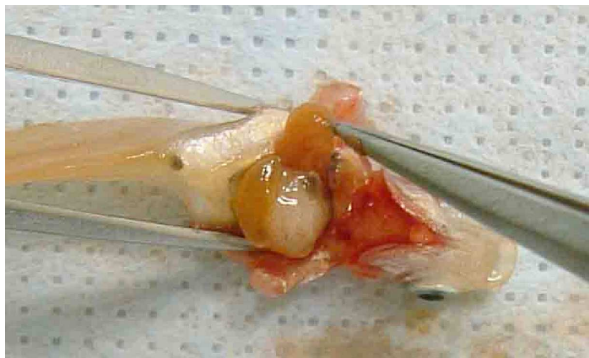
(Namesto tega se lahko trebušne stene pripnejo s strani.)

Jetra so označena s puščico.



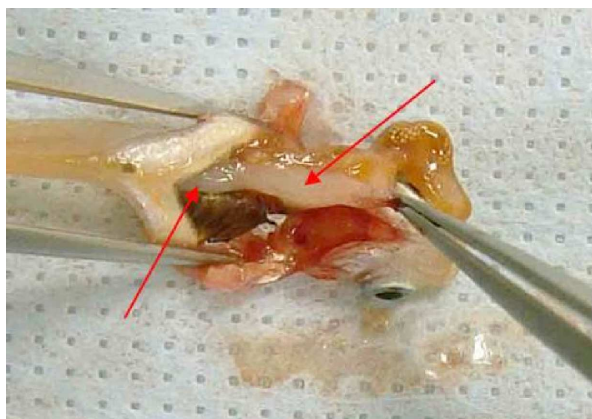
Slika 4

Jetra se secirajo in odstranijo s prijemalkami.



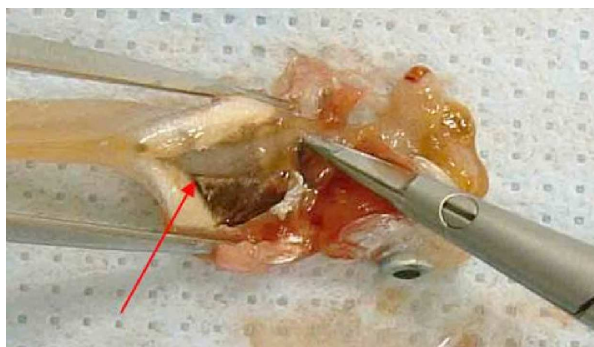
Slika 5

Črevesje se s prijemalkami nežno odmakne.



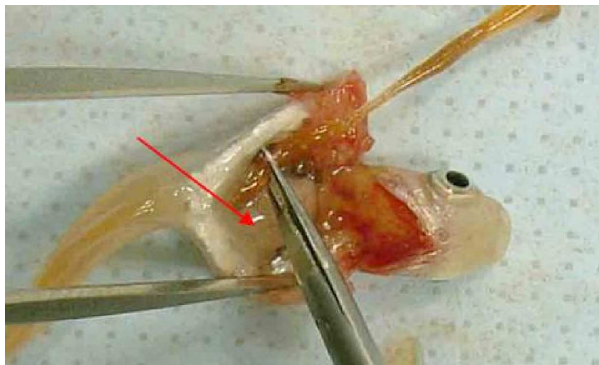
Slika 6

Oba konca črevesja in vse pritrditve mezenterija se odrežejo s škarjami.



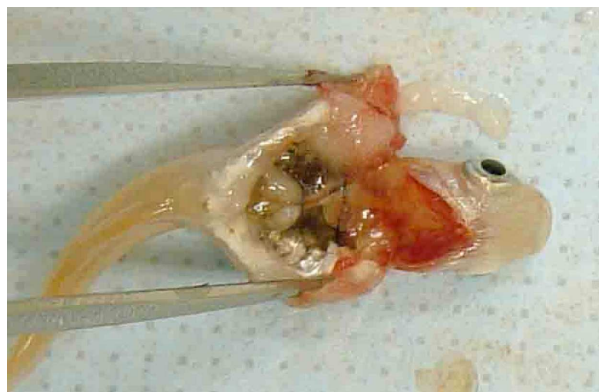
Slika 7 (samica)

Postopek za samico je enak.



Slika 8

Končan postopek.



Postopek 2B: Japonska medaka (*Oryzias latipes*), predhodno tretiranje jeter za analizo vitelogenina

Iz kompleta za metodo ELISA se vzame steklenica homogenizacijskega pufra in ohladi z zdrobljenim ledom (temperatura raztopine: $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Če se uporabi homogenizacijski pufer iz sistema EnBio ELISA, se raztopina odtaja pri sobni temperaturi, nato pa se steklenica ohladi z zdrobljenim ledom.

Količina homogenizacijskega pufra za jetra se izračuna na podlagi njihove teže (doda se 50 μl homogenizacijskega pufra na miligram teže jeter). Če jetra tehtajo na primer 4,5 mg, je količina homogenizacijskega pufra za jetra 225 μl . Za vsa jetra se pripravi seznam s količinami homogenizacijskega pufra.

Priprava jeter za predhodno tretiranje

- (1) Neposredno pred predhodnim tretiranjem se iz zamrzovalnika vzame 1,5-mililitrska mikropruveta z jetri.
- (2) Jetra samcev je treba predhodno tretirati pred jetri samic, da se prepreči kontaminacija z vitelogeninom. Poleg tega je treba preskusne skupine predhodno tretirati po naslednjem vrstnem redu: kontrola, kontrola s topilom (kadar je to ustrezno), najnižja koncentracija, srednja koncentracija, najvišja koncentracija in pozitivna kontrola.

- (3) Število 1,5-mililitrskih mikropruвет z vzorci jeter, vzetih iz zamrzovalnika ob danem času, ne sme preseгati števila, ki se lahko centrifugira hkrati.
- (4) Na zamrzovalnem stojalu se 1,5-mililitrske mikropruветe z vzorci jeter razporedijo glede na številko vzorca (jeter ni treba odtajati).

Izvedba predhodnega tretiranja

1) Dodajanje homogenizacijskega pufra

Na seznamu se preveri količina homogenizacijskega pufra, ki ga je treba uporabiti za posamezen vzorec jeter, mikropipeta pa se nastavi (območje količine: 100–1 000 μ l) na ustrezno količino. Na mikropipeto se namesti čista konica.

Homogenizacijski pufer se vzame iz steklenice za reagent in doda v 1,5-mililitrsko mikropruветo z jetri.

Homogenizacijski pufer se doda v vse 1,5-mililitrske mikropruветe z jetri v skladu z zgoraj opisanim postopkom. Konice mikropipete ni treba zamenjati z novo. Če je konica kontaminirana ali bi lahko bila kontaminirana, jo je treba zamenjati.

2) Homogenizacija jeter

- Na homogenizator mikropruветe se namesti novo pestilo.
- Pestilo se vstavi v 1,5-mililitrsko mikropruветo. Homogenizator mikropruветe se drži tako, da stisne jetra med površino pestila in notranjo steno 1,5-mililitrske mikropruветe.
- Homogenizator mikropruветe mora delovati od 10 do 20 sekund. Med delovanjem se 1,5-mililitrska mikropruветa ohlaja z zdrobljenim ledom.
- Pestilo se dvigne iz 1,5-mililitrske mikropruветe in približno 10 sekund pusti počivati. Nato se izvede vizualni pregled stanja suspenzije.
- Če se v suspenziji opazijo deli jeter, se ponovita koraka (3) in (4), da se pripravi zadovoljiv homogenat jeter.
- Suspendirani homogenat jeter se do centrifugiranja hladi na zamrzovalnem stojalu.
- Za vsak homogenat se pestilo zamenja z novim.
- Vsa jetra se homogenizirajo s homogenizacijskim pufrom v skladu z zgoraj opisanim postopkom.

3) Centrifugiranje suspendiranega homogenata jeter

- Temperatura ohlajene komore za centrifugiranje se potrdi pri ≤ 5 °C.
- V ohlajeno centrifugo se vstavijo 1,5-mililitrske mikropruветe s suspendiranim homogenatom jeter (po potrebi se prilagodi ravnotežje).
- Suspendirani homogenat jeter se 10 minut centrifugira pri 13 000 g in ≤ 5 °C. Če so supernatanti ustrezno ločeni, se lahko centrifugalna sila in čas centrifugiranja po potrebi prilagodita.
- Po centrifugiranju se preveri, ali so supernatanti ustrezno ločeni (vrhnja plast: lipid, srednja plast: supernatant, spodnja plast: jetrno tkivo). Če ločitev ni ustrezna, se suspenzija ponovno centrifugira v enakih pogojih.
- Vsi vzorci se odstranijo iz ohlajene centrifuge in na zamrzovalnem stojalu razvrstijo glede na številko vzorca. Paziti je treba, da se ločene plasti po centrifugiranju ne suspendirajo ponovno.

4) Odvzemanje supernatanta

- Štiri 0,5-mililitrske mikropruvete za shranjevanje supernatanta se položijo na stojalo za epruvete.
- Z mikropipeto se odvzame 30 µl vsakega supernatanta (ločenega kot srednja plast) in prenese v eno 0,5-mililitrsko mikropruveto. Paziti je treba, da se ne odvzame lipid z vrhnje plasti ali jetrno tkivo s spodnje plasti.
- Supernatant se odvzame in prenese v drugi dve 0,5-mililitrski mikropruveti na enak način, kot je opisano zgoraj.
- Z mikropipeto se odvzame preostali supernatant (če je mogoče: ≥ 100 µl). Nato se supernatant prenese v preostalo 0,5-mililitrsko mikropruveto. Paziti je treba, da se ne odvzame lipid z vrhnje plasti ali jetrno tkivo s spodnje plasti.
- Pokrov 0,5-mililitrske mikropruvete se zapre in na nalepko zapiše količina supernatanta. Takoj zatem se mikropruvete ohladijo na zamrzovalnem stojalu.
- Za vsak supernatant se konica mikropipete zamenja z novo. Če se na konico prime veliko lipida, se takoj zamenja z novo, da se prepreči kontaminacija ekstrakta jeter z maščobo.
- Ves centrifugirani supernatant se prenese v štiri 0,5-mililitrske mikropruvete v skladu z zgoraj opisanim postopkom.
- Ko se supernatant prenese v 0,5-mililitrske mikropruvete, se te postavijo na stojalo za epruvete z identifikacijskimi nalepkami in takoj nato zamrznejo v zamrzovalniku. Če se koncentracije VTG merijo takoj po predhodnem tretiranju, se ena 0,5-mililitrska mikropruveta (ki vsebuje 30 µl supernatanta) ohrani hladna na stojalu za epruvete in prenese na delovno postajo, kjer se izvaja ELISA. V takem primeru se preostale mikropruvete postavijo na rešetke za epruvete in zamrznejo v zamrzovalniku.
- Po odvzemu supernatanta se ostanki primerno zavržejo.

Shranjevanje vzorcev

Dokler se 0,5-mililitrske mikropruvete s supernatantom homogenata jeter ne uporabijo za ELISA, se shranijo pri ≤ -70 °C.

Postopek 3A: Cebrica, odvzem krvi iz repne vene/arterije

Takoj po anesteziji se repno steblo prečno prereže in odvzame kri iz repne arterije/vene s heparinizirano mikrohematokritsko kapilarno cevko. Količine krvi so v območju 5–15 mikrolitrov in so odvisne od velikosti ribe. V mikrokapilarno cevko se doda enaka količina pufru aprotinina (6 mikrogramov/ml v PBS), plazma pa se od krvi loči s centrifugiranjem (5 minut pri 600 g). Plazma se zbere v preskusnih epruvetah in shrani pri -20 °C, dokler se ne analizira za VTG ali druge zelene beljakovine.

Postopek 3B: Cebrica, odvzem krvi s punkcijo srca

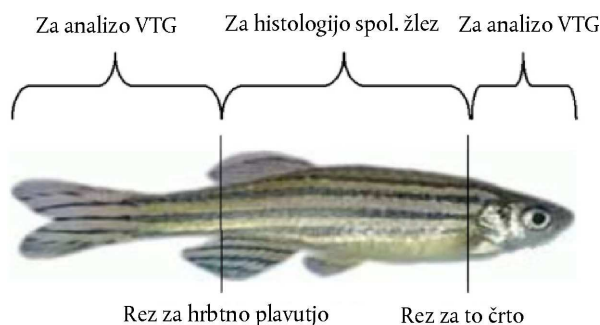
Da se preprečita koagulacija krvi in razgradnja beljakovin, se vzorci odvzamejo v fosfatnem pufru s soljo (PBS), ki vsebuje heparin (1 000 enot/ml) in aprotinin, ki zavira proteazo (2 TIU/ml). Za sestavine pufru se priporočajo heparin, amonijeva sol in liofilizirani aprotinin. Za vzorčenje krvi se priporoča brizga (1 ml) s pritrieno tanko iglo (npr. Braun Omnikan-F). Brizga mora biti predhodno napolnjena s pufrom (približno 100 mikrolitrov), da se iz vseh rib v celoti eluirajo majhne količine krvi. Vzorci krvi se odvzamejo s punkcijo srca. Najprej je treba ribe anestezirati z MS-222 (100 mg/l). Ustrezna stopnja anestezije uporabniku omogoča, da razloči srčni utrip cebrice. Med punkcijo srca naj bo bat brizge pod rahlo napetostjo. Odvzeta količina krvi je v območju 20–40 mikrolitrov. Po srčni punkciji je treba zmes krvi in pufru prenesti v preskusno epruveto. Plazma se od krvi loči s centrifugiranjem (20 minut, 5 000 g) in jo je treba shraniti pri -80 °C, dokler se ne potrebuje za analizo.

Postopek 3C SOP: cebrica, homogenizacija glave in repa

1. Ribe se anestezirajo in evtanazirajo v skladu z opisom preskusa.
2. Glava in rep ribe se odrežeta v skladu s sliko 1.

Opozorilo: med ravnanji s posameznimi ribami je treba vse instrumente za seciranje in rezalno desko sprati in ustrezno očistiti (npr. s 96-odstotnim etanolom), da se prepreči kontaminacija neinduciranih samcev z vitelogeninom zaradi samic ali induciranih samcev.

Slika 1



3. Teža zbranih glav in repov posameznih rib se izmeri na miligram natančno.
4. Po tehtanju se deli vnesejo v ustrezne epruvete (npr. 1,5-mililitrske Eppendorfove epruvete) in zamrznejo pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do homogenizacije oziroma dokler se ne homogenizirajo neposredno na ledu z dvema plastičnima pestiloma. (Druge metode se lahko uporabijo, če se izvajajo na ledu in zagotovijo homogeno maso.) Opozorilo: epruvete je treba ustrezno oštevilčiti, da se lahko glava in rep ribe povežeta z ustreznim delom telesa, uporabljenim za histologijo spolnih žlez.
5. Ko dobimo homogeno maso, se ji doda 4-kratna teža tkiva ledeno mrzlega **homogenizacijskega puфра** (*). Delo s pestiloma je treba nadaljevati, dokler zmes ni homogena. Opozorilo: za vsako ribo se uporabita novi pestili.
6. Vzorci se postavijo na led do začetka centrifugiranja pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $50\ 000\text{ g}$ za 30 minut.
7. S pipeto se supernatant odmeri na dele po $20\ \mu\text{l}$ v **vsaj dve** epruveti, tako da se konica pipete potopi pod plast maščobe na površini in supernatant previdno izsesa brez delcev maščobe ali peletov.
8. Epruvete se do uporabe hranijo pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

(*) Homogenizacijski pufr:

- (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1-odstotna zmes zaviralca proteaze (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 μl zmesi zaviralca proteaze.
 - TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), npr. Bie & Berntsen, Danska.
 - Zmes zaviralca proteaze: Sigma (za tkivo sesalcev), številka izdelka P 8340.
- OPOMBA: homogenizacijski pufr je treba uporabiti na dan priprave. Med uporabo ga je treba postaviti na led.

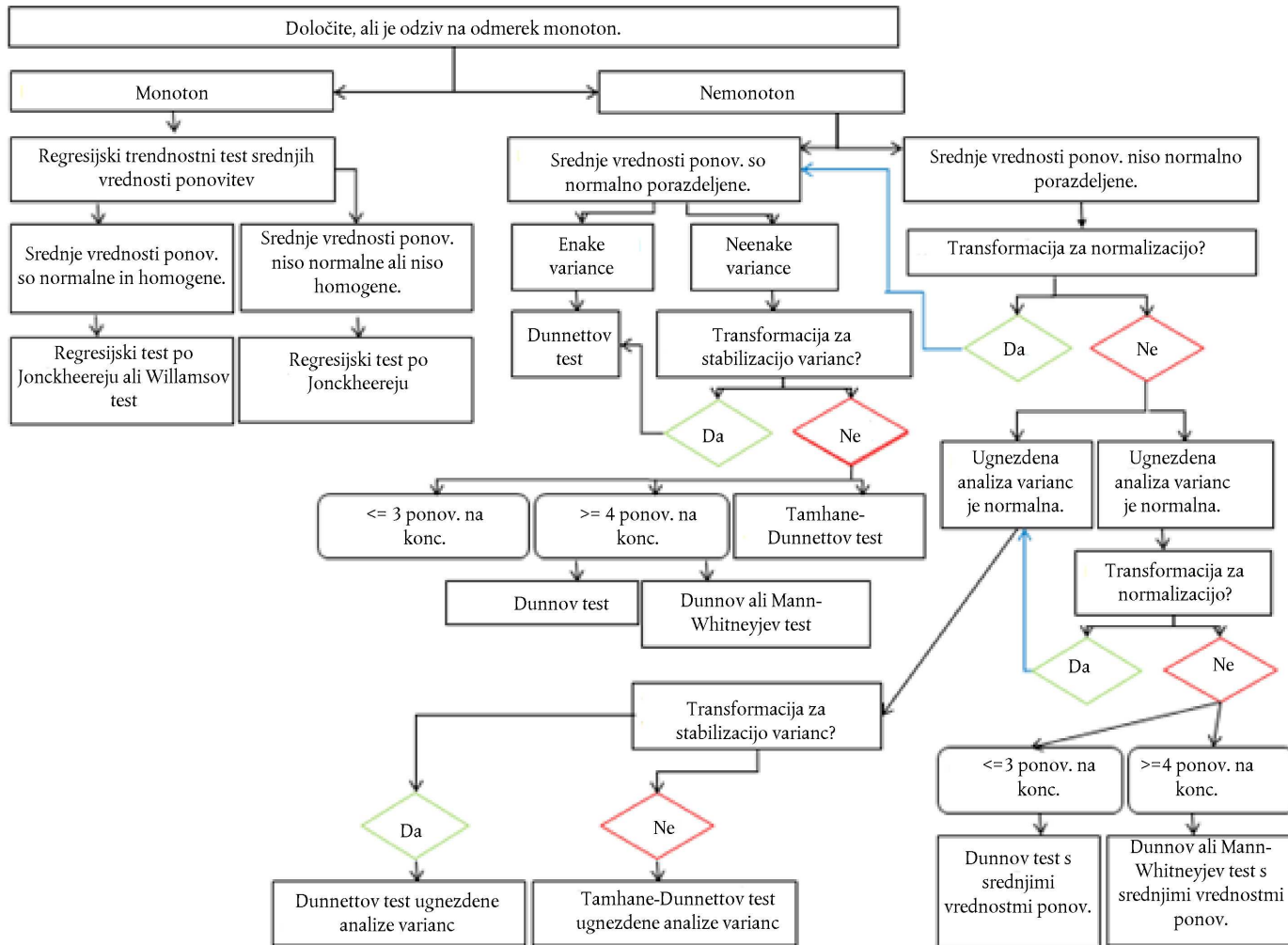
*Dodatek 7***OBOGATENI VZORCI VITELOGENINA IN MEDPRESKUSNI REFERENČNI STANDARD**

Vsak dan izvedbe preskusov VTG se analizira obogateni vzorec, pripravljen z medpreskusnim referenčnim standardom. VTG, uporabljen za pripravo medpreskusnega referenčnega standarda, je iz serije, ki se razlikuje od serije, uporabljene za pripravo kalibracijskih standardov za preskus, ki se izvaja.

Obogateni vzorec se pripravi z dodajanjem znane količine medpreskusnega standarda vzorcu plazme kontrolnih samcev. Vzorec se obogati, da se doseže koncentracija VTG, ki je med 10- in 100-krat večja od pričakovane koncentracije vitelogenina pri kontrolnih ribjih samcih. Vzorec plazme kontrolnih samcev, ki se obogati, lahko izvira iz ene ribe ali pa je sestavljen iz več rib.

Podvzorec neobogatene plazme kontrolnih samcev se analizira v vsaj dveh podvojenih jamicah. Tudi obogateni vzorec se analizira v vsaj dveh podvojenih jamicah. Srednja količina vitelogenina v dveh neobogatenih vzorcih plazme kontrolnih samcev se prišteje izračunani količini VTG, dodanega obogatenim vzorcem, da se določi pričakovana koncentracija. Razmerje med pričakovano koncentracijo in izmerjeno koncentracijo se sporoči skupaj z rezultati posameznih nizov preskusov, izvedenih na isti dan.

DIAGRAM POTEKA ZA IZBIRO STATISTIČNE ANALIZE



C.49 Preskus akutne toksičnosti ribjega zarodka

UVOD

1. Ta preskusna metoda (TM) je enakovredna Smernici za preskušanje OECD (TG) 236 (2013). Opisuje preskus akutne toksičnosti ribjega zarodka pri cebrici (*Danio rerio*). Preskus je zasnovan tako, da se ugotovi akutna toksičnost kemikalij na embrionalnih fazah rib. Preskus akutne toksičnosti ribjega zarodka temelji na študijah in dejavnostih validacije, opravljenih na cebrici (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14). Preskus akutne toksičnosti se uspešno uporablja pri številnih kemikalijah z različnimi načini delovanja, topnostjo, hlapnostjo in hidrofobnostjo (njihov pregled je na voljo v virih 15 in 16).
2. Pojmi, uporabljeni pri tej preskusni metodi, so opredeljeni v Dodatku 1.

NAČELO PRESKUSA

3. Pravkar oplojene ike cebric se za 96 ur izpostavijo preskusni kemikaliji. Vsakih 24 ur se kot indikatorji smrtnosti (6) zabeležijo do štiri opažanja na višjem nivoju biološke organizacije, in sicer (i) koagulacija oplojenih iker, (ii) odsotnost oblikovanja somitov, (iii) odsotnost ločenosti repa od vrečice rumenjaka in (iv) odsotnost srčnega utripa. Na koncu obdobja izpostavljenosti se akutna toksičnost določi na podlagi pozitivnega rezultata pri katerem koli od štirih opažanj na višjem nivoju biološke organizacije in izračuna se LC_{50} .

ZAČETNI PREUDARKI

4. Med uporabne informacije o specifičnih lastnostih snovi spadajo strukturna formula, molekulska masa, čistost, obstojnost v vodi in na svetlobi, pK_a in K_{ow} , topnost v vodi, parni tlak in rezultati preskusa za lahko biološko razgradljivost (TM C.4 (17) ali TM C.29 (18)). Topnost in parni tlak se lahko uporabita za izračun Henryjeve konstante, ki pokaže, ali so verjetne izgube zaradi izhlapevanja preskusne kemikalije. Na voljo mora biti zanesljiva analitska metoda za kvantifikacijo snovi v testnih raztopinah z znano in izpričano točnostjo ter mejo zaznavnosti.
5. Če se preskusna metoda uporablja za preskušanje zmesi, mora biti njena sestava v čim večji meri opredeljena s kemijsko identiteto sestavin, kvantitativnim pojavljanjem in specifičnimi lastnostmi snovi (glej odstavek 4). Pred uporabo preskusne metode za regulativno preskušanje zmesi je treba proučiti, ali bo zagotovila sprejemljive rezultate za predvideni regulativni namen.
6. Obstajajo dokazi, da imajo zarodki cebric zmožnost biotransformacije za snovi, ki se lahko aktivirajo s presnovo (19) (20) (21) (22). Vendar presnovna zmogljivost zarodka ribe ni vedno podobna presnovni zmogljivosti mladic ali odraslih rib. Pri preskusu akutne toksičnosti na primer ni bil odkrit protoksični alil alkohol (9). Če torej obstajajo kakršni koli znaki, da so lahko metaboliti ali drugi pomembni produkti pretvorbe bolj strupeni kot izhodiščna spojina, se priporoča tudi, da se preskus izvede s temi metaboliti/ produkti pretvorbe in da se tudi ti rezultati uporabijo pri ugotavljanju toksičnosti preskusne kemikalije ali pa da se opravi še en preskus, ki v večji meri upošteva presnovo.
7. Pri snoveh z molekulsko maso ≥ 3 kDa in zelo veliko molekulsko strukturo ter snoveh, ki povzročajo poznejšo izvalitev, kar bi lahko preprečilo ali zmanjšalo izpostavljenost po izvalitvi, se pričakuje, da zarodki ne bodo občutljivi zaradi omejene biološke dostopnosti snovi, zato bi lahko bili primernejši drugi preskusi toksičnosti.

VELJAVNOST PRESKUSA

8. Za veljavnost rezultatov preskusa morajo biti izpolnjena naslednja merila:
 - a) Skupna stopnja oplojenosti vseh zbranih iker mora v vsaki seriji, ki se preskuša, znašati ≥ 70 %.

- b) Temperatura vode v preskusnih komorah med preskusom nikoli ne sme biti višja ali nižja od $26\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.
- c) Skupaj mora v negativni kontroli (z vodo za redčenje) ali kontroli s topilom, kadar je to primerno, do zaključka 96-urne izpostavljenosti preživeti $\geq 90\%$ zarodkov.
- d) Izpostavljenost pozitivni kontroli (npr. 4,0 mg/l 3,4-dikloroanilina pri cebricah) mora ob zaključku 96-urne izpostavljenosti povzročiti najmanj 30-odstotno umrljivost.
- e) Odstotek izvalitve v negativni kontroli (in kontroli s topilom, kadar je to primerno) mora ob zaključku 96-urne izpostavljenosti znašati $\geq 80\%$.
- f) Ob zaključku 96-urne izpostavljenosti morata koncentracija raztopljenega kisika v negativni kontroli in najvišja preskusna koncentracija znašati $\geq 80\%$ nasičenosti.

OPIS METODE

9. Pregled priporočenega vzdrževanja in preskusnih pogojev je na voljo v Dodatku 2.

Oprema

10. Potrebna je naslednja oprema:

- a) akvariji iz kemijsko inertnih materialov (npr. stekleni) in primerne prostornine glede na priporočeno obremenitev (glej odstavek 14 „Vzdrževanje plemenskih rib“);
- b) obrnjeni mikroskop in/ali binokularni mikroskop z zmogljivostjo vsaj 80-kratne povečave. Če temperature prostora, ki se uporablja za beleženje opažanj, ni mogoče nastaviti na $26\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, je treba zagotoviti križno mizico z uravnavanjem temperature ali druge metode za vzdrževanje temperature;
- c) preskusne komore, npr. standardne plošče s 24 jamicami, globokimi približno 20 mm (glej odstavek 11 „Preskusne komore“);
- d) npr. samolepilna folija za prekrivanje plošč s 24 jamicami;
- e) inkubator ali klimatiziran prostor z nadzorovano temperaturo, ki omogoča vzdrževanje $26\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ v jamicah (ali preskusnih komorah);
- f) merilnik vrednosti pH;
- g) oksimeter;
- h) oprema za določanje trdote vode in prevodnosti;
- i) lovilna posoda za ike: pladnji iz stekla, nerjavnega rekla ali drugih inertnih materialov z žičnato mrežo (velikost rešetk $2\text{ mm} \pm 0,5\text{ mm}$) iz nerjavnega jekla ali drugega inertnega materiala, da se zaščitijo odložene ike, in substrat za drstenje (npr. imitacije rastlin iz inertnih materialov) (TM C.48, Dodatek 4a (23));
- j) pipete s širšimi odprtini za zbiranje iker;
- k) steklene posode za pripravo različnih preskusnih koncentracij in vode za redčenje (čase, merilne bučke, merilni valji in polnilne pipete) ali za zbiranje iker cebrice (npr. čase, kristalizirke);
- l) če se za izvajanje preskusa uporabijo nadomestni sistemi izpostavljenosti, kot je na primer pretočni preskus (24) ali pasivno odmerjanje (25), je treba zagotoviti ustrezne prostore in opremo.

Preskusne komore

11. Uporabiti je treba steklene preskusne komore ali preskusne komore iz polistirena (npr. plošče s 24 jamicami, v vsako jamico pa se lahko natoči 2,5–5 ml tekočine). Če obstaja sum adsorpcije v polistiren (npr. pri nepolarnih, planarnih snoveh z visokim K_{ow}), je treba uporabiti inertne materiale (steklo), da se zmanjšajo izgube zaradi adsorpcije (26). Preskusne komore je treba naključno postaviti v inkubator.

Voda in preskusni pogoji

12. Priporočljivo je razredčiti vodo za vzdrževanje, da se dosežejo ravni trdote, ki so običajne za številne površinske vode. Vodo za redčenje je treba pripraviti iz modelne razredčevalne vode (27). Nastala stopnja trdote mora znašati 100–300 mg/l $CaCO_3$, da se prepreči presežno obarjanje kalcijevega karbonata. Uporabi se lahko tudi druga površinska voda z značilnostmi vode iz vodnjaka ali voda iz vodnjaka. Modelna razredčevalna voda se lahko prilagodi vodi za vzdrževanje nizke trdote tako, da se z deionizirano vodo razredči do razmerja 1: 5 na najmanjšo trdoto 30–35 mg/l $CaCO_3$. Pred dodajanjem preskusne kemikalije se voda prezračí do nasičenosti s kisikom. Med preskusom je treba v jamicah ohranjati temperaturo $26 \pm 1^\circ C$. Med preskusom mora biti vrednost pH med 6,5 in 8,5, znotraj tega območja pa se ne sme razlikovati za več kot 1,5 enote. Če se pričakuje, da vrednost pH ne bo ostala v tem območju, jo je treba prilagoditi pred začetkom preskusa. Prilagoditev vrednosti pH je treba opraviti tako, da se koncentracija osnovne raztopine ne spremeni bistveno in da se ne povzroči kemijska reakcija ali obarjanje preskusne kemikalije. Priporoča se, da se za popraviljanje vrednosti pH v raztopinah, ki vsebujejo preskusno kemikalijo, uporabita klorovodik (HCl) in natrijev hidroksid (NaOH).

Testne raztopine

13. Testne raztopine izbranih koncentracij se lahko pripravijo na primer z razredčitvijo osnovne raztopine. Najbolje je, če se osnovne raztopine pripravijo preprosto z mešanjem ali stresanjem preskusne kemikalije v vodi za redčenje z mehanskimi sredstvi (npr. z mešanjem in/ali ultrazvočno kopeljo). Če se preskusna kemikalija v vodi težko raztopi, je treba upoštevati postopke, opisane v Smernicah OECD št. 23 za ravnanje z zahtevnimi snovmi in zmesmi (28). Izogibati se je treba uporabi topil, vendar je v nekaterih primerih morda potrebna, da se pripravi primerno koncentrirana osnovna raztopina. Če se pri pripravi osnovne raztopine kot pomoč uporabi topilo, njegova končna koncentracija ne sme biti večja od 100 $\mu l/l$ in mora biti enaka v vseh preskusnih posodah. Če se uporabi topilo, je potrebna dodatna kontrola s topilom.

Vzdrževanje plemenskih rib

14. Za proizvodnjo iker se uporabi matična jata neizpostavljenih divjih cebric z dobro dokumentirano stopnjo oplojenosti iker. Ribe ne smejo imeti makroskopsko opaznih simptomov okužbe ali bolezni, dva meseca pred drstenjem pa se ne smejo (akutno ali preventivno) zdraviti z zdravilom. Matične ribe se hranijo v akvarijih s priporočeno prostornino 1 l vode na ribo in določenim 12–16-urnim obdobjem osvetljenosti (29) (30) (31) (32) (33). Prilagoditi je treba optimalne stopnje filtracije in ne smejo se uporabljati prevelike stopnje filtracije, ki zelo vznemirjajo vodo. Za pogoje hranjenja glej Dodatek 2. Izogibati se je treba prekomernemu hranjenju in redno spremljati kakovost vode in čistočo akvarijev, po potrebi pa jih je treba znova vrniti v začetno stanje.

Preverjanje usposobljenosti

15. Kot referenčno kemikalijo je treba v celotnem območju odziva na koncentracijo preskusiti 3,4-dikloroanilin (uporablja se v validacijskih študijah (1) (2)), da se preveri občutljivost uporabljene vrste rib, in sicer po možnosti dvakrat na leto. Laboratoriji, ki ta preskus izvajajo prvič, morajo uporabiti referenčno kemikalijo. Laboratoriji lahko uporabijo to kemikalijo, da dokažejo, da so tehnično usposobljeni za izvajanje tega preskusa, preden podatke predložijo v regulativne namene.

Proizvajanje iker

16. Ikre cebric lahko proizvedejo drsteče jate (v posameznih akvarijih za drstenje) ali pa se proizvedejo z množičnim drstenjem (v akvarijih za vzdrževanje). V primeru drstečih jat se samci in samice (npr. v razmerju 2: 1) iz matične jate dajo v akvarije za drstenje nekaj ur pred stemnitvijo na dan pred preskusom. Ker se lahko zgodi, da se drsteče jate cebric občasno ne drstijo, se priporoča istočasna uporaba vsaj treh akvarijev za drstenje. Da se izogne genetskimi vplivom, se ikre odvzamejo pri vsaj treh matičnih jatah, premešajo in naključno izberejo.
17. Za odvzem iker se v akvarije za drstenje ali akvarije za vzdrževanje pred stemnitvijo na dan pred preskusom ali pred svitvom na dan preskusa namestijo lovilne posode za ikre. Da se odraslim cebricam prepreči plenjenje iker, se lovilne posode za ikre prekrijejo z inertno žičnato mrežo z ustrežno velikostjo rešetk (približno $2 \text{ mm} \pm 0,5 \text{ mm}$). Po potrebi se lahko na mrežo pritrdijo umetne rastline iz inertnega materiala (npr. iz plastike ali stekla) za spodbujanje drstenja (3) (4) (5) (23) (35). Uporabiti je treba plastične materiale, izpostavljene vremenskim vplivom, ki se ne lužijo (npr. ftalate). Parjenje, drstenje in oploditev se začnejo v 30 minutah po svitu in lovilne posode za ikre z odvzetimi ikrami se lahko previdno odstranijo. Priporoča se, da se ikre po odstranitvi iz lovilnih posod za ikre sperejo z modelno razredčevalno vodo.

Diferenciacija iker

18. Pri $26 \text{ }^{\circ}\text{C}$ oplojene ikre po približno 15 minutah prestanejo prvo brazdanje in z zaporednimi sinhronimi brazdanji se oblikuje 4, 8, 16 in 32 celičnih blastomer (glej Dodatek 3) (35). V teh fazah se lahko oplojene ikre zlahka opredelijo, saj se razvije blastula.

POSTOPEK

Pogoji izpostavljenosti

19. Preskusni kemikaliji je izpostavljenih dvajset zarodkov na posamezno koncentracijo (en zarodek na jamico). Izpostavljenost mora biti taka, da se med preskusom ohrani $\pm 20 \%$ nominalne koncentracije kemikalije. Če to v statičnem sistemu ni mogoče, je treba uporabiti obvladljiv polstatičen interval zamenjave (npr. zamenjava vsakih 24 ur). V teh primerih je treba koncentracije izpostavljenosti preveriti vsaj pri najvišji in najnižji preskusni koncentraciji na začetku in na koncu vsakega intervala izpostavljenosti (glej odstavke 36). Če koncentracije izpostavljenosti v višini $\pm 20 \%$ nominalnih koncentracij ni mogoče ohraniti, je treba vse koncentracije izmeriti na začetku in na koncu vsakega intervala izpostavljenosti (glej odstavke 36). Ob zamenjavi vode je treba zagotoviti, da so zarodki prekriti z majhno količino starih testnih raztopin, da se ne izsušijo. Načrt preskusa se lahko prilagodi, da se izpolnijo zahteve preskušanja specifičnih snovi (npr. pretočnega preskušanja (24) ali sistemov pasivnega odmerjanja (25) za lahko razgradljive ali zelo adsorptivne snovi (29) ali drugih preskušanj za hlapne snovi (36) (37)). V vsakem primeru je treba paziti, da so zarodki pod čim manjšim stresom. Preskusne komore je treba pred začetkom preskusa vsaj 24 ur kondicionirati s testnimi raztopinami. Preskusni pogoji so povzeti v Dodatku 2.

Preskusne koncentracije

20. Običajno je potrebnih pet koncentracij preskusne kemikalije, ki se med seboj razlikujejo za konstantni faktor, ki ni večji od 2,2, da se izpolnijo statistične zahteve. Če se uporabi manj kot pet koncentracij, je treba to utemeljiti. Najbolje je, če najvišja preskusna koncentracija povzroči 100 % smrtnost, najnižja preskusna koncentracija pa ne bi smela imeti opaznega učinka, kot je opredeljeno v odstavku 28. Preskus za določanje območja delovanja pred končnim preskusom omogoča, da se izbere ustrezno območje koncentracije. Ta preskus se običajno izvede z desetimi zarodki na posamezno koncentracijo. Navodila v nadaljevanju se nanašajo na izvajanje preskusa na ploščah s 24 jamicami. Če se uporabijo drugačne preskusne komore (npr. majhne petrijevke) ali če se preskuša več koncentracij, je treba navodila ustrezno prilagoditi.

21. Podrobni podatki in slikovna navodila za porazdelitev koncentracij po ploščah s 24 jamicami so na voljo v odstavku 27 in na sliki 1 v Dodatku 4.

Kontrole

22. Kontrole z vodo za redčenje so potrebne kot negativne kontrole in kot notranje kontrole plošč. Če se pri notranji kontroli plošč opazi več kot en mrtev zarodek, se plošča zavrne, s čimer se zmanjša število koncentracij, uporabljenih za izračun LC_{50} . Če se zavrne celotna plošča, sta ocenjevanje in zaznavanje opaženih učinkov lahko težja, zlasti če je zavrnjena plošča plošča s kontrolo s topilom ali plošča, v kateri so prizadeti tudi tretirani zarodki. V prvem primeru je treba preskus ponoviti. V drugem primeru lahko izguba celotne tretirane skupine zaradi notranje umrljivosti v kontroli omeji zmožnost ocenjevanja učinkov in določanja vrednosti LC_{50} .
23. Pozitivna kontrola pri nespremenljivi koncentraciji 4 mg/l 3,4-dikloroanilina se opravi pri vsaki seriji iker, ki se uporabi za preskušanje.
24. Če se uporabi topilo, se mu izpostavi dodatna skupina 20 zarodkov na ločeni plošči s 24 jamicami kot kontrola s topilom. Preskus se šteje za sprejemljivega, če se dokaže, da topilo nima bistvenih učinkov na čas izvalitve in preživetje ter drugih škodljivih učinkov na zarodke (primerjaj odstavek 8c).

Začetek izpostavljenosti in trajanje preskusa

25. Preskus se začne čim prej po oploditvi iker in konča po 96 urah izpostavljenosti. Pred začetkom brazdanja blastodiska ali najpozneje do faze šestnajstih celic je treba zarodke potopiti v testne raztopine. Da se izpostavljenost začne s čim manjšo zamudo, se naključno izbere vsaj dvakrat večje število iker na posamezno tretirano skupino, ki se prenesejo v zadevne koncentracije in kontrole (npr. v 100 ml kristalizirkah, pri čemer morajo biti ike v celoti prekrte) najpozneje 90 minut po oploditvi.
26. Opljene ike, sposobne preživetja, je treba ločiti od neoplojenih iker in prenesti na plošče s 24 jamicami, ki so se predhodno 24 ur kondicionirale in ki se v 180 minutah po oploditvi ponovno napolnijo z 2 ml/jamico sveže pripravljenih testnih raztopin. S stereomikroskopom (po možnosti z vsaj 30-kratno povečavo) se izberejo opljene ike, pri katerih poteka brazdanje in pri katerih med brazdanjem niso bile odkrite očitne nepravilnosti (npr. nesimetričnost, oblikovanje mešičkov) ali poškodbe horija. Za zbiranje in ločevanje iker glej sliki 1 in 3 v Dodatku 3 ter sliko 2 v Dodatku 4.

Porazdelitev iker po ploščah s 24 jamicami

27. Ike se porazdelijo po ploščah z jamicami v skladu z naslednjimi števili (glej tudi sliko 1 v Dodatku 4):
- 20 iker na eni plošči za vsako preskusno koncentracijo,
 - 20 iker kot kontrola s topilom na eni plošči (po potrebi),
 - 20 iker kot pozitivna kontrola na eni plošči,
 - 4 ike v vodi za redčenje kot notranja kontrola plošč na vsaki zgornji plošči,
 - 24 iker v vodi za redčenje kot negativna kontrola na eni plošči.

Opažanja

28. Opažanja na višjem nivoju biološke organizacije, ki se opravijo pri vsakem preskušanem zarodku, vključujejo koagulacijo zarodkov, odsotnost oblikovanja somitov, odsotnost ločenosti repa in odsotnost srčnega utripa (preglednica 1). Ta opažanja se uporabljajo za ugotavljanje smrtnosti. Morebiten pozitiven rezultat pri enem od navedenih opažanj pomeni, da je zarodek cebrice mrtev. Poleg tega se po 48 urah vsak dan zabeleži izvalitev v tretiranih in kontrolnih skupinah. Opažanja se zabeležijo vsakih 24 ur do konca preskusa.

Preglednica 1

Opažanja na višjem nivoju biološke organizacije v zvezi z akutno toksičnostjo pri zarodkih cebric 24–96 ur po oploditvi.

	Čas izpostavljenosti			
	24 ur	48 ur	72 ur	96 ur
Koagulirani zarodki	+	+	+	+
Odsotnost oblikovanja somitov	+	+	+	+
Odsotnost ločenosti repa	+	+	+	+
Odsotnost srčnega utripa		+	+	+

29. *Koagulacija zarodka*: koagulirani zarodki so mlečno beli in temni pod mikroskopom (glej sliko 1 v Dodatku 5). Število koaguliranih zarodkov se določi po 24, 48, 72 in 96 urah.
30. *Odsotnost oblikovanja somitov*: po 24 urah se pri $26\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ v zarodku cebric, ki se normalno razvija, oblikuje približno 20 somitov (glej sliko 2 v Dodatku 5). Pri normalno razvitem zarodku se opazijo spontani gibi (stransko krčenje). Spontani gibi pomenijo oblikovanje somitov. Odsotnost somitov se zabeleži po 24, 48, 72 in 96 urah. Če se somiti po 24 urah ne oblikujejo, je to lahko posledica splošnega zaostajanja pri razvoju. Najpozneje po 48 urah bi se morali oblikovati somiti. V nasprotnem primeru se zarodki štejejo za mrtve.
31. *Odsotnost ločenosti repa*: v zarodku cebric, ki se normalno razvija, se ločitev repa (glej sliko 3 v Dodatku 5) od rumenjaka opazi po podaljšanju zadnjega dela telesa zarodka. Odsotnost ločenosti repa se zabeleži po 24, 48, 72 in 96 urah.
32. *Odsotnost srčnega utripa*: v zarodku cebric, ki se normalno razvija, je pri $26\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ srčni utrip viden po 48 urah (glej sliko 4 v Dodatku 5). Pri beleženju te končne točke je potrebna posebna previdnost, saj se nepravilen (neenakomeren) srčni utrip *ne sme* zabeležiti kot smrtonosen. Poleg tega se vidni srčni utrip brez obtoka v abdominalni aorti šteje za nesmrtonosnega. Za beleženje te končne točke je treba zarodke, pri katerih ni viden srčni utrip, vsaj eno minuto opazovati pod najmanj 80-kratno povečavo. Odsotnost srčnega utripa se zabeleži po 48, 72 in 96 urah.
33. Odstotke izvalitve vseh tretiranih in kontrolnih skupin je treba začeti beležiti in poročati po 48 urah. Čeprav izvalitev ni končna točka, ki se uporablja za izračun LC_{50} , zagotavlja izpostavljenost zarodka brez morebitne pregradne funkcije horija in lahko zato pomaga pri razlagi podatkov.
34. Primeri normalnega (35) in neobičajnega razvoja zarodkov cebric so podrobno opisani v dodatkih 3 in 5.

Analitske meritve

35. Na začetku in na koncu preskusa se izmerijo vrednost pH, skupna trdota in prevodnost v kontrolah ter v največji koncentraciji preskusne kemikalije. V polstatičnih sistemih zamenjave je treba vrednost pH izmeriti pred zamenjavo vode in po njej. Koncentracija raztopljenega kisika se v negativnih kontrolah in najvišji preskusni koncentraciji z zarodki, sposobnimi preživetja, izmeri na koncu preskusa, pri čemer mora biti skladna z merili za veljavnost preskusa (glej odstavek 8f). Če obstaja dvom, da se temperatura med ploščami s 24 jamicami razlikuje, se temperatura izmeri v treh naključno izbranih posodah. Najbolje je, če se temperatura med preskusom beleži stalno oziroma vsaj dnevno.
36. Pri statičnemu sistemu je treba koncentracijo preskusne kemikalije izmeriti vsaj v najvišji in najnižji preskusni koncentraciji na začetku in na koncu preskusa, vendar je najbolje, če se izmeri pri vseh tretiranjih. Pri polstatičnih preskusih (zamenjavah), pri katerih bi morala koncentracija preskusne kemikalije ostati v območju $\pm 20\%$ nominalnih vrednosti, se priporoča, da se analizirata vsaj najvišja in najnižja preskusna koncentracija, ko sta sveže pripravljene in takoj pred zamenjavo. Pri preskusih, pri katerih se pričakuje, da koncentracija preskusne kemikalije ne bo ostala v območju $\pm 20\%$ nominalne vrednosti, je treba analizirati vse preskusne koncentracije, ko so sveže pripravljene in takoj pred zamenjavo vode. V primeru nezadostne količine za analizo je lahko koristna združitev testnih raztopin ali uporaba nadomestnih komor iz enakega materiala in z enakim razmerjem med prostornino in površino kot pri ploščah s 24 jamicami. Zelo se priporoča, naj rezultati temeljijo na izmerjenih koncentracijah. Če koncentracije ne ostanejo v območju 80–120 % nominalne koncentracije, je treba učinek koncentracij izraziti glede na geometrijsko sredino izmerjenih koncentracij (glej poglavje 5 v Smernicah OECD za preskušanje toksičnosti zahtevnih snovi in zmesi v vodnem okolju (28)).

MEJNI PRESKUS

37. S postopki, opisanimi v tej preskusni metodi, se lahko izvede mejni preskus s 100 mg/l preskusne kemikalije ali pri meji topnosti v preskusnem gojišču (pri čemer se uporabi nižja od obeh vrednosti), da se dokaže, da je vrednost LC_{50} višja od te koncentracije. Mejni preskus je treba izvesti pri 20 zarodkih v tretiranju, pozitivni kontroli in po potrebi kontroli s topilom ter 24 zarodkih v negativni kontroli. Če je odstotek smrtnosti v preskušani koncentraciji za 10 % večji od odstotka umrljivosti v negativni kontroli (ali kontroli s topilom), je treba izvesti celotno študijo. Vse opažene učinke je treba zabeležiti. Če je umrljivost za 10 % večja v negativni kontroli (ali kontroli s topilom), je preskus neveljaven in ga je treba ponoviti.

PODATKI IN POROČANJE**Obdelava rezultatov**

38. Pri tem preskusu se za statistično analizo posamezne jamice štejejo za neodvisne ponovljene vzorce. Odstotki zarodkov, pri katerih je pozitivno vsaj eno opažanje na višjem nivoju biološke organizacije pri 48 urah in/ali 96 urah, se lahko prikažejo v odvisnosti od preskusnih koncentracij. Za izračun naklonov krivulje, vrednosti LC_{50} in mej zaupanja (95 %) je treba uporabiti ustrezne statistične metode (38) in upoštevati dokument OECD z naslovom „Sodobni pristopi pri statistični analizi podatkov o ekotoksičnosti: smernice za uporabo“ (39).

Poročilo o preskusu

39. V poročilu o preskusu je treba navesti naslednje informacije:

Preskusna kemikalija:

Snov iz ene sestavine:

— fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;

- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo itd. (vključno z vsebnostjo organskega ogljika, če je to ustrezno).

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

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

Preskusni organizmi:

- znanstveno ime, sev, vir, metoda zbiranja oplojenih iker in nadaljnje ravnanje.

Preskusni pogoji:

- uporabljeni preskusni postopek (npr. polstatična zamenjava);
- obdobje osvetljenosti;
- načrt preskusa (npr. število preskusnih komor, vrste kontrol);
- lastnosti kakovosti vode pri vzdrževanju rib (npr. vrednost pH, trdota, temperatura, prevodnost, raztopljeni kisik);
- koncentracija raztopljenega kisika, vrednost pH, skupna trdota, temperatura in prevodnost testnih raztopin na začetku in po 96 urah;
- metoda priprave osnovnih raztopin in testnih raztopin ter pogostost zamenjave;
- utemeljitev uporabe in izbire topila, če to ni voda;
- nominalne preskusne koncentracije in rezultat vseh analiz za določanje koncentracije preskusne kemikalije v preskusnih posodah; poročati je treba o izkoristku učinkovitosti metode in meji določljivosti (LOQ);
- dokazi, da so kontrole izpolnjevale merila za veljavnost v zvezi s skupnim preživetjem;
- stopnja oplojenosti iker;
- odstotek izvalitve v tretiranih in kontrolnih skupinah.

Rezultati:

- najvišja koncentracija, ki med preskusom ne povzroči umrljivosti;
- najnižja koncentracija, ki med preskusom povzroči 100-odstotno umrljivost;
- skupna umrljivost za vsako koncentracijo ob priporočenih časih opazovanja;
- vrednosti LC₅₀ po 96 urah (in neobvezno po 48 urah) za umrljivost s 95-odstotnimi mejami zaupanja, če je to mogoče;
- graf s krivuljo koncentracija–umrljivost na koncu preskusa;
- umrljivost v kontrolah (v negativnih kontrolah, notranjih kontrolah plošč, pozitivni kontroli in morebitni uporabljeni kontroli s topilom);
- podatki o rezultatih vseh štirih opažanj na višjem nivoju biološke organizacije;
- pogostost in opis morfoloških in fizioloških anomalij, če obstajajo (glej primere na sliki 2 v Dodatku 5);
- incidenti med preskusom, ki lahko vplivajo na rezultate;

- statistična analiza in obdelava podatkov (probit analiza, model logistične regresije in geometrijska sredina za LC₅₀);
- naklon in meje zaupanja regresije (transformirane) krivulje koncentracija–odziv.

Vsa odstopanja od preskusne metode in ustrezna pojasnila.

Razprava in razlaga rezultatov.

VIRI

- (1) OECD (2011). Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No. 157, OECD, Pariz.
- (2) OECD (2012). Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (Annexes). Series on Testing and Assessment No. 179, OECD, Pariz.
- (3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. in Seitz, N. (2005). Towards an alternative for the acute fish LC₅₀ test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. ALTEX 22: 87–102.
- (4) ISO (2007). Mednarodni standard. Kakovost vode – Določevanje akutne toksičnosti odpadnih voda na jajčeca cebric (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E). Mednarodna organizacija za standardizacijo.
- (5) Nagel, R. (2002). DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) – a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX 19: 38–48.
- (6) Schulte, C. in Nagel, R. (1994). Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test – preliminary results. ATLA 22, 12–19.
- (7) Bachmann, J. (2002). Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). PhD-thesis, Technical University of Dresden, Nemčija.
- (8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. in 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: 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, 9690–9700.
- (10) Kammann, U., Vobach, M. in Wosniok, W. (2006). Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 51: 97–102.
- (11) Groth, G., Kronauer, K. in Freundt, K. J. (1994). Effects of *N,N*-diethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. Toxicol. In Vitro 8: 401–406.
- (12) Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. in 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: 878–882.
- (13) Nguyen, L. T. in Janssen, C. R. (2001). Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. 16: 566–571.
- (14) Cheng, S. H., Wai, A. W. K., So, C. H. in Wu, R. S. S. (2000). Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. Environ. Toxicol. Chem. 19: 3024–3031.
- (15) Belanger, S. E., Rawlings J. M. in 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), 196–209
- (17) Poglavje C.4 te priloge: Dobra biološka razgradljivost.
- (18) Poglavje C.29 te priloge: Dobra biološka razgradljivost – CO₂ v zaprtih posodah.
- (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: 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: 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) Poglavje C.48 te priloge: Kratkotrajni preskus razmnoževanja rib. Glej 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, 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, 1676–1682.
- (27) ISO (1996). Mednarodni standardi. Kakovost vode – Ugotavljanje akutne smrtne toksičnosti snovi s sladkovodnimi ribami (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)). ISO 7346-3: Pretočna metoda. Dostopen na: [<http://www.iso.org>].
- (28) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Pariz.
- (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*). 5th edition. Eugene, University of Oregon Press, Institute of Neuroscience, ZDA.
- (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) Evropska komisija (2007). Priporočilo Komisije 2007/526/ES z dne 18. junija 2007 o smernicah za bivališča in oskrbo živali, ki se uporabljajo za poskusne in druge znanstvene namene (notificirano pod dokumentarno številko C(2007) 2525) [<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:SL:PDF>]
- (33) Evropska unija (2010). Direktiva 2010/63/EU Evropskega parlamenta in Sveta z dne 22. septembra 2010 o zaščiti živali, ki se uporabljajo v znanstvene namene. UL L 276, 20.10.2010, str. 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. in Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203: 253–310.
- (36) Poglavlje C.2 te priloge: Preskus akutne imobilizacije vodnih bolh (*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). Mednarodni standard. Kakovost vode – Navodilo za statistično interpretacijo ekotoksikoloških podatkov. ISO TS 20281. Dostopen na: [<http://www.iso.org>].
- (39) OECD (2006). Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Pariz.
- (40) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detailed review paper „Fish embryo toxicity assays“. UBA report under contract no. 20385422 German Federal Environment Agency, Berlin. 298 str.
-

Dodatek 1

OPREDELITEV POJMOV

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

Blastula: celična tvorba okoli animalnega pola, ki prekriva določen del rumenjaka.

Kemikalija: snov ali zmes.

Epibolija: je velika proliferacija zlasti epidermalnih celih v fazi gastrulacije zarodka in njihovo gibanje od dorzalne proti ventralni strani, s katerim se entodermalne celične plasti internalizirajo pri procesu, podobnem invaginaciji, rumenjak pa se vključi v zarodek.

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

Notranja kontrola plošč: notranja kontrola, ki jo sestavljajo štiri jamice, napolnjene z vodo za redčenje, na vsaki plošči s 24 jamicami, da se ugotovi, ali je proizvajalec ali raziskovalec med postopkom morda kontaminiral plošče in ali lahko katera koli plošča vpliva na rezultat preskusa (npr. zaradi temperaturnega gradienta).

IUPAC: Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo.

Voda za vzdrževanje: voda, v kateri poteka oskrba odraslih rib.

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

Preskus polstatične zamenjave: preskus z redno zamenjavo testnih raztopin po določenih obdobjih (npr. vsakih 24 ur).

SMILES: sistem za poenostavljen zapis strukture molekul.

Somit: v razvijajočem se zarodku vretenčarja so somiti množice mezoderma, ki je razporejen prečno glede na živčno cev, in ki bodo sčasoma razvili usnjico (dermatom), skeletno mišico (miotom) in vretenca (sklerotom).

Statični preskus: preskus, pri katerem se testne raztopine med preskusom ne spremenijo.

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

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

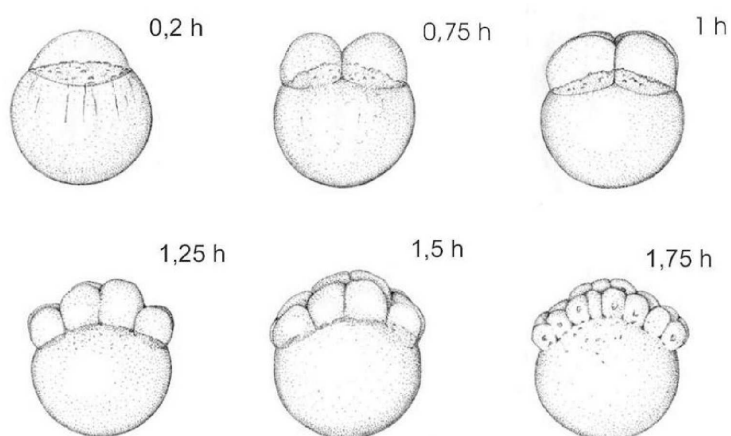
Dodatek 2

VZDRŽEVANJE, RAZMNOŽEVANJE IN OBIČAJNI POGOJI ZA PRESKUSE AKUTNE TOKSIČNOSTI
ZARODKA CEBRICE

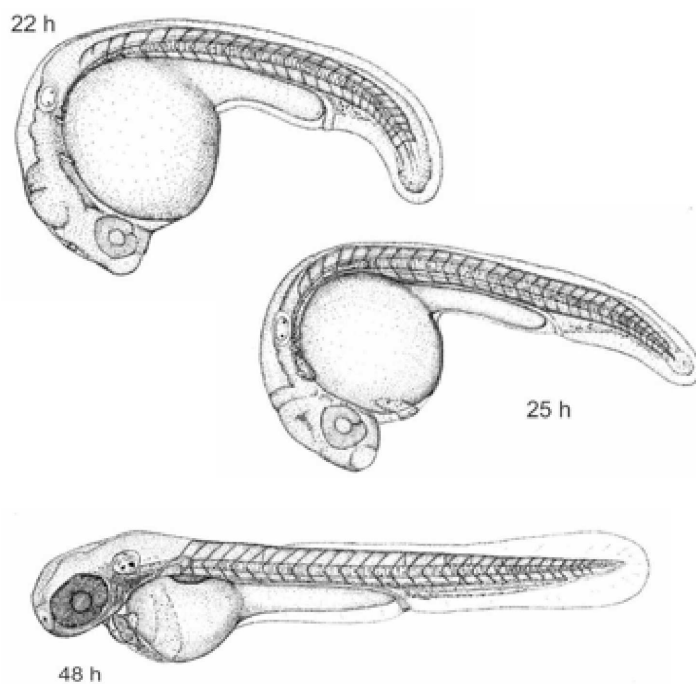
Cebrica (<i>Danio rerio</i>)		
Izvor živalske vrste	Indija, Mjanmar, Malaka, Sumatra	
Spolni dimorfizem	Samice: izstopajoč trebuh, ko nosijo ikre. Samci: vitkejši, oranžni odtenek med modrimi vzdolžnimi črtami (opazen zlasti pri predrepi plavuti).	
Način hranjenja	Suha hrana v kosmičih (največ 3 % teže ribe na dan) 3–5-krat na dan; dodatno navplji morskih rakcev (vrste <i>Artemia</i>) in/ali majhne vodne bolhe ustrežne velikosti, pridobljene iz nekontaminiranega vira. S hranjenjem z živo hrano se obogati okolje, zato je treba cebrice hraniti z živo hrano, če je to mogoče. Za zagotovitev optimalne kakovosti vode je treba čezmerno količino hrane in iztrebke odstraniti približno eno uro po hranjenju.	
Približna teža odrasle ribe	Samice: $0,65 \pm 0,13$ g. Samci: $0,5 \pm 0,1$ g.	
Vzdrževanje starševskih rib	Osvetlitev	Fluorescenčne sijalke (široki spekter), $10\text{--}20 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 540–1 080 luksov ali 50–100 ft-c (ravni v laboratoriju); 12–16-urno obdobje osvetljenosti.
	Temperatura vode	$26 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$
	Kakovost vode	$\text{O}_2 \geq 80$ % nasičenosti, trdota: npr. $\sim 30\text{--}300$ mg/l CaCO_3 , $\text{NO}_3^-: \leq 48$ mg/l, NH_4^+ in $\text{NO}_2^-: < 0,001$ mg/l, preostali klor $< 10 \mu\text{g}/\text{l}$, skupni organski klor < 25 mg/l, pH = 6,5–8,5.
	Dodatna merila kakovosti vode	Delci < 20 mg/l, skupni organski ogljik < 2 mg/l, celotni organofosfori pesticidi < 50 ng/l, celotni organoklorni pesticidi in poliklorirani bifenili < 50 ng/l.
	Velikost akvarijev za vzdrževanje	Npr. 180 l, 1 riba/l.
	Čiščenje vode	Stalno (prečiščevanje z ogljem), druge možnosti pa so med drugim kombinacija z vzdrževanjem s polstatično zamenjavo ali pretočnim sistemom z neprekinjeno zamenjavo vode.
	Priporočeno razmerje samcev in samic za razmnoževanje	2: 1 (ali množično drstenje).
Akvariji za drstenje	Npr. akvariji prostornine 4 l z jekleno mrežo na dnu in umetno rastlino za spodbujanje drstenja, zunanji ogrevalni postavki ali množično drstenje znotraj akvarijev za vzdrževanje.	
Struktura in videz iker	Stabilen horij (tj. zelo prozoren, nelepljiv, premera 0,8–1,5 mm).	
Hitrost drstenja	Ena odrasla samica odloži vsaj 50–80 iker na dan. Hitrost drstenja je lahko bistveno večja, kar je odvisno od vrste. Stopnja oplojenosti mora znašati ≥ 70 %. Pri ribah, ki se prvič drstijo, je lahko stopnja oplojenosti iker nižja pri prvih nekaj drstenjih.	
Vrsta preskusa	Statični preskus, polstatična zamenjava, pretočni preskus, $26 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, preskusne komore, ki so se kondicionirale 24 ur (npr. plošče s 24 jamicami s 2,5–5 ml na jamico)	

Dodatek 3

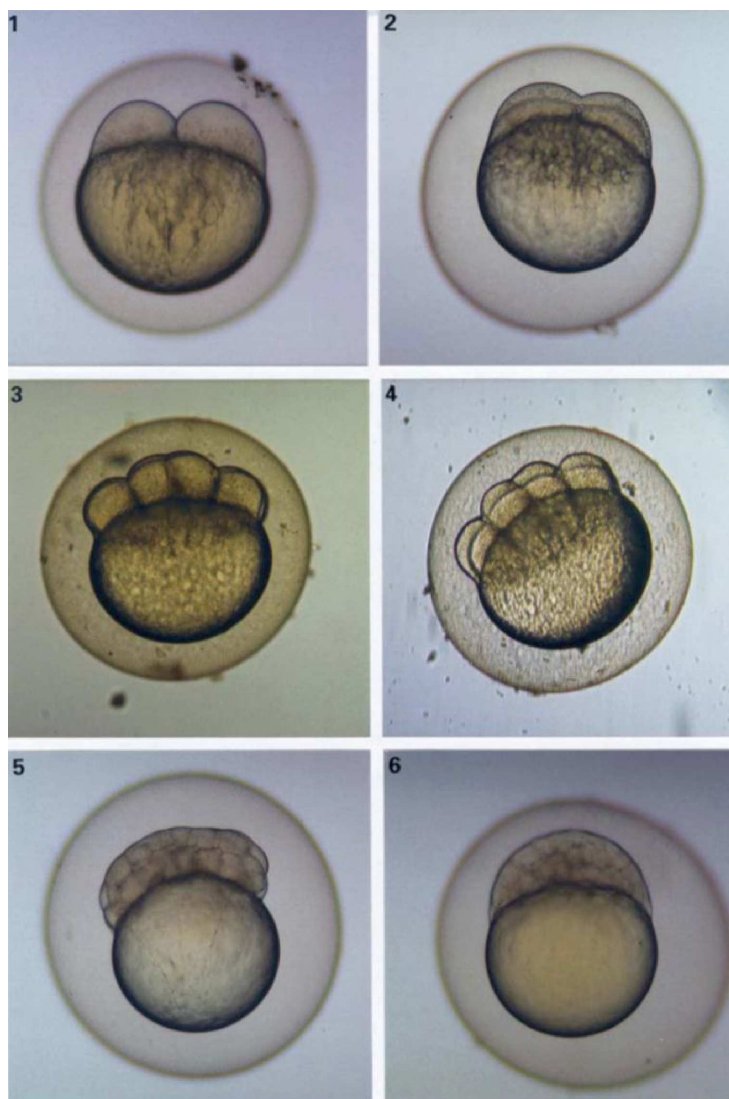
NORMALEN RAZVOJ CEBRIC PRI 26 °C



Slika 1: Izbrane faze zgodnjega razvoja cebric (*Danio rerio*): 0,2–1,75 ure po oploditvi (na podlagi Kimmel in drugi., 1995 (35)). Za diagnozo oploditve in sposobnosti preživetja iker se lahko uporabi časovno zaporedje normalnega razvoja (glej odstavek 26: Izbira oplojenih iker).



Slika 2: Izbrane faze poznega razvoja cebric (*Danio rerio*) (zarodek, pri katerem se odstrani horij, da se optimizira vidljivost): 22–48 ur po oploditvi (na podlagi Kimmel in drugi., 1995 (35)).

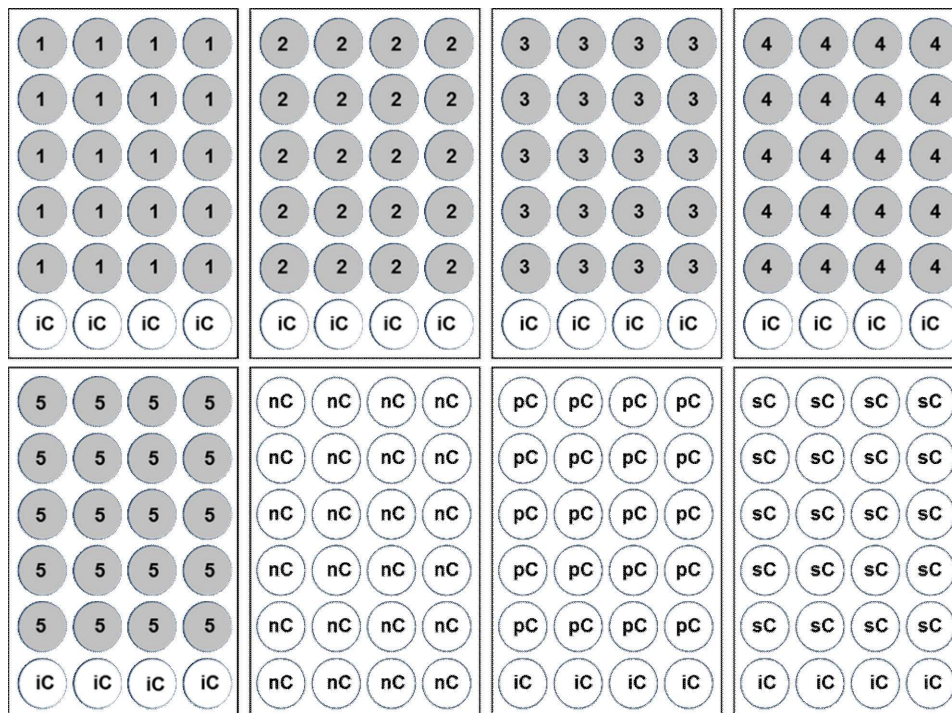


Slika 3: Normalen razvoj zarodkov cebric (*Danio rerio*): (1) 0,75 ure, faza dveh celic; (2) 1 ura, faza štirih celic; (3) 1,2 ure, faza osmih celic; (4) 1,5 ure, faza šestnajstih celic (5) 4,7 ure, začetek epibolije; (6) 5,3 ure, približno 50 % epibolije (na podlagi Braunbeck in Lammer, 2006 (40)).

Dodatek 4

Slika 1

Razporeditev plošč s 24 jamicami



1–5 = pet preskusnih koncentracij/kemikalijo,

nC = negativna kontrola (voda za redčenje),

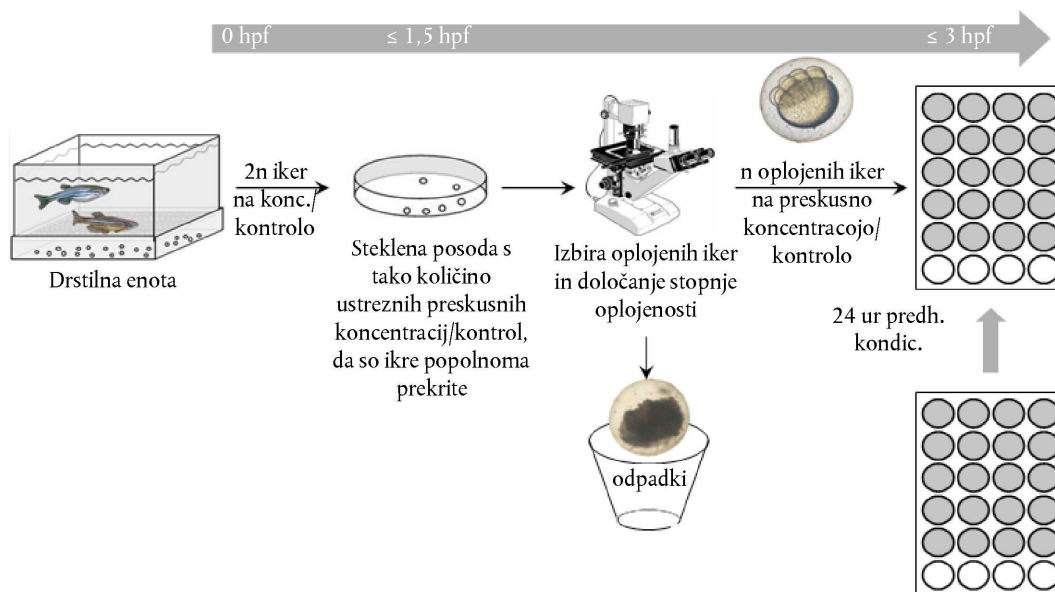
iC = notranja kontrola plošč (voda za redčenje),

pC = pozitivna kontrola (4 mg/l 3,4-dikloroanilina),

sC = kontrola s topilom

Slika 2:

Shema postopka preskusa akutne toksičnosti zarodka cebrice (z leve proti desni): proizvodnja iker, zbiranje iker, predhodna izpostavljenost takoj po oploditvi v steklenih posodah, izbira oplojenih iker z obrnjenim mikroskopom ali binokularnim mikroskopom in porazdelitev oplojenih iker v plošče s 24 jamicami z ustreznimi preskusnimi koncentracijami/kontrolami, n = število iker, potrebnih za posamezno preskusno koncentracijo/kontrolo (tukaj 20), hpf = ure po oploditvi.



Dodatek 5

**ATLAS SMRTONOSNIH KONČNIH TOČK PRI PRESKUSU AKUTNE TOKSIČNOSTI ZARODKA
CEBRICE**

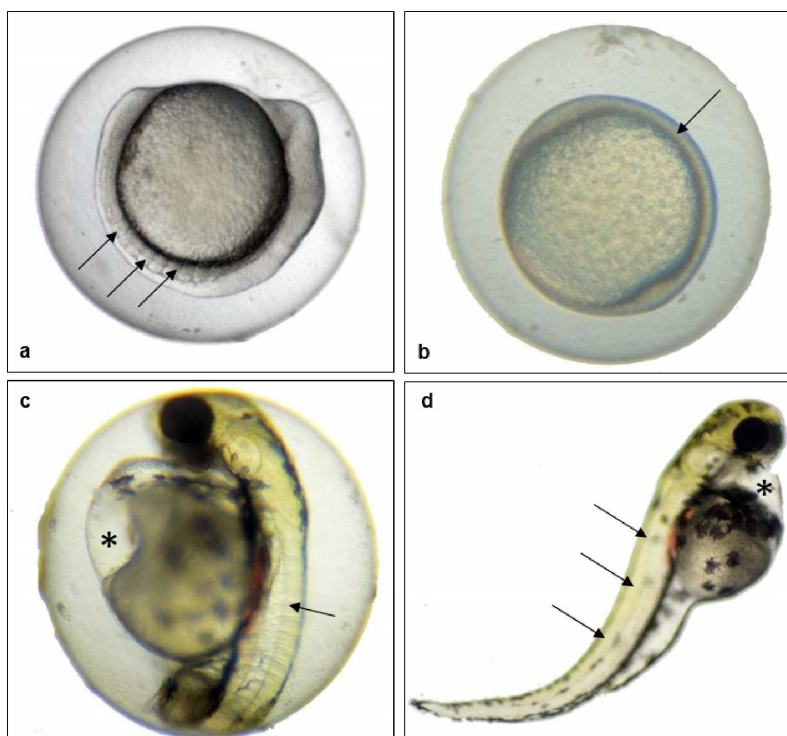
Naslednje končne točke na višjem nivoju biološke organizacije pomenijo akutno toksičnost in posledično smrt zarodka: *koagulacija zarodka*, *odsotnost ločenosti repa*, *odsotnost oblikovanja somitov* in *odsotnost srčnega utripa*. Za prikaz teh končnih točk so bili izbrani mikrofotografiji v nadaljevanju.

Slika 1

Koagulacija zarodka:

Pri močni osvetlitvi polja so v koaguliranih zarodkih cebric vidne številne neprozorne inkluzije.

Slika 2

Odsotnost oblikovanja somitov:

Kljub zaostanku pri razvoju za približno 10 ur so na 24 ur staremu zarodku cebrice na sliki (a) vidni zelo razviti somiti (→), zarodek na sliki (b) pa ne kaže znakov oblikovanja somitov (→). Čeprav je viden izrazit edem vrečice rumenjaka (*), je na 48 ur staremu zarodku cebrice na sliki (c) vidno značilno oblikovanje somitov (→), 96 ur star zarodek cebrice na sliki (d) pa ne kaže znakov oblikovanja somitov (→). Upoštevati je treba tudi ukrivljenost hrbtenice (skoliozo) in perikardialni edem (*) pri zarodku na sliki (d).

Slika 3

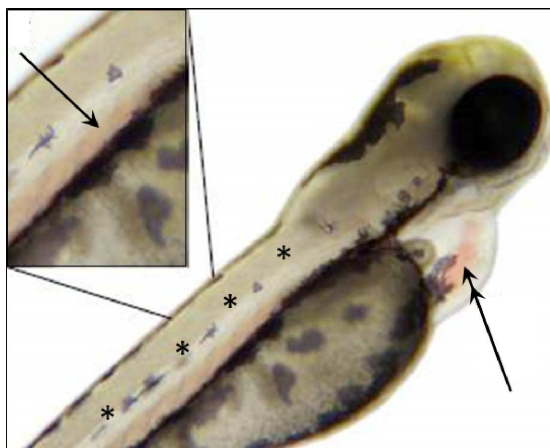
Odsotnost ločenosti repa



v stranskem pogledu (a: →; 96 ur star zarodek cebrice). Upoštevati je treba tudi odsotnost zametka očesa (*).

Slika 4

Odsotnost srčnega utripa



Odsotnost srčnega utripa je že po naravi težko prikazati na mikrografu. Za odsotnost srčnega utripa je značilno, da se srce ne krči (dvojna puščica). Negibnost krvnih celic, na primer v abdominalni aorti (→ na vstavljeni sličici), ni indikator odsotnosti srčnega utripa. Upoštevati je treba tudi odsotnost oblikovanja somitov v tem zarodku (*, homogen videz mišičnega tkiva namesto razčlenjenega). Čas opazovanja, da se zabeleži odsotnost srčnega utripa, mora trajati vsaj eno minuto pri vsaj 80-kratni povečavi.

C.50 Preskus toksičnosti za klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) brez usedline

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD 238 (2014). Namenjena je ocenjevanju toksičnosti kemikalij za klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*), vrsto potopljene vodne dvokaličnice iz družine rmanca. Temelji na obstoječi preskusni metodi ASTM (1), ki je spremenjena v preskusni sistem brez usedline (2), da se oceni intrinzična ekotoksičnost preskusnih kemikalij (neodvisno od porazdelitve in obnašanja preskusne kemikalije med vodo in usedlino). Preskusni sistem brez usedline ni zelo analitsko zapleten (le v vodni fazi), rezultati pa se lahko analizirajo vzporedno in/ali v primerjavi z rezultati, pridobljenimi pri preskusu za *Lemna sp.* (3), poleg tega zahtevani sterilni pogoji zagotavljajo čim manjši učinek mikroorganizmov in alg (sprejemanja kemikalij/razgradnje itd.). Ta preskus ne nadomešča drugih preskusov toksičnosti v vodnem okolju, temveč jih dopolnjuje, da se omogoči podrobnejša ocena nevarnosti in tveganj za vodne rastline. Ta preskusna metoda je bila validirana s krožnim testom (4).
2. Podrobno je opisano preskušanje z zamenjavo testne raztopine (polstatični preskus) ali brez zamenjave (statični preskus). Glede na cilje preskusa in regulativne zahteve se priporoča uporaba polstatične metode, npr. za snovi, ki hitro izginjajo iz raztopine zaradi izhlapevanja, adsorpcije, fotorazgradnje, hidrolize, obarjanja ali biološke razgradnje. Več navodil je na voljo v (5). Ta preskusna metoda se uporablja za snovi, za katere je bila preskusna metoda validirana (glej podrobnosti iz poročila o krožnem testu (4)), ali za pripravke ali znane zmesi, če pa se preskuša zmes, morajo biti njene sestavine čim bolj opredeljene in kvantificirane. Preskusna metoda za klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) brez usedline dopolnjuje preskus toksičnosti vode in usedline za klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) (6). Pred uporabo preskusne metode za preskušanje zmesi v regulativne namene je treba proučiti, ali bo zagotovila sprejemljive rezultate za navedeni namen in, če jih bo, zakaj. Tega ni treba storiti, če obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi.

NAČELO PRESKUSA

3. Stalno rastoče rastlinske kulture klasastega rmanca (*Myriophyllum spicatum*) (le v spremenjenem gojišču po Andrews, glej Dodatek 2) lahko rastejo kot monokulture v različnih koncentracijah preskusne kemikalije v obdobju 14 dni v preskusnem sistemu brez usedline. Cilj preskusa je kvantificirati učinke kemikalije na vegetativno rast v tem obdobju na podlagi izbranih merjenih spremenljivk. Merjene spremenljivke so večanje dolžine poganjka, stranskih vej in korenin, razvoj sveže in suhe teže ter povečanje števila spiralasto razvrščenih listov. Poleg tega se upoštevajo značilne kvalitativne spremembe preskusnih organizmov, kot so iznakaženost ali kloroza in nekroza, indikator katerih je rumenenje ali bela in rjava barva. Učinki, odvisni od kemikalije, se kvantificirajo tako, da se rast v testnih raztopinah primerja z rastjo v kontrolah, nato pa se določi koncentracija, ki povzroča določeno x-odstotno zaviranje rasti, in izrazi kot EC_x , pri čemer je lahko „x“ katera koli vrednost, kar je odvisno od regulativnih zahtev, npr. EC_{10} , EC_{20} in EC_{50} . Upoštevati je treba, da so ocene vrednosti EC_{10} in EC_{20} zanesljive in primerne le pri preskusih, pri katerih so koeficienti variacije pri kontrolnih rastlinah nižji od ravni učinka, ki se ocenjuje, kar na primer pomeni, da morajo biti koeficienti variacije pri okvirni oceni vrednosti EC_{20} manjši od 20 %.
4. Določiti je treba tako povprečno specifično hitrost rasti (ocenjeno na podlagi ocen dolžine glavnega poganjka in treh dodatnih merjenih spremenljivk) kot prirast (ocenjen na podlagi povečanja dolžine glavnega poganjka in treh dodatnih merjenih spremenljivk) netretiranih in tretiranih rastlin. Specifična hitrost rasti (r) in prirast (y) se nato uporabita za določitev $E_r C_x$ (npr. $E_r C_{10}$, $E_r C_{20}$, $E_r C_{50}$) oziroma $E_y C_x$ (npr. $E_y C_{10}$, $E_y C_{20}$, $E_y C_{50}$).
5. Poleg tega se lahko statistično določita najnižja koncentracija z opaženim učinkom (LOEC) in koncentracija brez opaznega učinka (NOEC).

INFORMACIJE O PRESKUSNI KEMIKALIJI

6. Na voljo mora biti analitska metoda, ki je dovolj občutljiva, da se kvantificira preskusna kemikalija v preskusnem gojišču. Informacije o preskusni kemikaliji, ki so lahko koristne za določitev preskusnih pogojev, so med drugim strukturna formula, čistost in nečistoče, topnost v vodi, obstojnost v vodi in na svetlobi, disociacijska konstanta kisline (pK_a), porazdelitveni koeficient n-oktanol/voda (K_{ow}), parni tlak in biološka razgradljivost. Topnost v vodi in parni tlak se lahko uporabita za izračun Henryjeve konstante, ki pokaže, ali so med preskusnim obdobjem verjetne znatne izgube preskusne kemikalije. To pripomore k odločitvi o sprejetju ukrepov za nadzorovanje takih izgub. Če so informacije o topnosti in obstojnosti preskusne kemikalije nejasne, se priporoča, da se ocenita v pogojih preskusa, tj. v gojišču, pri temperaturi in režimu osvetlitve, ki se bodo uporabili v preskusu.
7. Nadzorovanje vrednosti pH preskusnega gojišča je še posebej pomembno na primer pri preskušanju kovin ali snovi, ki so hidrolitično neobstoje. Dodatna navodila za preskušanje kemikalij s fizikalno-kemijskimi lastnostmi, ki otežujejo njihovo preskušanje, so na voljo v Smernicah OECD (5).

VELJAVNOST PRESKUSA

8. Da je preskus veljaven, mora biti podvojitveni čas dolžine glavnega poganjka v kontroli krajši od 14 dni. To merilo se lahko izpolni z uporabo statičnega ali polstatičnega preskusnega režima ter gojišč in preskusnih pogojev, opisanih v tej preskusni metodi.
9. Povprečni koeficient variacije za prirast, ki temelji na meritvah sveže teže poganjka (tj. od začetka do konca preskusa), in dodatne merjene spremenljivke (glej odstavek 37) v kontrolnih kulturah med ponovljenimi vzorci niso večji od 35 %.
10. Več kot 50 % ponovljenih vzorcev iz kontrolne skupine je med 14-dnevnim obdobjem izpostavljenih v sterilnih pogojih, kar pomeni, da se zanje lahko s prostim očesom oceni, da niso kontaminirani z drugimi organizmi, kot so alge, glive in bakterije (bistra raztopina). *Opomba:* navodila za ocenjevanje sterilnosti so na voljo v poročilu o krožnem testu (4).

REFERENČNA KEMIKALIJA

11. Referenčne kemikalije, kot je na primer 3,5-diklorofenol, uporabljen pri krožnem testu (4), se lahko preskusijo, da se preveri preskusni postopek, na podlagi podatkov krožnega testa pa je aritmetično povprečje vrednosti EC_{50} 3,5-diklorofenola za različne spremenljivke odziva (glej odstavke od 37 do 41 te preskusne metode) med 3,2 mg/l in 6,9 mg/l (za podrobne podatke o intervalu zaupanja za navedene vrednosti glej poročilo o krožnem testu). Priporočljivo je, da se referenčna kemikalija preskusi najmanj dvakrat letno oziroma skupaj z določanjem toksičnosti preskusne kemikalije, kadar se preskušanja izvajajo redkeje.

OPIS METODE

Oprema

12. Vsa oprema v stiku s preskusnimi gojišči mora biti izdelana iz stekla ali drugega kemijsko inertnega materiala. Steklene posode za gojenje in preskušanje je treba očistiti kemičnih onesnaževalcev, ki bi lahko pronicali v preskusno gojišče, poleg tega pa morajo biti sterilne. Preskusne posode morajo biti dovolj dolge, da lahko poganjki v kontrolnih posodah rastejo v vodni fazi, ne da bi na koncu preskusa dosegli gladino preskusnega gojišča. Priporoča se uporaba epruvet iz debelega borosilikatnega stekla brez roba z notranjim premerom približno 20 mm in dolžine približno 250 mm z aluminijastimi pokrovčki.
13. Ker spremenjeno gojišče po Andrews u vsebuje saharozo (ki spodbuja rast gliv in bakterij), je treba testne raztopine pripraviti v sterilnih pogojih. Vse tekočine in opremo je treba pred uporabo sterilizirati. Sterilizacija se izvede s štiriurno obdelavo z vročim zrakom (210 °C) ali dvajsetminutnim avtoklaviranjem pri 121 °C. Poleg tega je treba vse bučke, posodice, skleda itd. ter drugo opremo tik pred uporabo obdelati z ognjem na sterilni delovni mizi.

14. Kulture in preskusne posode se ne smejo hraniti skupaj. To se najboljše doseže z ločenimi okoljskimi gojitvenimi komorami, inkubatorji ali prostori. Omogočeno mora biti nadzorovanje osvetljenosti in temperature ter ohranjanje teh parametrov na konstantni ravni.

Preskusni organizem

15. Klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) je vrsta potopljene vodne dvokaličnice iz družine rmanca. Med julijem in avgustom se nad vodno gladino pojavijo nevpadljivi rožnato-beli cvetovi. Rastline so ukoreninjene s trdnim sistemom korenin in rastejo po celotni severni polobli v evtrofnih, vendar neonesnaženih in bolj apnenčastih stoječih vodah z blatnim substratom. Klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) ima raje sladko vodo, vendar raste tudi v somornici.
16. Za preskus toksičnosti brez usedline so potrebne sterilne rastline. Če preskusni laboratorij nima navadnih kultur klasastega rmanca (*Myriophyllum spicatum*), se lahko sterilni rastlinski material pridobi iz drugega laboratorija ali pa se (nesterilni) rastlinski material odvzame na terenu oziroma pridobi od komercialnega dobavitelja, pri čemer je treba opraviti taksonomsko preverjanje vrste, če se rastline zberejo na terenu. Če se rastline zberejo na terenu ali če jih zagotovi komercialni dobavitelj, jih je treba sterilizirati (1) in najmanj osem tednov pred uporabo vzdrževati v kulturi v gojišču, ki se uporabi za preskušanje. Terenska mesta, kjer se odvzamejo začetne kulture, morajo biti brez očitnih virov kontaminacije. Pri nabiranju klasastega rmanca (*Myriophyllum spicatum*) na terenu je treba zelo paziti, da se pridobi prava vrsta, zlasti na območjih, na katerih se lahko križa z drugimi vrstami *Myriophyllum*. Če se pridobi iz drugega laboratorija, ga je treba na podoben način vzdrževati tri tedne. V poročilu je treba vedno navesti rastlinski material in vrsto, uporabljeno za preskušanje.
17. Kakovost in enotnost rastlin, ki se uporabijo v preskusu, pomembno vplivata na rezultat preskusa, zato je treba rastline skrbno izbrati. Uporabiti je treba mlade, hitrorastoče rastline, ki nimajo vidnih lezij ali ki niso razbarvane (kloroza). Podrobna navodila o pripravi preskusnega organizma so na voljo v Dodatku 4.

Gojenje

18. Kulture se lahko hranijo pri manjši osvetlitvi in nižji temperaturi ($50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), da se zmanjša pogostost vzdrževanja kultur (npr. kadar se za določeno obdobje ne načrtujejo preskusi z vrsto *Myriophyllum*). Podrobna navodila o gojenju so na voljo v Dodatku 3.
19. Vsaj 14 do 21 dni pred preskušanjem je treba zadostno število preskusnih organizmov aseptično prenesti v sveže sterilno gojišče in jih od 14 do 21 dni gojiti v pogojih preskusa kot predkulturo. Podrobna navodila o pripravi predkulture so na voljo v Dodatku 4.

Preskusno gojišče

20. Za klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) se v preskusnem sistemu brez usedline priporoča le eno hranilno gojišče, kot je opisano v Dodatku 2. Za gojenje in preskušanje klasastega rmanca (*Myriophyllum spicatum*) se priporoča, da se spremeni gojišče po Andrews, kot je opisano v (1). Iz petih ločeno pripravljenih hranilnih osnovnih raztopin z dodatkom 3 % saharoze se pripravi spremenjeno gojišče po Andrews. Podrobna navodila o pripravi gojiščapredkulture so na voljo v Dodatku 2.
21. Za pridobitev testnih raztopin je potrebno desetkratno koncentrirano gojišče po Andrews (po potrebi z razredčitvijo). Sestava tega gojišča je opisana v Dodatku 2.

Testne raztopine

22. Testne raztopine se običajno pripravijo z razredčitvijo osnovne raztopine. Osnovne raztopine preskusne kemikalije se običajno pripravijo tako, da se kemikalija raztopi v demineralizirani (tj. destilirani ali deionizirani) vodi. Hranilne snovi se dodajo prek desetkratno koncentriranega spremenjenega gojišča po Andrews.

23. Osnovne raztopine preskusne kemikalije se lahko 20 minut sterilizirajo z avtoklavom pri 121 °C ali s filtrsko sterilizacijo, če uporabljen način sterilizacije ne spremeni narave preskusne kemikalije. Testne raztopine se lahko pripravijo tudi v sterilni demineralizirani vodi ali gojišču v sterilnih pogojih. Pri izbiri postopka sterilizacije osnovnih raztopin preskusne kemikalije je treba upoštevati toplotno obstojnost in adsorpcijo na različnih površinah. Zato se priporoča, da se osnovne raztopine pripravijo v sterilnih pogojih, tj. z uporabo sterilnega materiala za raztapljanje preskusne kemikalije v sterilnih pogojih (npr. sterilizacija z ognjem, laminarnimi komorami itd.) v sterilni vodi. Ta način priprave sterilnih osnovnih raztopin se uporablja tako za snovi kot za zmesi.
24. Najvišja preskušana koncentracija preskusne kemikalije običajno ne sme preseči svoje topnosti v vodi v preskusnih pogojih. Za preskusne kemikalije z majhno topnostjo v vodi bo morda treba pripraviti koncentrirano osnovno raztopino ali dispergirati kemikalijo s pomočjo organskega topila ali disperzijskega sredstva, da se omogoči dodajanje točnih količin preskusne kemikalije v preskusno gojišče ter da se olajšata njeno dispergiranje in raztapljanje. Čim bolj si je treba prizadevati, da se izogne uporabi takšnih snovi. Uporaba pomožnih topil ali disperzijskih sredstev ne sme povzročiti fitotoksičnosti. Pogosto uporabljeni topili, ki ne povzročata fitotoksičnosti pri koncentracijah do 100 µl/l, sta na primer aceton in dimetilformamid. Če se uporabi topilo ali disperzijsko sredstvo, je treba končno koncentracijo navesti v poročilu in jo ohranjati na najnižji ravni ($\leq 100 \mu\text{l/l}$), vse tretirane in kontrolne skupine morajo vsebovati enako koncentracijo topila ali disperzijskega sredstva. Dodatna navodila o uporabi disperzijskih sredstev so na voljo v (5).

Preskusne in kontrolne skupine

25. Pri izbiri primernih preskusnih koncentracij je v pomoč predhodno poznavanje toksičnosti preskusne kemikalije za klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) na podlagi podatkov iz preskusa za določanje območja delovanja. Pri končnem preskusu toksičnosti mora običajno biti od pet (kot v preskusu zaviranja rasti pri vrsti *Lemna*, glej poglavje C.26 te priloge) do sedem preskusnih koncentracij, urejenih v geometrijske serije, izbrati pa jih je treba tako, da so vrednosti NOEC in EC_{50} v območju koncentracije (glej v nadaljevanju). Faktor separacije med preskusnimi koncentracijami po možnosti ne sme biti večji od 3,2, vendar se lahko uporabi večja vrednost, če je krivulja koncentracija–odziv ravna. Če se uporabi manj kot pet koncentracij, je treba to utemeljiti. Za vsako preskusno koncentracijo je treba uporabiti najmanj pet ponovljenih vzorcev.
26. Pri določevanju območja preskusnih koncentracij (pri preskusu za določanje območja delovanja in/ali pri dokončnem preskusu toksičnosti) je treba proučiti naslednje možnosti:

Za določitev EC_x z ustrezno ravniyo zaupanja morajo preskusne koncentracije oklepiti vrednost EC_x . Če se na primer ocenjuje EC_{50} , mora biti najvišja preskusna koncentracija višja od vrednosti EC_{50} . Če je vrednost EC_{50} zunaj območja preskusnih koncentracij, bodo povezani intervali zaupanja veliki in pravilna ocena statističnega ujemanja modela morda ne bo mogoča.

Če je cilj ocena vrednosti LOEC/NOEC, mora biti najnižja preskusna koncentracija dovolj nizka, da rast ni bistveno manjša od rasti v kontroli. Poleg tega mora biti najvišja preskusna koncentracija dovolj visoka, da je rast bistveno manjša od rasti v kontroli. V nasprotnem primeru bo treba preskus ponoviti z drugačnim območjem koncentracije (razen če je najvišja koncentracija na meji topnosti ali najvišji zahtevani mejni koncentraciji, npr. 100 mg/l).

27. Vsak preskus mora vključevati kontrole, ki jih sestavljajo isto hranilno gojišče, preskusni organizem (izbrati je treba čim bolj homogen rastlinski material, sveže stranske veje iz predkultur, skrajšane na 2,5 cm od dna), okoljske razmere in postopki kot pri preskusnih posodah, vendar ne vsebujejo preskusne kemikalije. Če se uporablja pomožno topilo ali disperzijsko sredstvo, je treba vključiti dodatno tretiranje kontrole s topilom/disperzijskim sredstvom, ki je prisotno v enaki koncentraciji kot v posodah s preskusno kemikalijo. Zagotoviti je treba vsaj deset kontrolnih posod s ponovljenimi vzorci (in posod s topilom, kjer je ustrezno).

28. Če ni treba določiti vrednosti NOEC, se načrt preskusa lahko spremeni tako, da se poveča število koncentracij in zmanjša število ponovljenih vzorcev na koncentracijo. Kljub temu je treba v vsakem primeru zagotoviti najmanj deset kontrolnih ponovljenih vzorcev.

Izpostavljenost

29. Sveže stranske veje iz predkulture, skrajšane na 2,5 cm od dna, se naključno porazdelijo v preskusne posode v aseptičnih pogojih, v vsaki preskusni posodi pa mora biti ena stranska veja, dolga 2,5 cm, z rastnim vršičkom na enem koncu. V vseh preskusnih posodah mora biti izbrani rastlinski material enake kakovosti.
30. Za inkubator je treba uporabiti načrt naključne porazdelitve preskusnih posod, da se čim bolj zmanjša vpliv prostorskih razlik v temperaturi in obsevanosti. Pri beleženju opažanj je potreben tudi načrt preskusa z bloki ali naključna prerazporeditev posod (ali pogostejše prerazporejanje).
31. Če predhodni preskus obstojnosti pokaže, da koncentracije preskusne kemikalije med trajanjem preskusa (14 dni) ni mogoče ohraniti (tj. izmerjena koncentracija pade pod 80 % na začetku izmerjene koncentracij), se priporoča uporaba polstatičnega preskusnega režima. V tem primeru je treba rastline vsaj enkrat med preskusom (npr. 7. dan) izpostaviti sveže pripravljenim testnim in kontrolnim raztopinam. Pogostost izpostavitve svežemu gojišču je odvisna od obstojnosti preskusne kemikalije, kar pomeni, da bo za ohranjanje približno nespremenljivih koncentracij zelo neobstoje ali hlapnih kemikalij potrebna večja pogostost.
32. Izpostavitve s foliarnim nanosom (pršenjem) ni obravnavana v tej preskusni metodi.

Preskusni pogoji

33. Uporabiti je treba toplo in/ali hladno belo fluorescenčno osvetlitev, da se zagotovi obsevanost s svetlobo v območju približno $100\text{--}150 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, ko se meri kot fotosintetsko aktivno sevanje (400–700 nm) na točkah, ki so enako oddaljene od svetlobnega vira kot od dna preskusnih posod (enakovredno približno 6 000–9 000 luksom), ter cikel svetlobe in teme v razmerju 16: 8 ur. Metoda zaznavanja in merjenja svetlobe, zlasti vrsta tipala, vpliva na izmerjeno vrednost. Sferična tipala (ki se odzivajo na svetlobo iz vseh kotov nad in pod ravnino merjenja) in „kosinusna“ tipala (ki se odzivajo na svetlobo iz vseh kotov nad ravnino merjenja) so primernejša od enosmernih tipal in omogočajo višje odčitke v primeru večtočkovnih svetlobnih virov vrste, ki je opisana tu.
34. Temperatura v preskusnih posodah mora znašati $23 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Posebno pozornost je treba nameniti spreminjanju vrednosti pH v posebnih primerih, na primer pri preskušanju nestabilnih kemikalij ali kovin, vrednost pH pa mora ostati v območju od 6 do 9. Za dodatna navodila glej (5).

Trajanje

35. Preskus se prekine 14 dni po prenosu rastlin v preskusne posode.

Meritve in analitske določitve

36. Ob začetku preskusa je glavni poganjek preskusnega organizma dolg 2,5 cm (glej odstavek 29), izmeri se z ravnilom (glej Dodatek 4) ali s fotografijo in analizo slik. Dolžino glavnega poganjka preskusnega organizma, ki se zdi običajna ali neobičajna, je treba določiti na začetku preskusa, vsaj enkrat med štirinajstdnevnim obdobjem izpostavljenosti in na koncu preskusa. Opomba: če se delovna miza sterilizira, preden se v preskusne posode dodajo rastline, se lahko za merjenje dolžine glavnega poganja na začetku preskusa in med preskusom kot nadomestna možnost analizi slik uporabi sterilno ravnilo. Zabeležiti je treba spremembe pri razvoju rastline, npr. spremembe v deformaciji poganjkov in videzu, znakih nekroze in kloroze, razpadanju ali izgubi plovnosti ter dolžini in videzu korenin. Zabeležiti je treba tudi bistvene značilnosti preskusnega gojišča (npr. prisotnost neraztopljenega materiala ter rast alg, gliv in bakterij v preskusni posodi).

37. Poleg določitev dolžine glavnega poganjka med preskusom je treba oceniti tudi učinke preskusne kemikalije na tri naslednje merjene spremenljivke (ali več):
- skupno dolžino stranskih vej,
 - skupno dolžino poganjka,
 - skupno dolžino korenin,
 - svežo težo,
 - suho težo,
 - število spiralasto razvrščenih listov.
- Opomba 1:* Opažanja med preskusom za določanje območja delovanja so lahko v pomoč pri izbiranju ustreznih dodatnih meritev med zgoraj navedenimi šestimi spremenljivkami.
- Opomba 2:* Zelo je zaželena določitev sveže in suhe teže (parametra iv in v).
- Opomba 3:* Ker lahko saharoza in svetloba (izpostavljenost korenin svetlobi med preskusom) vplivata na prenašalce avksina (rastlinskega rastnega hormona) in ker lahko nekatere kemikalije delujejo na podoben način kot avksin, je vključitev končnih točk korenin (parameter iii) vprašljiva.
- Opomba 4:* Rezultati krožnega testa izkazujejo visoke koeficiente variacije (> 60 %) za skupno dolžino stranskih vej (parameter i). Skupna dolžina stranskih vej je v vsakem primeru zajeta v meritev skupne dolžine poganjka (parameter ii), ki prikazuje bolj sprejemljive koeficiente variacije, ki so manjši od 30 %.
- Opomba 5:* Na podlagi zgoraj navedenih preudarkov so priporočljive končne točke meritev skupna dolžina poganjka, sveža teža in suha teža (parametri ii, iv in v), parameter vi (število spiralasto razvrščenih listov) pa je prepuščen presoji eksperimentatorja.
38. Prednost dolžine glavnega poganjka in števila spiralasto razvrščenih listov je, da se lahko s fotografijo in analizo slik določita za vsako preskusno in kontrolno posodo na začetku preskusa, med njim in na koncu preskusa, čeprav se lahko uporabi tudi (sterilno) ravnilo.
39. Skupna dolžina stranskih vej, skupna dolžina korenin (kot vsota dolžine vseh stranskih vej ali korenin) in skupna dolžina poganjka (kot vsota dolžine glavnega poganjka in skupne dolžine stranskih vej) se lahko izmerijo z ravnilom na koncu izpostavljenosti.
40. Svežo in/ali suho težo je treba določiti na začetku preskusa iz vzorca predkulture, ki je reprezentativen za material, s katerim se preskus začne, in na koncu preskusa z rastlinskim materialom iz vsake preskusne in kontrolne posode.
41. Skupna dolžina stranskih vej, skupna dolžina poganjka, skupna dolžina korenin, sveža teža, suha teža in število spiralasto razvrščenih listov se lahko določijo po naslednjih postopkih:
- Skupna dolžina stranskih vej: dolžina stranskih vej se lahko določi tako, da se na koncu izpostavljenosti z ravnilom izmerijo vse stranske veje. Skupna dolžina stranskih vej je vsota vseh stranskih vej v vsaki preskusni in kontrolni posodi.
 - Skupna dolžina poganjka: dolžina glavnega poganjka se lahko določi z analizo slik ali ravnilom. Skupna dolžina poganjka je vsota skupne dolžine stranskih vej in dolžine glavnega poganjka v vsaki preskusni in kontrolni posodi na koncu izpostavljenosti.

- iii. Skupna dolžina korenin: dolžina korenin se lahko določi tako, da se na koncu izpostavljenosti z merilom izmerijo vse korenine. Skupna dolžina korenin je vsota dolžine vseh korenin v vsaki preskusni in kontrolni posodi.
- iv. Sveža teža: sveža teža se lahko določi s tehtanjem preskusnih organizmov na koncu izpostavljenosti. Ves rastlinski material iz vsake preskusne in kontrolne posode se spere z destilirano vodo in do suhega popivna s celuloznim papirjem. Po tej pripravi se sveža teža določi s tehtanjem. Začetna biomasa (sveža teža) se določi na podlagi vzorca preskusnih organizmov, ki se vzame iz serije, ki se uporablja za inokulacijo preskusnih posod.
- v. Suha teža: po pripravah za določanje sveže teže se preskusni organizmi pri 60 °C posušijo na konstantno težo. Ta masa je suha teža. Začetna biomasa (suha teža) se določi na podlagi vzorca preskusnih organizmov, ki se vzame iz serije, ki se uporablja za inokulacijo preskusnih posod.
- vi. Število spiralasto razvrščenih listov: preštejejo se vsi spiralasto razvrščeni listi vzdolž glavnega poganjka.

Pogostost meritev in analitskih določitev

42. Če se uporabi načrt statičnega preskusa, je treba na začetku in na koncu preskusa izmeriti vrednost pH pri vsakem tretiranju. Če se uporabi načrt polstatičnega preskusa, je treba vrednost pH izmeriti za vsako serijo „sveže“ testne raztopine pred vsako zamenjavo in za ustrezno „izrabljeno“ raztopino.
43. Obsevanost je treba meriti v rastni komori, inkubatorju ali prostoru na točkah, ki so enako oddaljene od svetlobnega vira kot preskusni organizmi. Izmeriti jo je treba vsaj enkrat med preskusom. Najmanj dnevno (ali stalno z zapisovalnikom podatkov) je treba beležiti temperaturo gojišča v nadomestni posodi, ki je v enakih pogojih, v rastni komori, inkubatorju ali prostoru.
44. Med preskusom se v primernih intervalih določajo koncentracije preskusne kemikalije. Pri statičnih preskusih je treba koncentracije določiti vsaj na začetku in na koncu preskusa.
45. Pri polstatičnih preskusih, pri katerih se ne pričakuje, da bodo koncentracije preskusnih kemikalij ostale v območju ± 20 % nominalne koncentracije, je treba analizirati vse sveže pripravljene testne raztopine in enake raztopine pri vsaki zamenjavi. Vendar pa se lahko pri preskusih, pri katerih izmerjene začetne koncentracije preskusnih kemikalij niso v območju ± 20 % nominalne koncentracije, a obstajajo zadostni dokazi, da so začetne koncentracije ponovljive in obstojne (tj. v območju 80–120 % začetne koncentracije), kemijske določitve opravijo le na najvišji in najnižji preskusni koncentraciji. V vseh primerih je treba določitev preskusnih koncentracij pred zamenjavo opraviti le pri eni posodi s ponovljenimi vzorci za vsako preskusno koncentracijo (ali združene vsebine posod posameznih ponovljenih vzorcev).
46. Če so na voljo dokazi, da se je preskusna koncentracija med celotnim preskusom zadovoljivo ohranjala v območju ± 20 % nominalne ali izmerjene začetne koncentracije, lahko analiza rezultatov temelji na nominalnih ali izmerjenih začetnih vrednostih. Če odklon od nominalne ali izmerjene začetne koncentracije ni v območju ± 20 %, mora analiza rezultatov temeljiti na geometrijski srednji koncentraciji med izpostavljenostjo ali modelih, ki opisujejo zmanjševanje koncentracije preskusne kemikalije (5).

Mejni preskus

47. V nekaterih okoliščinah, npr. kadar predhodni preskus pokaže, da preskusna kemikalija nima toksičnih učinkov pri koncentracijah do 100 mg/l ali do svoje meje topnosti v preskusnem gojišču ali v primeru pripravka do meje razpršljivosti, se lahko izvede mejni preskus, ki vključuje primerjavo odzivov v kontrolni skupini in eni tretirani skupini (100 mg/l ali koncentracija, ki je enaka meji topnosti). Zelo se priporoča, da se ta preskus podpre z analizo koncentracije izpostavljenosti. Vsi zgoraj opisani preskusni pogoji in merila za veljavnost veljajo tudi za mejni preskus, le število ponovljenih vzorcev v tretirani skupini je treba podvojiti. Rast v kontrolni in tretirani skupini se lahko analizira s statističnim preskusom za primerjavo povprečij, npr. s Studentovim t-testom.

PODATKI IN POROČANJE

Spremenljivke odziva

48. Namen preskusa je določiti učinke preskusne kemikalije na vegetativno rast klasastega rmanca (*Myriophyllum spicatum*). Ta preskusna metoda opisuje dve spremenljivki odziva.
- a) **Povprečna specifična hitrost rasti:** ta spremenljivka odziva se izračuna na osnovi sprememb logaritmov dolžine glavnega poganjka in logaritmov drugih merjenih parametrov, in sicer skupne dolžine poganjka, sveže teže, suhe teže ali števila spiralasto razvrščenih listov v časovnem obdobju (izraženo v dnevih) v kontrolah in vsaki tretirani skupini. **Opomba:** povprečne specifične hitrosti rasti ni mogoče izračunati za merjena parametra skupne dolžine stranskih vej in skupne dolžine korenin. Na začetku preskusa preskusni organizem nima stranskih vej in korenin (na podlagi pripravka iz predkulture), kar pomeni, da je začetna vrednost nič, izračun povprečne specifične hitrosti rasti pa ni določen.
- b) **Prirast:** ta spremenljivka odziva se izračuna na osnovi sprememb dolžine glavnega poganjka in sprememb drugih merjenih parametrov, in sicer po možnosti skupne dolžine poganjka, sveže teže, suhe teže ali števila spiralasto razvrščenih listov in drugih parametrov, če se to zdi koristno, v kontrolah in vsaki tretirani skupini do konca preskusa.
49. Ocene toksičnosti morajo temeljiti na dolžini glavnega poganjka in treh dodatnih merjenih spremenljivkah (tj. po možnosti skupna dolžina poganjka, sveža teža, suha teža ali število spiralasto razvrščenih listov (glej odstavek 37 in opombe 2, 4 in 5 k temu odstavku)), saj lahko nekatere kemikalije bistveno bolj vplivajo na druge merjene spremenljivke kot na dolžino glavnega poganjka. Ta učinek se ne bi zaznal zgolj z izračunom dolžine glavnega poganjka.

Povprečna specifična hitrost rasti

50. Povprečna specifična hitrost rasti se za določeno obdobje za vsak ponovljeni vzorec iz kontrolnih in tretiranih skupin izračuna kot logaritemsko povečanje spremenljivk rasti, in sicer dolžine glavnega poganjka in treh dodatnih merjenih spremenljivk (tj. skupna dolžina poganjka, sveža teža, suha teža ali število spiralasto razvrščenih listov), po spodnji enačbi:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

pri čemer je:

μ_{i-j} : povprečna specifična hitrost rasti od časa i do časa j ,

N_i : merjena spremenljivka v preskusni posodi ali kontrolni posodi ob času i ,

N_j : merjena spremenljivka v preskusni posodi ali kontrolni posodi ob času j ,

t : časovno obdobje od i do j .

Za vsako tretirano in kontrolno skupino se izračuna aritmetično povprečje hitrosti rasti in oceni varianca.

51. Povprečna specifična hitrost rasti se izračuna za celotno preskusno obdobje (čas „ i “ v zgornji enačbi pomeni začetek preskusa, čas „ j “ pa konec preskusa). Za vsako preskusno koncentracijo in kontrolo se izračuna aritmetično povprečje specifične hitrosti rasti in oceni varianca. Oceni se tudi presečna hitrost rasti, da se ocenijo učinki preskusne kemikalije, ki se pojavljajo med obdobjem izpostavljenosti (npr. s pregledovanjem logaritemsko transformiranih krivulj rasti).

52. Nato se lahko za vsako preskusno koncentracijo (tretirano skupino) izračuna odstotek zaviranja hitrosti rasti (I_r) po naslednji enačbi:

$$\%I_r = \frac{(\mu_c - \mu_T)}{\mu_c} \times 100$$

pri čemer je:

% I_r : odstotek zaviranja povprečne specifične hitrosti rasti,

μ_c : aritmetično povprečje za μ v kontroli,

μ_T : aritmetično povprečje za μ v tretirani skupini.

Prirast

53. Učinki na prirast se določijo na osnovi merjene spremenljivke dolžine glavnega poganjka in treh dodatnih merjenih spremenljivk (tj. po možnosti skupna dolžina poganjka, sveža teža, suha teža ali število spiralasto razvrščenih listov), ki se lahko določijo v vsaki preskusni posodi na začetku in na koncu preskusa. V primeru sveže teže ali suhe teže se začetna biomasa določi na osnovi vzorca preskusnih organizmov, ki se vzame iz serije, ki se uporablja za inokulacijo preskusnih posod. Za vsako preskusno koncentracijo in kontrolo se izračuna aritmetično povprečje prirasta in oceni varianca. Povprečje odstotka zaviranja prirasta (% I_y) se lahko za vsako tretirano skupino izračuna po naslednji enačbi:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

pri čemer je:

% I_y : odstotek zmanjšanja prirasta,

b_c : končna biomasa minus začetna biomasa v kontrolni skupini,

b_T : končna biomasa minus začetna biomasa v tretirani skupini.

Podvojitveni čas

54. Za določitev podvojitvenega časa (T_d) dolžine glavnega poganjka in izpolnjevanje tega merila za veljavnost (glej odstavek 8) se uporabi naslednja enačba skupaj s podatki iz kontrolnih posod:

$$T_d = \ln 2 / \mu$$

Pri tem je μ povprečna specifična hitrost rasti, ki se določi, kot je opisano v odstavkih od 50 do 52.

Izdelava krivulj koncentracija–odziv

55. Izrisati je treba krivulje koncentracija–odziv, ki prikazujejo povprečen odstotek zaviranja spremenljivke odziva (I_r ali I_y , ki se izračuna, kot je prikazano v odstavku 53), in krivuljo logaritemsko transformirane koncentracije preskusne kemikalije.

Ocena vrednosti EC_x

56. Ocene vrednosti EC_x morajo temeljiti na povprečni specifični hitrosti rasti ($E_r C_x$) in prirastu ($E_y C_x$), vsaka od teh vrednosti pa mora temeljiti na dolžini glavnega poganjka in morebitnih dodatnih merjenih spremenljivkah (tj. po možnosti skupna dolžina poganjka, sveža teža, suha teža ali število spiralasto razvrščenih listov). To je posledica dejstva, da nekatere kemikalije drugače vplivajo na dolžino glavnega poganjka in druge merjene spremenljivke. Želeni parametri toksičnosti so zato štiri vrednosti EC_x za vsako izračunano raven zaviranja x , in sicer $E_r C_x$ (dolžina glavnega poganjka), $E_r C_x$ (tj. po možnosti skupna dolžina poganjka, sveža teža, suha teža ali število spiralasto razvrščenih listov), $E_y C_x$ (dolžina glavnega poganjka) in $E_y C_x$ (tj. po možnosti skupna dolžina poganjka, sveža teža, suha teža ali število spiralasto razvrščenih listov).

57. Opozoriti je treba, da vrednosti EC_x izračunane na podlagi teh dveh spremenljivk odziva, niso primerljive, to razliko pa je treba upoštevati pri uporabi rezultatov preskusa. Če se upoštevajo preskusni pogoji iz te preskusne metode, bodo vrednosti EC_x , ki temeljijo na povprečni specifični hitrosti rasti ($E_r C_x$), v večini primerov višje od rezultatov, ki temeljijo na prirastu ($E_y C_x$) zaradi matematične osnove teh pristopov. Ta razlika se ne sme razlagati kot razlika v občutljivosti obeh spremenljivk odziva, saj enostavno izvira iz različne matematične narave vrednosti.

Statistični postopki

58. Cilj je kvantificirati odziv na koncentracijo z regresijsko analizo. Po linearni transformaciji podatkov o odzivu se lahko uporabi tehtana linearna regresija, na primer v probit ali logaritemskih ali Weibullovih enotah (7), vendar so nelinearni regresijski postopki primernejše tehnike, ki bolje obravnavajo neizogibne nepravilnosti in odstopanja podatkov od enakomernih porazdelitev. Če se te nepravilnosti približujejo ničelnemu ali popolnemu zaviranju, se lahko s transformacijo povečajo in ovirajo analizo (7). Opozoriti je treba, da so standardne metode probit analize, logaritemske analize ali Weibullove transformacije namenjene uporabi pri kvantnih podatkih (npr. za umrljivost ali preživetje), zato jih je treba prilagoditi za uporabo na podatkih o hitrosti rasti ali prirastu. Specifični postopki za določanje vrednosti EC_x na podlagi kontinuiranih podatkov so na voljo v (8), (9) in (10).
59. Za vsako spremenljivko odziva, ki se bo analizirala, se izračuna točkovna ocena vrednosti EC_x , pri čemer se uporabi razmerje med odzivom in koncentracijo. Kadar je to mogoče, se za vsako oceno določijo 95-odstotne meje zaupanja. Grafično ali statistično je treba oceniti, kako se podatki o odzivu prilegajo regresijskemu modelu. Regresijsko analizo je treba opraviti na odzivih posameznih ponovljenih vzorcev in ne na povprečjih tretiranih skupin.
60. Ocene EC_{50} in meje zaupanja se lahko pridobijo tudi z linearno interpolacijo s samovzorčenjem (10), če razpoložljivi regresijski modeli/metode niso primerni za podatke.
61. Za oceno vrednosti LOEC in s tem tudi vrednosti NOEC je treba primerjati povprečja tretiranih skupin s tehnikami analize variance (ANOVA). Povprečje za vsako koncentracijo se nato primerja s povprečjem kontrole z ustrežno metodo večkratne primerjave ali testa trenda. Uporabna sta lahko Dunnettov ali Williamsov test (12) (13) (14) (15) (16). Oceniti je treba, ali velja predpostavka homogenosti varianc v analizi variance. Ta ocena se lahko izvede grafično ali s formalnim preskusom (15). Primerna testa sta Levenejev ali Bartlettov test. Če predpostavka homogenosti varianc ni izpolnjena, se lahko ponekod to popravi z logaritemsko transformacijo podatkov. Če je heterogenost variance izredno velika in je ni mogoče popraviti s transformacijo, je treba proučiti možnosti analize z metodami, kot je na primer test po Jonckheere-Terpstraju. Dodatna navodila o določanju vrednosti NOEC so na voljo v (10).
62. Na podlagi nedavnega znanstvenega razvoja se priporoča opuščanje koncepta vrednosti NOEC in njegova nadomestitev z regresijsko določenimi točkovnimi ocenami EC_x . Za ta preskus *Myriophyllum* ni bila določena ustrežna vrednost x . Vendar se zdi, da je ustrežno območje od 10 % do 20 % (odvisno od izbrane spremenljivke odziva), po možnosti pa je treba poročati tako o vrednostih EC_{10} in EC_{20} kot o njunih mejah zaupanja.

Poročanje

63. V poročilu o preskusu je treba navesti naslednje informacije:

Preskusna kemikalija

Snov iz ene sestavine:

— fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo itd. (vključno z vsebnostjo organskega ogljika, če je to ustrezno).

Snov z več sestavinami, UVCB ali zmes:

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

Preskusne vrste

- Znanstveno ime in vir.

Preskusni pogoji

- Uporabljeni preskusni postopek (statični ali polstatični).
- Datum začetka preskusa in njegovo trajanje.
- Preskusno gojišče.
- Opis načrta poskusa: preskusne posode in pokrovi, količine raztopin in dolžina glavnega poganjka za vsako poskusno posodo na začetku preskusa.
- Preskusne koncentracije (nominalne in izmerjene, kot je ustrezno) in število ponovljenih vzorcev za posamezno koncentracijo.
- Metode priprave osnovnih in testnih raztopin, vključno z uporabo kakršnih kolih topil ali disperzijskih sredstev.
- Temperatura med preskusom.
- Svetlobni vir, obsevanost in homogenost.
- Vrednosti pH preskusnega in kontrolnega gojišča.
- Metoda analize preskusne kemikalije z ustreznimi podatki o oceni kakovosti (validacijske študije, standardni odkloni ali meje zaupanja analiz).
- Metode za določanje dolžine glavnega poganjka in drugih merjenih spremenljivk, npr. skupne dolžine stranskih vej, skupne dolžine poganjka, skupne dolžine korenin, sveže teže, suhe teže in števila spiralasto razvrščenih listov.
- Stanje kulture (sterilna ali nesterilna) v vsaki preskusni in kontrolni posodi pri vsakem opazovanju.
- Vsa odstopanja od te preskusne metode.

Rezultati

- Neobdelani podatki: dolžina glavnega poganjka in druge merjene spremenljivke v vsaki preskusni in kontrolni posodi pri vsakem opazovanju in analizi.
- Povprečja in standardni odkloni za vsako merjeno spremenljivko.
- Krivulje rasti za vsako merjeno spremenljivko.
- Izračunane spremenljivke odziva za vsak tretirani ponovljeni vzorec z aritmetičnimi povprečji in koeficientom variacije za ponovljene vzorce.
- Grafična predstavitev razmerja med koncentracijo in učinkom.
- Ocene toksičnih končnih točk za spremenljivke odziva, npr. EC₅₀, EC₁₀, EC₂₀, in povezani intervali zaupanja. Vrednosti LOEC in/ali NOEC, če sta izračunani, in statistične metode za njuno določitev.
- Če je bila uporabljena analiza variance, velikost opaženega učinka (npr. najmanjša značilna razlika).
- Vsaka stimulacija rasti, opažena pri katerem koli tretiranju.
- Vsi vidni znaki fitotoksičnosti in opažanja testnih raztopin.
- Razprava o rezultatih, vključno z vsemi vplivi na rezultat preskusa, ki izhajajo iz odstopanj od te preskusne metode.

VIRI

- (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.
 - (1) Maletzki, D. et al. (2010). *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch*, št. 22, str. 702–710.
 - (2) Poglavje C.26 te priloge: Preskus zaviranja rasti *Lemna* sp.
 - (3) OECD (2014). „*Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series Testing and Assessment, št. 205, OECD Publishing, Pariz.
 - (4) OECD (2000). „Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, št. 23, OECD Publishing, Pariz.
 - (5) Poglavje C.51 te priloge: Preskus toksičnosti vode in usedline za klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*).
 - (6) Christensen, E. R., N. Nyholm (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, zv. 18/9, str. 713–718.
 - (7) Nyholm, N. et al. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chemistry*, zv. 11/2, str. 157–167.
 - (8) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, zv. 11/10, str. 1485–1494.
 - (9) OECD (2006). „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, št. 54, OECD Publishing, Pariz.
 - (10) 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.
 - (11) Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, zv. 50/272, str. 1096–1121.
 - (12) Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, zv. 20/3, str. 482–491.
 - (13) Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, zv. 27/1, str. 103–117.
 - (14) Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, zv. 28/2, str. 519–531.
 - (15) Brain, P., R. Cousens (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, zv. 29/2, str. 93–96.
-

Dodatek 1

OPREDELITEV POJMOV

Biomasa je sveža in/ali suha teža žive snovi, prisotne v populaciji. Pri tem preskusu je biomasa vsota glavnega poganjka, vseh stranskih vej in vseh korenin.

Kemikalija je snov ali zmes.

Kloroza je sprememba barve preskusnega organizma, zlasti spiralasto razvrščenih listov, z zelene na rumenkasto.

EC_x je koncentracija preskusne kemikalije, raztopljene v preskusnem gojišču, ki povzroči x-odstotno (npr. 50-odstotno) zmanjšanje rasti klasastega rmanca (*Myriophyllum spicatum*) v ustreznem obdobju izpostavljenosti (navesti v primeru odstopanja od polnega ali običajnega trajanja preskusa). Za nedvoumno označitev vrednosti EC, pridobljene iz hitrosti rasti ali prirasta, se simbol „E_rC“ uporablja za hitrost rasti in simbol „E_yC“ za prirast, sledi pa uporabljena merjena spremenljivka, npr. E_rC (dolžina glavnega poganjka).

Rast je povečanje merjene spremenljivke, npr. dolžine glavnega poganjka, skupne dolžine stranskih vej, skupne dolžine poganjka, skupne dolžine korenine, sveže teže, suhe teže ali števila spiralasto razvrščenih listov, med preskusnim obdobjem.

Hitrost rasti (povprečna specifična hitrost rasti) je logaritemsko povečanje merjene spremenljivke v obdobju izpostavljenosti. *Opomba*: spremenljivke odziva, povezane s hitrostjo rasti, niso odvisne od trajanja preskusa, če je vzorec rasti neizpostavljenih kontrolnih organizmov eksponenten.

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

Merjene spremenljivke so vse vrste spremenljivk, ki se merijo, da se izrazi končna točka preskusa z eno ali več različnimi spremenljivkami odziva. Pri tej preskusni metodi so merjene spremenljivke dolžina glavnega poganjka, skupna dolžina stranskih vej, skupna dolžina poganjka, skupna dolžina korenine, sveža teža, suha teža in število spiralasto razvrščenih listov.

Monokultura je kultura z eno rastlinsko vrsto.

Nekroza je mrtvo (tj. belo ali temno rjavo) tkivo preskusnega organizma.

Koncentracija brez opaznega učinka (NOEC) je preskusna koncentracija takoj pod vrednostjo LOEC.

Spremenljivka odziva je spremenljivka za oceno toksičnosti, izpeljana iz katerih koli izmerjenih parametrov, ki opisujejo biomaso, z drugačnim postopkom izračuna. Pri tej preskusni metodi sta hitrost rasti in prirast spremenljivki odziva, izpeljani iz merjenih spremenljivk, kot so dolžina glavnega poganjka, skupna dolžina poganjka, sveža teža, suha teža ali število spiralasto razvrščenih listov.

Polstatični preskus (zamenjava) je preskus, pri katerem se testna raztopina v določenih časovnih presledkih redno menja med preskusom.

Statični preskus je preskusna metoda, pri kateri se testna raztopina med preskusom ne zamenja.

Preskusna kemikalija je vsaka snov ali zmes, preskušena z uporabo te preskusne metode.

Končna točka preskusa opisuje splošen dejavnik, ki ga preskusna kemikalija spremeni glede na kontrolni vzorec in je cilj preskusa. V tej preskusni metodi je končna točka zaviranje rasti, ki ga lahko izrazimo z različnimi spremenljivkami odziva, ki temeljijo na eni ali več merjenih spremenljivkah.

Preskusno gojišče je popolnoma sintetično gojišče, na katerem preskusne rastline rastejo ob izpostavljenosti preskusni kemikaliji. Običajno se preskusna kemikalija raztopi v preskusnem gojišču.

UVCB je snov z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkt ali biološki material.

Prirast je vrednost merjene spremenljivke za izražanje biomase na koncu obdobja izpostavljenosti, od katere se odšteje vrednost merjene spremenljivke na začetku obdobja izpostavljenosti. Opomba: če je vzorec rasti neizpostavljenih organizmov eksponenten, se bodo spremenljivke odziva, ki temeljijo na prirastu, zmanjševale, ko se bo čas trajanja preskusa povečeval.

Dodatek 2

SPREMENJENO GOJIŠČE PO ANDREWSU ZA ZALOŽNO KULTURO IN PREDKULTURO

Iz petih ločeno pripravljenih hranilnih osnovnih raztopin se pripravi spremenjeno gojišče po Andrews u z dodatkom 3 % saharoze za založno kulturo in predkulturo.

Preglednica 1

Sestava hranilne raztopine po Andrews u: (oznaka E 1913-04 ASTM)

Priprava hranilnih osnovnih raztopin			Priprava hranilne raztopine
osnovna raztopina	kemikalija	začetna teža na 1 000 ml	ml na 5 l hranilne raztopine
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	glej osnovno raztopino 3.1 v nadaljevanju		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	

Osnovne raztopine se lahko v hladilniku hranijo šest mesecev (pri 5–10 °C). Le osnovna raztopina št. 5 ima krajši rok uporabnosti (dva meseca).

Preglednica 2

Priprava osnovne raztopine 3.1 za pripravo osnovne raztopine 3

Kemikalija	Začetna teža v 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

Ko se pripravi osnovna raztopina 3.1 (preglednica 2), jo je treba globoko zamrzniti v približno 11 ml alikvotih (pri vsaj –18 °C). Globoko zmrznjeni deli imajo rok uporabnosti petih let.

Za pripravo osnovne raztopine 3 je treba odtajati osnovno raztopino 3.1, z 10 ml osnovne raztopine 3.1 napolniti merilno bučko s prostornino 1 l in dodati ultra čisto vodo do oznake na merilni bučki.

Za pripravo spremenjenega gojišča po Andrewsju je treba merilno bučko s prostornino 5 l napolniti s približno 2 500 ml ultra čiste vode. Ko se doda 50 ml vsake osnovne raztopine, je treba napolniti 90 % merilne bučke z ultra čisto vodo in nastaviti vrednost pH na 5,8.

Nato je treba dodati 150 g raztopljenih saharoze (3 % na 5 l) in z ultra čisto vodo napolniti merilno bučko do oznake. Nato se hranilna raztopina vlije v bučke Schott s prostornino 1 l in 20 minut avtoklavira pri 121 °C.

Tako pridobljena hranilna raztopina se lahko sterilna hrani v hladilniku (pri 5–10 °C) tri mesece.

Spremenjeno gojišče po Andrewsju za preskus toksičnosti brez usedline

Iz petih hranilnih osnovnih raztopin, navedenih v preglednicah 1 in 2, se pripravi desetkratno koncentrirano spremenjeno gojišče po Andrewsju, ki je potrebno za pridobitev testnih raztopin, z dodatkom 30 % saharoze. Za to je treba merilno bučko s prostornino 1 l napolniti s približno 100 ml ultra čiste vode. Ko se doda 100 ml vsake osnovne raztopine, je treba vrednost pH nastaviti na 5,8. Nato je treba dodati 30 % raztopljenih saharoz (300 g na 1 000 ml) in z ultra čisto vodo napolniti merilno bučko do oznake.

Nato se hranilna raztopina vlije v bučke Schott s prostornino 0,5 l in 20 minut avtoklavira pri 121 °C.

Tako pridobljena desetkratno koncentrirana spremenjena hranilna raztopina se lahko sterilna hrani v hladilniku (pri 5–10 °C) tri mesece.

Dodatek 3

VZDRŽEVANJE ZALOŽNE KULTURE

V tem Dodatku 3 je opisana založna kultura klasastega rmanca (*Myriophyllum spicatum* L⁽¹⁾), vrste potopljene vodne dvokaličnice iz družine rmanca. Med julijem in avgustom se nad vodno gladino pojavijo nevpadljivi rožnato-beli cveti. Rastline so ukoreninjene s trdnim sistemom korenin in rastejo po celotni severni polobli v evtrofnih, vendar neonesnaženih in bolj apnenčastih stoječih vodah z blatnim substratom. Klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) ima raje sladko vodo, vendar raste tudi v somornici.

Za založno kulturo brez usedline v laboratorijskih pogojih so potrebne sterilne rastline. Na voljo so sterilne rastline iz ekotoksiloškega laboratorija zvezne agencije za okolje Nemčije (Umweltsbundesamt).

Preskusni organizmi se lahko pripravijo tudi iz nesterilnih rastlin v skladu z oznako ASTM E 1913-04. Glej postopek v nadaljevanju za gojenje *Myriophyllum sibiricum*, zbranega na terenu (izvleček iz standardnih smernic ASTM):

„Če se postopek začne z nesterilnimi rastlinami, zbranimi na terenu, se jeseni naberejo zarodni brstiči *Myriophyllum sibiricum*. Zarodni brstiči se položijo v 20-litrski akvarij, ki vsebuje 5 cm sterilne usedline, prekrite s kremenčevim peskom ali na primer z glino Turface® in 18 l vode z reagentom. Akvarij je treba prezračevati ter vzdrževati pri temperaturi 15 °C in hitrosti pretoka delcev od 200 do 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 16 ur na dan. Rastlinska kultura v akvariju se lahko vzdržuje kot pomožni vir rastlin, če mehanska okvara v termostatarani celici za rast, kontaminacija ali drug dejavnik uničijo kulturo sterilizirane rastline. Rastline, ki rastejo v akvariju, niso sterilne in sterilnih kultur ni mogoče vzdrževati v sistemu za gojenje serij. Za sterilizacijo kulture je treba rastline vzeti iz akvarija in približno 0,5 ure spirati pod tekočo deionizirano vodo. V aseptičnih pogojih v laminarni komori z zračnim tokom se rastline razkužujejo manj kot 20 min (da pobeli večina rastlinskega tkiva in je zelen le še rastoči vršiček) v 3-odstotni (w/v) raztopini natrijevega hipoklorita, ki vsebuje 0,01 % primerne površinsko aktivne snovi. Pretresite razkužilo in rastlinski material. Segmenti z več kolenci se prenesejo v sterilne epruvete za gojenje, ki vsebujejo 45 ml steriliziranega spremenjenega gojišča po Andrews, in se zaprejo z navadnimi zamaški za epruvete za gojenje. V vsako preskusno komoro se postavi le en rastlinski segment. Za pritržitev zamaška na posodo s kulturo se uporabi sloj laboratorijskega tesnila. Po vzpostavitvi sterilne kulture je treba segmente rastline z več kolenci vsakih deset do dvanajst dni prestaviti v nove preskusne komore, ki vsebujejo sveže tekoče hranilno gojišče. Kot je prikazano z gojenjem na agarških ploščah, morajo biti rastline sterilne in ostati sterilne osem tednov pred začetkom preskušanja.“

Ker spremenjeno gojišče po Andrews vsebuje saharozo (ki spodbuja rast gliv in bakterij), je treba ves material in raztopino pripraviti v sterilnih pogojih, prav tako pa mora v sterilnih pogojih potekati tudi gojenje. Vse tekočine in opremo je treba pred uporabo sterilizirati. Sterilizacija se izvede s štiriurno obdelavo z vročim zrakom (210 °C) ali dvajsetminutnim avtoklaviranjem pri 121 °C. Poleg tega je treba vse bučke, posodice, skleda itd. ter drugo opremo tik pred uporabo obdelati z ognjem na sterilni delovni mizi.

Založne kulture se lahko dlje časa vzdržujejo pri manjši osvetlitvi in nižji temperaturi (50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 20 \pm 2 °C), ne da bi jih bilo treba ponovno vzpostaviti. Gojišče za *Myriophyllum* mora biti enako gojišču, ki se je uporabilo za preskušanje, vendar se lahko za založne kulture uporabijo druga gojišča z veliko hranljivimi snovmi.

Segmenti rastline se aksenično razdelijo v več 500-mililitrskih erlenmajeric ali/in 2 000-mililitrskih fernbachovih bučk, vsaka pa je napolnjena s približno 450 ml oziroma 1 000 ml spremenjenega gojišča po Andrews. Nato se bučke zamašijo z zamaški iz celuloze.

Poleg tega je treba opremo tik pred uporabo obvezno obdelati z ognjem na sterilni delovni mizi. Rastline se glede na število in velikost približno vsake tri tedne prenesejo v svežo hranilno raztopino.

Za to zamenjano kulturo se lahko uporabijo vršički in segmenti srednjega dela stebela. Število in velikost prenesenih rastlin (ali segmentov rastlin) sta odvisna tega, koliko rastlin je potrebnih. Lahko se na primer prenese pet segmentov poganjka v eno fernbachovo bučko in trije segmenti poganjka v eno erlenmajerico, vsak od njih pa je dolg 5 cm. Zavreči je treba vse ukoreninjene, cvetoče, mrtve ali druge izstopajoče dele.

(¹) Carl von Linné (*23. maj 1707 Råshult/Älmhult; † 10. januar 1778 Uppsala).

Slika 1

Obrezovanje rastlin za založno kulturo in predkulturo po treh tednih gojenja

Rastline se gojijo v 500-mililitrskih erlenmajericah in 2 000-mililitrskih fernbachovih bučkah v hlajenih inkubatorjih pri 20 ± 2 °C in stalni svetlobi približno $100\text{--}150 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ali 6 000–9 000 luksov (ki jo oddaja razsvetljava v komori z barvno temperaturo „topla bela svetloba“).

Slika 2

Gojenje rastlin v hlajenem inkubatorju z razsvetljava v komori

Uporabiti je treba kemično čiste (v kislini oprane) in sterilne steklene posode za gojenje, z njimi pa je treba ravnati po aseptičnih metodah. V primeru kontaminacije založne kulture, npr. z algami, glivami in/ali bakterijami, je treba pripraviti novo kulturo ali pa uporabiti založno kulturo iz drugega laboratorija, da se zamenja navedena kultura.

Dodatek 4

VZDRŽEVANJE PREDKULTURE IN PRIPRAVA PRESKUSNEGA ORGANIZMA ZA PRESKUŠANJE

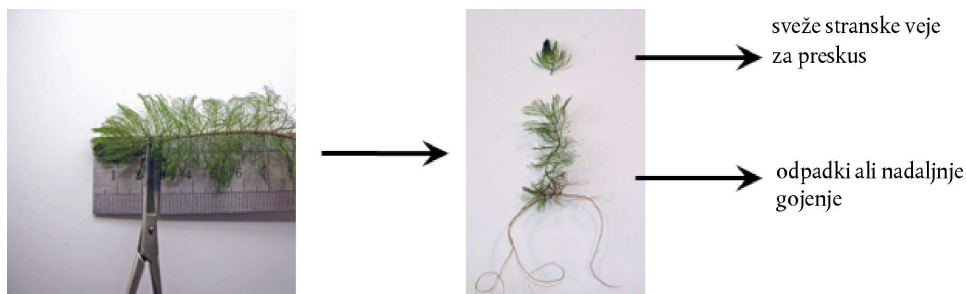
Za pridobitev predkulture narežite poganjke iz založne kulture v segmente, ki imajo po dva spiralasto razvrščena lista, nato položite segmente v fernbachove bučke, napolnjene s spremenjenim gojiščem po Andrews (s 3 % saharoze). Vsaka bučka lahko vsebuje do 50 segmentov poganjka. Vendar je treba paziti, da so segmenti vitalni in nimajo korenin ali stranskih vej ali zarodnih brstičev (glej sliko 1 v Dodatku 3).

Organizmi iz predkulture se gojijo od 14 do 21 dni v sterilnih pogojih v okoljskih komorah z izmenjujočimi se 16 urami svetlobe in 8 urami teme. Izbrana obsevanost mora biti v območju $100\text{--}150 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Temperatura preskusnih posod mora biti $23 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Ker spremenjeno gojišče po Andrews vsebuje saharozo (ki spodbuja rast alg, gliv in bakterij), je treba raztopine preskusne kemikalije pripraviti v sterilnih pogojih, v sterilnih pogojih pa mora potekati tudi gojenje. Vse tekočine in opremo je treba pred uporabo sterilizirati. Sterilizacija se izvede s štiriurno obdelavo z vročim zrakom ($210 \text{ }^\circ\text{C}$) ali dvajsetminutnim avtoklaviranjem pri $121 \text{ }^\circ\text{C}$. Poleg tega je treba vse bučke, posodice, skleda itd. ter drugo opremo tik pred uporabo obdelati z ognjem na sterilni delovni mizi.

Poganjki se aksenično vzamejo iz bučk s predkulturami, pri čemer je treba izbrati čim bolj homogen material. Za vsako preskušanje je potrebnih vsaj 60 preskusnih organizmov (preskušanje z osmimi koncentracijami preskusne kemikalije). Za preskušanje je treba iz predkultur vzeti sveže stranske veje, jih skrajšati na 2,5 cm od dna (izmerjeno z ravnilom) in jih premestiti v čašo, ki vsebuje sterilno spremenjeno gojišče po Andrews. Te sveže stranske veje se lahko uporabijo za preskus toksičnosti za klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) brez usedline.

Slika 2

Obrezovanje rastlin iz predkulture za preskus toksičnosti za klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) brez usedline.

C.51 Preskus toksičnosti vode in usedline za klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*)

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD 239 (2014). Preskusne metode so na voljo za na površini plavajočo vodno rastlino enokaličnico vrste *Lemna* (1) in za vrsto alg (2). Te metode se redno uporabljajo za zbiranje podatkov za obravnavo tveganja preskusnih kemikalij, zlasti kemikalij s herbicidnim delovanjem, na neciljne vrste vodnih rastlin. Vendar so v nekaterih primerih lahko potrebni podatki za dodatne vrste makrofitov. Nedavne smernice, ki jih je društvo za okoljsko toksikologijo in kemijo (SETAC – Society of Environmental Toxicology and Chemistry) objavilo na podlagi delavnice o oceni tveganja za vodne makrofite zaradi pesticidov (AMRAP), predlagajo, da so morda za ukoreninjene vrste makrofitov potrebni podatki o preskusnih kemikalijah, če je znano, da vodna leča (*Lemna*) in alge niso občutljive na način delovanja ali če je njihova porazdelitev v usedlino razlog za skrb, saj bi povzročila izpostavljenost prek absorpcije skozi korenine (3). Na podlagi trenutnega razumevanja in izkušenj so bile vrste *Myriophyllum* izbrane kot najprimernejše vrste, če so potrebni podatki za potopljene ukoreninjene dvokalične vrste (4) (5) (6). Ta preskus ne nadomešča drugih preskusov toksičnosti v vodnem okolju, temveč jih dopolnjuje, da se omogoči podrobnejša ocena nevarnosti in tveganj za vodne rastline. Preskusna metoda za vodo in usedlino za klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) dopolnjuje preskus toksičnosti za klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) brez usedline (7).
2. V tem dokumentu je opisana preskusna metoda, ki omogoča oceno učinkov preskusne kemikalije na ukoreninjeno vodno rastlino vrste *Myriophyllum spicatum*, ki raste v sistemu vode in usedline. Preskusna metoda deloma temelji na obstoječih metodah (1) (2) (8) in upošteva nedavne raziskave, povezane z oceno tveganja za vodne rastline (3). Metoda vode in usedline je bila validirana z mednarodnim krožnim testom, izvedenim z vrstami *Myriophyllum*, ki so rasle v statičnih pogojih in bile izpostavljene preskusni kemikaliji z odmerki prek vodnega stolpca (9). Vendar se lahko preskusni sistem zlahka prilagodi, da se omogoči izpostavljenost prek usedline s primešano preskusno snovjo ali izpostavljenost prek vodne faze v polstatičnem scenariju ali scenariju s pulzirajočim odmerjanjem, čeprav navedena scenarija še nista bila uradno preskušena s krožnim testom. Poleg tega se lahko splošna metoda uporablja za druge ukoreninjene, potopljene in emergentne vrste, med drugim tudi za druge vrste *Myriophyllum* (npr. *Myriophyllum aquaticum*) in *Glyceria maxima* (10). Za alternativne vrste je morda treba spremeniti preskusne pogoje ter načrt in trajanje preskusa. Zlasti je potrebno več dela za opredelitev ustreznih postopkov za vrsto *Myriophyllum aquaticum*. Te možnosti niso podrobno predstavljene v tej preskusni metodi, ki opisuje standardni pristop k izpostavljenosti klasastega rmanca (*Myriophyllum spicatum*) v statičnem sistemu prek vodne faze.
3. Ta preskusna metoda se uporablja za snovi, za katere je bila preskusna metoda validirana (glej podrobnosti iz poročila o krožnem testu (9)), ali za pripravke ali znane zmesi. Preskus za vrsto *Myriophyllum* se lahko izvede, da se izpolni zahteva po podatkih stopnje 1, ki jo sproži morebitna porazdelitev preskusne kemikalije v usedlino ali težave z načinom delovanja/selektivnostjo. Enako je lahko potreben laboratorijski preskus za vrsto *Myriophyllum* kot del strategije višje stopnje za obravnavo pomislekov, povezanih s tveganjem za vodne rastline. Na podlagi specifičnega razloga za izvajanje preskusa se določi način izpostavljenosti (tj. prek vode ali usedline). Pred uporabo te preskusne metode za preskušanje zmesi v regulativne namene je treba proučiti, ali bo zagotovila sprejemljive rezultate za navedeni namen in, če jih bo, zakaj. Tega ni treba storiti, če obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi.

NAČELO PRESKUSA

4. Preskus je namenjen ocenjevanju učinkov, odvisnih od kemikalije, na vegetativno rast rastlin *Myriophyllum*, ki rastejo v standardiziranih gojiščih (voda, usedlina in hranilne snovi). Za ta namen se vršički poganjka zdravih, necvetočih rastlin posadijo v standardizirano, umetno usedlino, ki se dopolni z dodatnimi hranilnimi snovmi, da se zagotovi ustreznost rasti rastlin, in nato vzdržuje v gojišču po Smartu in Barku (Dodatek 1). Po obdobju vzpostavitve, ki omogoča oblikovanje korenin, so rastline izpostavljene nizu preskusnih koncentracij, ki se dodajo vodnemu stolpcu. Druga možnost je, da se simulira izpostavljenost prek usedline tako, da se umetni usedlini primeša preskusna kemikalija, rastline pa se presadijo v to usedlino s primešano preskusno snovjo. V obeh primerih se rastline nato 14 dni vzdržujejo v nadzorovanih okoljskih razmerah. Učinki na rast se ugotovijo na podlagi kvantitativnih ocen dolžine poganjka, sveže teže in suhe teže ter kvalitativnih opažanj simptomov, kot so kloroza, nekroza ali deformacije pri rasti.

5. Učinki, odvisni od kemikalije, se kvantificirajo tako, da se rast v testnih raztopinah primerja z rastjo kontrolnih rastlin, nato pa se določi koncentracija, ki povzroča navedeno x-odstotno zaviranje rasti, in izrazi kot EC_x , pri čemer je lahko „x“ katera koli vrednost, kar je odvisno od regulativnih zahtev, npr. EC_{10} , EC_{20} in EC_{50} . Upoštevati je treba, da so ocene vrednosti EC_{10} in EC_{20} zanesljive in primerne le pri preskusih, pri katerih so koeficienti variacije pri kontrolnih rastlinah nižji od ravni učinka, ki se ocenjuje, kar na primer pomeni, da morajo biti koeficienti variacije pri okvirni oceni vrednosti EC_{20} manjši od 20 %.
6. Določiti je treba tako povprečno specifično hitrost rasti (ocenjeno na podlagi ocen dolžine, sveže teže in suhe teže poganjka) kot prirast (ocenjen na podlagi povečanja dolžine, sveže teže in suhe teže poganjka) netretiranih in tretiranih rastlin. Specifična hitrost rasti (r) in prirast (y) se nato uporabita za določitev $E_r C_x$ (npr. $E_r C_{10}$, $E_r C_{20}$, $E_r C_{50}$) oziroma $E_y C_x$ (npr. $E_y C_{10}$, $E_y C_{20}$, $E_y C_{50}$).
7. Po potrebi se lahko na podlagi ocen povprečne specifične hitrosti rasti in prirasta določita najnižja koncentracija z opaženim učinkom (LOEC) in koncentracija brez opaznega učinka (NOEC).

INFORMACIJE O PRESKUSNI KEMIKALIJI

8. Na voljo mora biti analitska metoda z zadostno občutljivostjo za kvantifikacijo kemikalij v preskusnem gojišču.
9. Informacije o preskusni kemikaliji, ki so lahko koristne za določitev preskusnih pogojev, so med drugim strukturna formula, sestava v primeru snovi z več sestavinami, UVCB, zmesi ali pripravkov, čistost, topnost v vodi, obstojnost v vodi in na svetlobi, disociacijska konstanta kisline (pK_a), porazdelitveni koeficient n-oktanol/voda (K_{ow}), K_d v usedlino, parni tlak in biološka razgradljivost. Topnost v vodi in parni tlak se lahko uporabita za izračun Henryjeve konstante, ki pokaže, ali so med preskusnim obdobjem verjetne znatne izgube preskusne kemikalije. Če so verjetne izgube preskusnih kemikalij, jih je treba kvantificirati in dokumentirati nadaljnje ukrepe za nadzorovanje takih izgub. Če so informacije o topnosti in obstojnosti preskusnih kemikalij nejasne, se priporoča, da se te lastnosti ocenijo v pogojih preskusa, tj. v gojišču, pri temperaturi in režimu osvetlitve, ki se bodo uporabili v preskusu. *Opomba:* če se preskušajo herbicidi, ki peroksidirajo in so odvisni od svetlobe, mora uporabljena laboratorijska razsvetljava zagotavljati enako raven sončne ultravijolične svetlobe kot naravna sončna svetloba.
10. V preskusnem gojišču je treba meriti vrednost pH in jo po potrebi prilagoditi. Nadzorovanje vrednosti pH preskusnega gojišča je še posebej pomembno na primer pri preskušanju kovin ali kemikalij, ki so hidrolitično neobstoje. Dodatna navodila za preskušanje kemikalij s fizikalno-kemijskimi lastnostmi, ki otežujejo njihovo preskušanje, so na voljo v Smernicah OECD (11).

VELJAVNOST PRESKUSA

11. Za veljavnost rezultatov preskusa se morata povprečna skupna dolžina poganjka in povprečna skupna sveža teža poganjka pri kontrolnih rastlinah med fazo izpostavljenosti preskusa vsaj podvojiti. Poleg tega kontrolne rastline ne smejo kazati nobenih vidnih simptomov kloroze in zanje se lahko s prostim očesom oceni, da niso kontaminirane z drugimi organizmi, kot so sloji alg in/ali bakterij na rastlinah, na površini usedline in v preskusnem gojišču.
12. Povprečni koeficient variacije za prirast, ki temelji na meritvah sveže teže poganjka (tj. od začetka do konca preskusa), v kontrolnih kulturah ni večji od 35 % med ponovljenimi vzorci.

REFERENČNA KEMIKALIJA

13. Referenčne kemikalije, kot je na primer 3,5-diklorofenol, uporabljen pri krožnem testu (9), je treba redno preskušati, da se preveri učinkovitost preskusa v daljšem obdobju. Podatki krožnega testa kažejo, da so bila aritmetična povprečja vrednosti EC_{50} 3,5-diklorofenola za različne spremenljivke odziva med 4,7 mg/l in 6,1 mg/l (za podrobne podatke o pričakovanem intervalu zaupanja za navedene vrednosti glej poročilo o krožnem testu). Priporočljivo je, da se referenčna kemikalija preskusi najmanj dvakrat letno oziroma skupaj z dokončnimi preskusi toksičnosti, kadar se preskušanja izvajajo redkeje. Navodila o pričakovanih vrednostih EC_{50} za 3,5-diklorofenol vsebuje statistično poročilo o mednarodnem krožnem testu (9).

OPIS METODE

Preskusna oprema

14. Preskus je treba izvesti v nadzorovanih okoljskih razmerah, tj. v rastni komori, prostoru za rast ali laboratoriju, v katerem se lahko nadzorujejo dolžina dneva, svetloba in temperatura (glej odstavke od 56 do 58 v oddelku „Preskusni pogoji“). Založne kulture je treba vzdrževati ločeno od preskusnih posod.
15. Za študijo je treba uporabiti steklene preskusne posode, kot so akvariji ali čaše, običajno pa se uporabljajo dvolitrski steklene čaše (z višino približno 24 cm in premerom 11 cm). Vendar so lahko primerne tudi druge (tj. večje) posode, če omogočajo, da je vodna gladina dovolj visoko za neomejeno rast in da so rastline med celotnim trajanjem preskusa potopljene.
16. Plastični ali stekleni lončki za rastline (s premerom približno 9 cm, višino 8 cm in prostornino 500 ml) se lahko uporabijo kot posode za sajenje rastlin v usedlino. Lahko se uporabijo tudi steklene čaše in so v nekaterih primerih najprimernejša možnost (npr. preskušanje hidrofobnih kemikalij ali kemikalij z visokim K_{ow}).
17. Premisliti je treba o izbiri lončka/čaše in preskusnih posod ter najprimernejšem načrtu preskusa (glej v nadaljevanju). Če se uporabi načrt preskusa A (en poganjek v lončku s tremi lončki na posodo), bodo potrebni manjši lončki ali večje posode. Če se uporabi načrt preskusa B (trije poganjki v lončku in en lonček na posodo), morata biti navedeni lonček in posoda ustrezne velikosti. V vseh primerih mora biti vodna gladina 12 cm nad vrhom usedline, razmerje med površino/prostornino usedline in površino/prostornino vode pa je treba zabeležiti.

Preskusni organizem

18. Splošni pristopi, opisani v tej preskusni metodi, se lahko uporabljajo za preskušanje številnih vrst vodnih rastlin. Vendar so pogoji, opisani v tej preskusni metodi, prilagojeni za preskušanje rmanca vrste *Myriophyllum spicatum*. Ta vrsta spada v družino dvokaličnic *Haloragaceae*.
19. Klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) je potopljena, ukoreninjena vrsta, ki lahko raste v številnih pogojih in tako v statičnih kot tekočih vodnih telesih. Klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) je trajnica, ki med zimo odmre do korenin. Rastline običajno cvetijo in se prosto osemenijo, čeprav je vegetativno razmnoževanje iz pomožnih zarodnih brstičev ali delov stebela, ki se ločijo naravno ali po motnji, pogosto glavna metoda kolonizacije.

Gojenje preskusnega organizma

20. Rastline se lahko pridobijo iz naravnih populacij ali prek dobaviteljev vodnih rastlin. V obeh primerih je treba dokumentirati vir rastlin in preveriti identiteto vrste. Pri nabiranju klasastega rmanca (*Myriophyllum spicatum*) na terenu je treba zelo paziti, da se pridobi pravilna vrsta, zlasti na območjih, na katerih se lahko križa z drugimi vrstami *Myriophyllum*. V primeru dvoma se priporoča, da se uporabijo preverjene laboratorijske kulture iz znanih virov. Rastline, ki so bile izpostavljene kakršnim koli kemičnim onesnaževalcem ali so bile zbrane na mestih, za katera je znano, da so kontaminirana, se pri tem preskusu ne smejo uporabiti.
21. Na območjih, na katerih klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) ni zlahka dostopen v zimskih mesecih, je treba založne kulture dolgoročno vzdrževati v rastlinjaku ali v laboratorijskih pogojih. Založne kulture je treba vzdrževati v pogojih, ki so podobni preskusnim pogojem, čeprav sta lahko obsevanost in temperatura nižja, da se zmanjša pogostost vzdrževanja kulture (npr. kadar se za določeno obdobje ne načrtujejo preskusi z vrsto *Myriophyllum*). Priporočljivo je, da se uporabijo večji akvariji in lončki za rastline, kot bi se uporabili pri preskusih, da je dovolj prostora za proliferacijo. Sestava gojišča iz usedline in vode mora biti enaka sestavi, ki se uporablja za preskuse, čeprav se lahko uporabijo alternativne metode za gnojenje usedline (npr. uporaba komercialnih pripravkov gnojil s počasnim sproščanjem).

22. Pri rastlinah za založno kulturo se lahko s prostim očesom oceni, da niso kontaminirane z drugimi organizmi, vključno s polži, nitastimi algami, glivami in žuželkami, npr. z jajčeci ali ličinkami dristavčeve vešče *Paraponyx stratiotata* in ličinkami ali odraslimi rmančevimi vodnimi bičkarji *Eubrychius velutus*. Da se odpravi vidna kontaminacija, je treba rastlinski material sprati v sladki vodi. Poleg tega si je treba prizadevati čim bolj zmanjšati razvoj enoceličnih alg in bakterijskih okužb, čeprav ni nujno, da je rastlinski material popolnoma steril. Založne kulture je treba spremljati in po potrebi presaditi, da se preprečijo kontaminacija z algami in bakterijske okužbe. Če kontaminacija z algami ali bakterijske okužbe postanejo težava, lahko pomaga prezračevanje založnih kultur.
23. V vseh primerih se rastline ustrezno obdobje (tj. več kot dva tedna) pred uporabo v preskusu gojijo/aklimatizirajo v pogojih, ki so podobni pogojem, ki se uporabljajo pri preskusu, vendar ni nujno, da so enaki.
24. Cvetoče založne kulture se v preskusu ne smejo uporabiti, saj se hitrost vegetativne rasti med cvetenjem in po njem običajno zmanjša.

Usedlina

25. Za uporabo v tem preskusu se priporoča uporaba naslednje formulirane usedline, ki temelji na umetni usedlini, uporabljeni v poglavju C.28 te priloge (8). Usedlina se pripravi, kot je opisano v TM C.28, razen dodatka hranilnih snovi, ki se pripravi, kot je opisano v nadaljevanju:
- 4–5 % šote (suha teža v skladu z $2\% \pm 0,5\%$ organskega ogljika) čim bližje vrednosti pH od 5,5 do 6,0, pomembno pa je, da se uporabi fino mleta šota v prahu (delci naj bodo po možnosti manjši od 1 mm), ki je sušena le na zraku;
 - 20 % (suhe teže) kaolinske gline (vsebnost kaolinita naj bo po možnosti večja od 30 %);
 - 75–76 % (suhe teže) kremenovega peska (prevladovati mora fini pesek, pri katerem je več kot 50 % delcev velikih od 50 μm do 200 μm);
 - doda se vodno hranilno gojišče, tako da končna serija usedline vsebuje 200 mg/kg suhe usedline amonijevega klorida in natrijevega fosfata, odstotek vlage v končni zmesi pa znaša od 30 % do 50 %;
 - doda se kemijsko čist kalcijev karbonat (CaCO_3), da se vrednost pH v končni zmesi usedline uravna na $7,0 \pm 0,5$.
26. Vir šote, kaolinske gline in peska mora biti znan in dokumentiran. Če je izvor neznan ali je lahko razlog za skrb, je treba preveriti, da v zadevnih sestavinah ni kemičnih onesnaževal (npr. težkih kovin, organoklornih spojin in organofosfornih spojin).
27. Suhe sestavine usedline je treba homogeno premešati, preden se v usedlino v celoti vmeša vodna hranilna raztopina. Vlažno usedlino je treba pripraviti vsaj dva dni pred uporabo, da se šota v celoti namoči in da hidrofobni delci šote ne priplavajo na površje, ko je usedlina prekrita z gojiščem, pred uporabo pa se lahko vlažna usedlina hrani v temi.
28. Za preskus se usedlina premesti v posode ustrezne velikosti, kot so lončki za rože takega premera, da se lahko postavijo v steklene posode (površina usedline mora prekrivati približno 70 % ali več površine posode). Če ima posoda na dnu luknje, bo kos filtrirnega papirja na dnu posode pomagal, da usedlina ne bo uhajala iz posode. Lončki se napolnijo z usedlino tako, da je površina usedline ravna, nato pa se prekrijejo s tanko plastjo (~ 2 mm do 3 mm) inertnega materiala, kot je na primer pesek ali fini vrtnarski pesek (ali koralni pesek), da usedlina ne uhaja.

Preskusno gojišče

29. Za gojenje in preskušanje klasastega rmanca (*Myriophyllum spicatum*) se priporoča gojišče po Smartu in Barku (12). Priprava tega gojišča je opisana v Dodatku 1. Vrednost pH gojišča (vodna faza) na začetku preskusa mora biti med 7,5 in 8,0, da se zagotovi optimalna rast rastlin.

Načrt poskusa

30. Preskus mora vključevati najmanj šest preskusnih posod s ponovljenimi vzorci za netretirano kontrolo in najmanj štiri preskusne posode s ponovljenimi vzorci za vsako od najmanj petih ravni koncentracije.
31. Če ni treba določiti vrednosti NOEC, se načrt preskusa lahko spremeni tako, da se poveča število koncentracij in zmanjša število ponovljenih vzorcev na koncentracijo.
32. Vsaka preskusna posoda je ponovljeni vzorec, ki vsebuje tri poganjke. Obstajata dve možnosti za gojenje treh poganjkov v vsaki preskusni posodi:
 - Načrt preskusa A: en poganjek v lončku in trije lončki na posodo.
 - Načrt preskusa B: trije poganjki v lončku in en lonček na posodo.
 - Alternativni načrti preskusa z enim poganjkom v enem lončku na preskusno posodo so sprejemljivi, če se ponovljeni vzorec prilagodi, kot je potrebno za izpolnjevanje zahtevanih meril za veljavnost.
33. Posamezne preskusne posode morajo biti naključno dodeljene tretiranim skupinam. Na preskusnem območju je treba preskusne posode razporediti naključno, da se zmanjša vpliv prostorskih razlik v obsevanosti in temperaturi.

Koncentracije preskusne kemikalije in kontrolne skupine

34. Koncentracije morajo biti običajno razporejene v geometrijske serije, faktor separacije med preskusnimi koncentracijami pa ne sme biti večji od 3,2. Pri izbiri primernih preskusnih koncentracij je v pomoč predhodno poznavanje toksičnosti preskusne kemikalije na podlagi podatkov iz preskusa za določanje območja delovanja.
35. Za določitev EC_x z ustrežno ravnijo zaupanja morajo preskusne koncentracije oklepiti vrednost EC_x . Če se na primer ocenjuje EC_{50} , mora biti najvišja preskusna koncentracija višja od vrednosti EC_{50} . Če je vrednost EC_{50} zunaj območja preskusnih koncentracij, bodo povezani intervali zaupanja veliki in pravilna ocena statističnega ujemanja modela morda ne bo mogoča. Z uporabo več preskusnih koncentracij se bo izboljšal interval zaupanja okoli posledične vrednosti EC_x .
36. Za določitev vrednosti LOEC/NOEC (izbirna končna točka) mora biti najmanjša preskusna koncentracija dovolj majhna, da se rast ne razlikuje bistveno od rasti kontrolnih rastlin. Poleg tega mora biti najvišja preskusna koncentracija dovolj visoka, da je rast bistveno manjša od rasti v kontroli. Z uporabo več ponovljenih vzorcev se bo povečala statistična pomembnost koncentracije brez učinka/načrta analize variance.

Mejni preskus

37. Kadar preskus za določanje območja delovanja pokaže, da preskusna kemikalija nima škodljivih učinkov pri koncentracijah do 100 mg/l ali do svoje meje topnosti v preskusnem gojišču ali v primeru pripravka do meje razpršljivosti, se lahko izvede mejni preskus, da se omogoči primerjava odzivov v kontrolni skupini in eni tretirani skupini (100 mg/l ali koncentracija, ki je enaka meji topnosti, ali 1 000 mg/kg suhe usedline). Ta preskus je treba izvesti v skladu s splošnimi načeli standardnega preskusa odziva na odmere, vendar se priporoča, da se najmanjše število ponovljenih vzorcev poveča na šest preskusnih posod na kontrolo in koncentracijo. Rast v kontrolni in tretirani skupini se lahko analizira s statičnim preskusom za primerjavo povprečij, na primer s Studentovim t-testom.

Testne raztopine

38. Testne raztopine se običajno pripravijo z razredčitvijo osnovne raztopine, ki se pripravi tako, da se preskusna kemikalija raztopi ali razprši v gojišču po Smartu in Barku z demineralizirano (tj. destilirano ali deionizirano) vodo (glej Dodatek 1).

39. Najvišja preskusna koncentracija običajno ne sme preseči topnosti preskusne kemikalije v vodi ali v primeru pripravkov razpršljivosti v preskusnih pogojih.
40. Za preskusne kemikalije z majhno topnostjo v vodi bo morda treba pripraviti koncentrirano osnovno raztopino ali dispergirati kemikalijo s pomočjo organskega topila ali disperzijskega sredstva, da se omogoči dodajanje točnih količin preskusne kemikalije v preskusno gojišče ter olajšata njeno dispergiranje in raztapljanje. Čim bolj si je treba prizadevati preprečiti uporabo takih topil ali disperzijskih sredstev. Uporaba pomožnih topil ali disperzijskih sredstev ne sme povzročiti fitotoksičnosti. Pogosto uporabljeni topili, ki ne povzročata fitotoksičnosti pri koncentracijah do 100 µl/l, sta na primer aceton in dimetilformamid. Če se uporabi topilo ali disperzijsko sredstvo, je treba njegovo končno koncentracijo navesti v poročilu in jo ohranjati na najnižji ravni (≤ 100 µl/l). V teh okoliščinah morajo vsa tretiranja in kontrole (s topilom) vsebovati isto koncentracijo topila ali disperzijskega sredstva. Netretirani kontrolni ponovljeni vzorci, ki ne vsebujejo topila ali disperzijskega sredstva, so prav tako vključeni v načrt preskusa. Dodatna navodila o uporabi disperzijskih sredstev so na voljo v Smernicah OECD (11).

PRESKUSNI POSTOPEK

41. Preskusni postopek se razlikuje glede na način dodajanja preskusne kemikalije (tj. prek vodne faze ali faze usedline). Upoštevati je treba verjetno obnašanje preskusne kemikalije v sistemu vode in usedline, da se na podlagi teh podatkov izbere režim izpostavljenosti, uporabljen pri preskusu (tj. statični preskus ali statična zamenjava, voda s primešano preskusno snovjo ali usedlina s primešano preskusno snovjo). Preskusi z usedlino s primešano preskusno snovjo so v nekaterih primerih najprimernejša možnost za kemikalije, ki naj bi imele znatno porazdelitev v usedlino.

Faza vzpostavitve

42. Zdravi vršički/konci poganjka, tj. brez stranskih poganjkov, se odrežejo od rastlin iz kulture, da je poganjek dolg 6 cm (± 1 cm). Pri načrtu preskusa A (en poganjek v lončku in trije lončki na posodo) se v vsak lonček posadi en konec poganjka. Pri načrtu preskusa B (trije poganjki v lončku in en lonček na posodo) se v lonček, ki vsebuje usedlino, posadi pet vršičkov poganjkov.
43. V obeh primerih je treba rastline posaditi v dodatne lončke, da se lahko na začetku preskusa izberejo enotne rastline ter zagotovijo nadomestne rastline, ki se uporabijo za preverjanje rasti korenin takoj pred tretiranjem, in nadomestne rastline, ki se požanjejo za meritve biomase in dolžine poganjka na dan 0.
44. Poganjki se posadijo tako, da usedlina prekriva vsaj tri centimetre poganjkov, ki zajemajo vsaj dve kolenci.
45. Lončki se nato postavijo v preskusne posode v enakih okoljskih razmerah kot pri fazi izpostavljenosti ter vzdržujejo sedem dni v gojišču po Smartu in Barku, da se inducira razvoj korenin.
46. Potem je treba več rastlin v nadomestnih lončkih odstraniti, da se preveri rast korenin. Če rast korenin ni vidna (tj. konci korenin niso vidni), je treba fazo vzpostavitve podaljšati za toliko, da je vidna rast korenin. Priporoča se, da se ta korak izvede za zagotovitev, da rastline aktivno rastejo na začetku preskusa.

Izbira enotnega rastlinskega materiala

47. Pri načrtu preskusa A (en poganjek v lončku in trije lončki na posodo) se pred začetkom preskusa lončki izberejo tako, da se zagotovi enotnost. Pri načrtu preskusa B (trije poganjki v lončku in en lonček na posodo) se odvečne rastline odstranijo, da ostanejo tri rastline enotne velikosti in videza.

Izpostavljenost prek vodne faze

48. Lončki, izbrani zaradi enotnosti, se prestavijo v preskusne posode v skladu z načrtom poskusa. Nato se v preskusne posode doda gojišče po Smartu in Barku. Pri tem je treba paziti, da se v čim večji meri prepreči dvigovanje usedline. Za ta namen se lahko gojišče doda z lijem ali pa se usedlina prekrije s plastičnim pokrovom, medtem ko se gojišče doliva v preskusne posode, če se pokrov nato takoj odstrani. Lončki za rastline se lahko v preskusne posode dodajo tudi potem, ko se doda gojišče. V obeh primerih se lahko na začetku faze izpostavljenosti uporabi sveže gojišče, če je to potrebno, da se čim bolj zmanjša možnost kopičenja alg in bakterij ali da se omogoči priprava ene serije testne raztopine za vse ponovljene vzorce.
49. Pred dodajanjem gojišča ali po njem se izmeri dolžina poganjka nad usedlino.
50. Preden se preskusno gojišče doda v preskusne posode, se mu lahko dodajo ustrezne količine preskusne kemikalije. Preskusna kemikalija se lahko gojišču doda tudi potem, ko je že bilo dodano v preskusne posode. V tem primeru je treba paziti, da se preskusna kemikalija homogeno porazdeli po celotnem preskusnem sistemu, ne da bi pri se pri tem dvigovala usedlina.
51. V vseh primerih se na začetku preskusa zabeleži videz preskusnega gojišča (npr. prozorno, motno gojišče itd.).

Izpostavljenost prek usedline

52. Usedline s primešano preskusno snovjo izbrane koncentracije se pripravijo z dodajanjem raztopine preskusne kemikalije neposredno v svežo usedlino. Osnovna raztopina preskusne kemikalije, raztopljen v deionizirani vodi, se zmeša s formulirano usedlino z valjčnim mlinom, mešalnikom za krmo ali ročno. Če je preskusna kemikalija slabo topna v vodi, se lahko raztopi v čim manjši količini ustreznega organskega topila (npr. heksana, acetona ali kloroforma). Ta raztopina se nato zmeša s približno 10 g finega kremenovega peska na eno preskusno posodo. Topilo naj izhlapi in pesek se nato zmeša z ustrežno količino usedline na preskusno čašo. Za raztapljanje, razpršitev ali emulgiranje preskusne kemikalije se lahko uporabijo samo sredstva, ki hitro izhlapijo. Ne smemo pozabiti, da je treba pri končni pripravi usedline upoštevati količino/težo peska s primešano preskusno kemikalijo (tj. usedlino je torej treba pripraviti z manj peska). Paziti je treba, da je preskusna kemikalija, ki se doda usedlini, v njej temeljito in enakomerno razporejena.
53. Z usedlino s primešano preskusno snovjo se napolnijo lončki (kot je opisano zgoraj). Rastline, izbrane zaradi enotnosti in ustreznega koreninskega sistema, se odstranijo iz lončkov, ki so se uporabljali med fazo vzpostavitve, in presadijo v usedlino s preskusno snovjo, kot je opisano zgoraj.
54. Lončki se prestavijo v preskusne posode v skladu z načrtom poskusa. Nato se previdno doda gojišče po Smartu in Barku (tj. z uporabo lijaka), da se prepreči dvigovanje usedline. Pred dodajanjem gojišč ali po njem se izmeri dolžina poganjka nad usedlino.

Vzdrževanje nivoja vode med preskusom

55. Zabeležiti je treba končno količino vode in nivo vode, ki je označen na vsaki preskusni posodi. Če med preskusom izhlapi več kot 10 % vode, je treba nivo vode uravnati z destilirano vodo. Po potrebi se lahko čaše ohlapno prekrijejo s prozornim pokrovom, kot so prozorni plastični pokrovi, da se zmanjšata izhlapevanje in kontaminacija s trosi alg.

Preskusni pogoji

56. Uporabiti je treba toplo in/ali hladno belo fluorescenčno osvetlitev, da se zagotovi obsevanost s svetlobo v območju približno $140 (\pm 20) \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ko se meri kot fotosintetsko aktivno sevanje (400–700 nm) na vodni površini, in cikel svetlobe in teme v razmerju 16: 8 ur. Morebitne razlike v izbrani obsevanosti s svetlobo na preskusnem območju ne smejo biti večje od $\pm 15 \%$.

57. Temperatura preskusnih posod mora biti $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.
58. Vrednost pH kontrolnega gojišča se med preskusom ne sme povečati za več kot 1,5 enote. Vendar odstopanje za več kot 1,5 enote ne pomeni razveljavitve preskusa, če se lahko dokaže, da so izpolnjena zgoraj navedena merila za veljavnost.

Trajanje preskusa

59. Obdobje izpostavljenosti traja 14 dni.

Meritve in analitske določitve

60. Po fazi vzpostavitve in takoj pred tretiranjem (tj. na dan 0) se požanjejo nadomestne rastline iz petih naključno izbranih lončkov za načrt s tremi rastlinami v lončku ali petnajstih lončkov za načrt z eno rastlino v lončku za oceno dolžine, sveže teže in suhe teže poganjka, kot je opisano v nadaljevanju.
61. Pri rastlinah, prenesenih v fazo izpostavljenosti, je treba opraviti naslednje ocene, kot je prikazano v preglednici 1:
- ocene dolžine glavnega poganjka, števila stranskih poganjkov in dolžine stranskih poganjkov se zabeležijo vsaj na koncu obdobja izpostavljenosti (npr. na dan 14);
 - vizualne ocene zdravja rastlin se zabeležijo vsaj trikrat med obdobjem izpostavljenosti (npr. na dneve 0, 7 in 14);
 - ocene sveže teže in suhe teže poganjka se opravijo na koncu preskusa (tj. na dan 14).
62. Dolžina poganjka se izmeri z ravnilom. Če obstajajo stranski poganjki, jih je treba prešteti in izmeriti tudi njihovo dolžino.
63. Vizualne ocene zdravja rastlin je treba opraviti tako, da se zabeleži videz rastlin in splošno stanje preskusnega gojišča. Zabeležiti je treba med drugim naslednja opažanja:
- nekrozo, klorozo ali drugo razbarvanje, kot je prekomerna pordečitev glede na kontrolne rastline;
 - razvoj bakterijskih okužb ali kontaminacijo z algami;
 - anomalije pri rasti, kot so pritlikavost, spremenjena dolžina med kolenci, deformirani poganjki/listi, proliferacija stranskih poganjkov, odpadanje listov, upad pritiska celične vsebine na celične stene in fragmentacija stebela;
 - vizualna ocena zdravja korenin se opravi na koncu preskusa, tako da se usedlina previdno spere s korenin in s tem omogoči opazovanje koreninskega sistema. Predlagana lestvica za oceno glede na kontrolne rastline je prikazana v nadaljevanju:
 - 1) odsotnost korenin,
 - 2) nekaj korenin,
 - 3) zmeren razvoj korenin,
 - 4) zelo dober razvoj korenin, podoben kontrolam.
64. Ocene sveže teže se opravijo na začetku in na koncu preskusa, tako da se poganjek odreže na ravni usedline, nato pa se pred tehtanjem z njega popivna voda do suhega. Paziti je treba, da se odstranijo delci usedline, ki se lahko prilepijo na dno poganjka. Material poganjka se nato postavi v sušilnik s temperaturo približno 60 °C in suši do konstantne teže, preden se ponovno stehta in zabeleži suha teža.
65. V preglednici 1 so povzete minimalne biološke ocene, ki jih je treba opraviti med trajanjem preskusa.

Preglednica 1

Časovni načrt ocenjevanja

Dan po tretiranju	Klasasti rmanec (<i>Myriophyllum spicatum</i>)			
	dolžina poganjka, dolžina in število stranskih poganjkov	vizualna ocena poganjkov	sveža in suha teža poganjka, vizualna ocena korenin	pH O ₂
0	O	O	O	O
4	—	—	—	—
7	—	O	—	O
14	O	O	O	O

O: pomeni, da je ob tem času potrebno ocenjevanje.

—: pomeni, da meritve niso potrebne.

Pogostost meritev in analitskih določitev

66. Najmanj dnevno (ali stalno z zapisovalnikom podatkov) je treba beležiti temperaturo gojišča v nadomestni posodi, ki je pod enakimi pogoji v rastni komori, inkubatorju ali prostoru.
67. Vrednost pH in koncentracijo raztopljenega kisika v preskusnem gojišču je treba v vseh posodah s ponovljenimi vzorci preveriti na začetku preskusa, vsaj enkrat med študijo in na koncu preskusa. Vsakič je treba meritve opraviti ob istem času. Če se za pripravo vseh ponovljenih vzorcev pri vsaki preskusni koncentraciji uporabijo nepakirane raztopine, je na dan 0 sprejemljiva ena meritev vsake nepakirane raztopine.
68. Obsevanost je treba meriti v rastni komori, inkubatorju ali prostoru na točkah, ki so enake ravni vodne gladine. Meritve je treba opraviti vsaj enkrat na začetku preskusa ali med preskusom. Metoda zaznavanja in merjenja svetlobe, zlasti vrsta tipala, vpliva na izmerjeno vrednost. Sferična tipala (ki se odzivajo na svetlobo iz vseh kotov nad in pod ravnino merjenja) in „kosinusna“ tipala (ki se odzivajo na svetlobo iz vseh kotov nad ravnino merjenja) so primernejša od enosmernih tipal in omogočajo višje odčitke v primeru večtočkovnih svetlobnih virov vrste, ki je opisana tu.

Analitske meritve preskusne kemikalije

69. Pravilna uporaba preskusne kemikalije mora biti podprta z analitskimi meritvami koncentracij preskusne kemikalije.
70. Vzorce vode za analizo preskusne kemikalije je treba za vse preskusne koncentracije zbrati takoj po začetku preskusa (tj. na dan dodajanja pri obstojnih preskusnih kemikalijah ali eno uro po dodajanju pri neobstojevnih kemikalijah) in ob zaključku preskusa.
71. Koncentracije v usedlini in porni vodi usedline je treba določiti na začetku in na koncu preskusa vsaj pri najvišji preskusni koncentraciji, razen če je za preskusne kemikalije znano, da so obstojne v vodi (> 80 % nominalne vrednosti). Meritve v usedlini in porni vodi morda ne bodo potrebne, če je bila porazdelitev preskusne kemikalije med vodo in usedlino jasno določena v študiji vode/usedline v primerljivih pogojih (npr. razmerje med usedlino in vodo, metoda dodajanja, vrsta usedline).

72. Vzorčenje usedline na začetku preskusa bo najverjetneje motilo preskusni sistem. Zato so lahko potrebne dodatne tretirane preskusne posode, da se omogočijo analitske določitve na začetku in na koncu preskusa. Če se oceni, da so potrebne vmesne ocene, tj. na dan 7, in so za analize potrebni veliki vzorci usedline, ki jih ni mogoče zlahka odstraniti iz preskusnega sistema, je treba analitsko določanje podobno opraviti z uporabo dodatnih preskusnih posod, ki so tretirane na isti način kot posode, ki se uporabljajo za biološke ocene.
73. Za izolacijo intersticijske vode se na primer priporoča 30-minutno centrifugiranje pri 10 000 g in 4 °C. Če pa se za preskusno kemikalijo dokaže, da se ne adsorbira v filtre, je sprejemljivo tudi filtriranje. V nekaterih primerih koncentracij v porni vodi zaradi premajhne velikosti vzorca morda ne bo mogoče analizirati.
74. Pri polstatičnih preskusih (tj. izpostavljenost prek vodne faze), pri katerih se ne pričakuje, da bo koncentracija ustreznih preskusnih kemikalij med trajanjem preskusa ostala v območju 20 % nominalne koncentracije brez zamenjave testnih raztopin, je treba vzorčiti uporabljene in sveže pripravljene testne raztopine za analizo koncentracije preskusne kemikalije ob vsaki zamenjavi.
75. Kadar izmerjena začetna koncentracija preskusne kemikalije ni v območju 20 % nominalne koncentracije, vendar obstajajo zadostni dokazi, da so začetne koncentracije ponovljive in obstojne (tj. v območju 80–120 % začetne koncentracije), se lahko kemijske določitve opravijo le pri najvišji in najnižji preskusni koncentraciji.
76. V vseh primerih je treba izvesti določanje koncentracij preskusne kemikalije samo na eni posodi s ponovljenim vzorcem pri vsaki preskusni koncentraciji. Alternativno se lahko testne raztopine vseh ponovljenih vzorcev za vsako koncentracijo združijo za analize.
77. Če obstajajo dokazi, da se je koncentracija preskusne kemikalije ohranjala v območju 20 % nominalne ali izmerjene začetne koncentracije med celotnim preskusom, lahko analiza rezultatov in posledična izpeljava končnih točk temeljita na nominalnih ali izmerjenih začetnih vrednostih.
78. V teh primerih morajo učinkovite koncentracije temeljiti na nominalnih ali izmerjenih koncentracijah vode na začetku preskusa.
79. Če pa obstajajo dokazi, da se je koncentracija zmanjšala med preskusom (tj. se ni ohranjala v območju 20 % nominalne ali izmerjene začetne koncentracije v tretiranem oddelku), mora analiza rezultatov temeljiti na geometrijski srednji koncentraciji med izpostavljenostjo ali modelih, ki opisujejo zmanjšanje koncentracije preskusne kemikalije v tretiranem oddelku (11).

OVREDNOTENJE PODATKOV

80. Če je treba uporabiti topilo/disperzijsko sredstvo, se lahko podatki iz kontrol s topilom in netretiranih kontrol združijo za namene statističnih analiz, če se odzivi kontrol s topilom in netretiranih kontrol statistično značilno ne razlikujejo.

Spremenljivke odziva

81. Namen preskusa je z uporabo dveh spremenljivk odziva, in sicer povprečne specifične hitrosti rasti in prirasta, ugotoviti, kakšne učinke ima preskusna kemikalija na vegetativno rast preskusne vrste v skladu z naslednjimi postopki:

Povprečna specifična hitrost rasti

82. Ta spremenljivka odziva temelji na spremembah logaritmov skupne dolžine poganjka, skupne sveže teže poganjka in skupne suhe teže poganjka v časovnem obdobju v kontrolah in vsaki tretirani skupini. Ta spremenljivka se izračuna za vsak ponovljeni vzorec vsake kontrolne in tretirane skupine. Povprečno dolžino in težo treh rastlin na preskusno posodo (ponovljeni vzorec) ter posledično hitrost rasti za vsak ponovljeni vzorec je treba izračunati po naslednji enačbi:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

pri čemer je:

μ_{i-j} : povprečna specifična hitrost rasti od časa i do časa j ,

N_i : merjena spremenljivka v preskusni posodi ali kontrolni posodi ob času i ,

N_j : merjena spremenljivka v preskusni posodi ali kontrolni posodi ob času j ,

t : časovno obdobje od i do j .

83. Na podlagi odzivov ponovljenih vzorcev je treba za vsako tretirano in kontrolno skupino izračunati aritmetično povprečje hitrosti rasti in oceniti varianco.
84. Povprečna specifična hitrost rasti se izračuna za celotno preskusno obdobje (čas „ i “ v zgornji enačbi pomeni začetek preskusa, čas „ j “ pa konec preskusa). Za vsako preskusno koncentracijo in kontrolo se izračuna aritmetično povprečje specifične hitrosti rasti in oceni varianca.
85. Nato se lahko za vsako preskusno koncentracijo (tretirano skupino) izračuna odstotek zaviranja hitrosti rasti (I_p) po naslednji enačbi:

$$\%I_p = \frac{(\mu_c - \mu_T)}{\mu_c} \times 100$$

pri čemer je:

$\% I_p$: odstotek zaviranja povprečne specifične hitrosti rasti,

μ_C : aritmetično povprečje za μ v kontrolni skupini,

μ_T : aritmetično povprečje za μ v tretirani skupini.

Prirast

86. Ta spremenljivka odziva temelji na spremembah skupne dolžine poganjka, skupne sveže teže poganjka in skupne suhe teže poganjka v časovnem obdobju v kontrolah in vsaki tretirani skupini. Povprečen odstotek zaviranja prirasta ($\% I_y$) se lahko za vsako tretirano skupino izračuna po naslednji enačbi:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

pri čemer je:

$\% I_y$: odstotek zmanjšanja prirasta,

b_C : končna biomasa minus začetna biomasa v kontrolni skupini,

b_T : končna biomasa minus začetna biomasa v tretirani skupini.

Izdelava krivulj koncentracija–odziv

87. Izrisati je treba krivulje koncentracija–odziv, ki prikazujejo povprečen odstotek zaviranja spremenljivke odziva (I_r ali I_y), ki se izračuna, kot je prikazano zgoraj, in krivuljo logaritemsko transformirane koncentracije preskusne kemikalije.

Ocena vrednosti EC_x

88. Ocene vrednosti EC_x (npr. EC_{50}) morajo temeljiti na povprečni specifični hitrosti rasti ($E_r C_x$) in prirastu ($E_y C_x$), vsaka od teh vrednosti pa temelji na skupni sveži teži poganjka, skupni suhi teži poganjka in skupni dolžini poganjka.
89. Opozoriti je treba, da vrednosti EC_x izračunane na podlagi teh dveh spremenljivk odziva, niso primerljive, to razliko pa je treba upoštevati pri uporabi rezultatov preskusa. Če se upoštevajo preskusni pogoji iz te preskusne metode, bodo vrednosti EC_x , ki temeljijo na povprečni specifični hitrosti rasti ($E_r C_x$), v večini primerov višje od rezultatov, ki temeljijo na prirastu ($E_y C_x$) zaradi matematične osnove teh dveh pristopov. Ta razlika se ne sme razlagati kot razlika v občutljivosti obeh spremenljivk odziva, saj enostavno izvira iz različne matematične narave vrednosti.

Statistični postopki

90. Cilj je kvantificirati odziv na koncentracijo z regresijsko analizo. Po linearni transformaciji podatkov o odzivu se lahko uporabi tehtana linearna regresija, na primer v probit ali logaritemskih ali Weibullovih enotah (13), vendar so nelinearni regresijski postopki prednostne tehnike, ki bolje obravnavajo neizogibne nepravilnosti in odstopanja podatkov od enakomerne porazdelitve. Če se te nepravilnosti približujejo ničelnemu ali popolnemu zaviranju, se lahko s transformacijo povečajo in ovirajo analizo (13). Opozoriti je treba, da so standardne metode probit analize, logaritemske analize ali Weibullove transformacije namenjene uporabi pri kvantnih podatkih (npr. za umrljivost ali preživetje), zato jih je treba prilagoditi za uporabo na podatkih o hitrosti rasti ali prirastu. Specifični postopki za določanje vrednosti EC_x iz stalnih podatkov so na voljo v (14), (15), (16) in (17).
91. Za vsako spremenljivko odziva, ki se bo analizirala, se izračuna točkovna ocena vrednosti EC_x , pri čemer se uporabi razmerje med odzivom in koncentracijo. Določijo se 95-odstotne meje zaupanja za vsako oceno in grafično ali statistično je treba oceniti, kako se podatki o odzivu prilegajo regresijskemu modelu. Regresijsko analizo je treba opraviti na odzivih posameznih ponovljenih vzorcev in ne na povprečjih tretiranih skupin.
92. Ocene EC_{50} in meje zaupanja se lahko pridobijo tudi z linearno interpolacijo s samovzorčenjem (18), če razpoložljivi regresijski modeli/metode niso primerni za podatke.
93. Za oceno vrednosti LOEC in s tem tudi vrednosti NOEC je treba primerjati povprečja tretiranih skupin s tehnikami analize variance (ANOVA). Povprečje za vsako koncentracijo se z uporabo primerne preskusne metode (npr. z Dunnettovim ali Williamsov testom) nato primerja s srednjo vrednostjo kontrole (19) (20) (21) (22). Oceniti je treba, ali veljata predpostavki normalne porazdelitve in homogenosti varianc v analizi variance. To oceno je treba izvesti s Shapiro-Wilkovim testom (normalna porazdelitev) ali Levenejevim testom (homogenost varianc). Če predpostavki normalne porazdelitve in homogenosti varianc nista izpolnjeni, se lahko ponekod to popravi z logaritemsko transformacijo podatkov. Če sta heterogenost variance in/ali odstopanje od normalne porazdelitve izredno velika in ju ni mogoče odpraviti s transformacijo, je treba proučiti možnosti analize z metodami, kot sta Bonferronijev-Welchev t-test, Bonferronijev test mediane ter test po Jonckheere-Terpstraju. Dodatna navodila o določanju vrednosti NOEC so na voljo v (16).

POROČANJE

94. V poročilu o preskusu je treba navesti naslednje informacije:

Preskusna kemikalija

Snov iz ene sestavine:

— fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;

- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

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

Preskusne vrste

- Znanstveno ime in vir.

Preskusni pogoji

- Trajanje in pogoji faze vzpostavitve.
- Uporabljeni preskusni postopek (statični, polstatični, pulzirajoči).
- Datum začetka preskusa in njegovo trajanje.
- Preskusno gojišče, tj. usedlina in tekoče hranilno gojišče.
- Opis načrta poskusa: rastna komora/prostor ali laboratorij, preskusne posode in pokrovi, količine raztopin, dolžina in teža preskusnih rastlin na preskusno posodo na začetku preskusa, razmerje med površino usedline in vodno gladino, razmerje med usedlino in količino vode.
- Preskusne koncentracije (nominalne in izmerjene, kot je ustrezno) in število ponovljenih vzorcev za posamezno koncentracijo.
- Metode priprave osnovnih in testnih raztopin, vključno z uporabo kakršnih kolih topil ali disperzijskih sredstev.
- Temperatura med preskusom.
- Svetlobni vir, obsevanost ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$).
- Vrednosti pH preskusnega in kontrolnega gojišča ter videz preskusnega gojišča na začetku in na koncu preskusa.
- Koncentracije kisika.
- Metoda analize z ustreznimi podatki za oceno kakovosti (validacijske študije, standardni odkloni ali meje zaupanja analiz).
- Metode za določanje merjenih spremenljivk, npr. dolžine, suhe teže in sveže teže.
- Vsa odstopanja od te preskusne metode.

Rezultati

- Neobdelani podatki: dolžina poganjka in teža poganjka rastlin/lončka ter druge merjene spremenljivke za vsako preskusno in kontrolno posodo ob vsakem opazovanju in analizi v skladu s časovnim načrtom iz preglednice 1.
- Povprečja in standardni odkloni za vsako merjeno spremenljivko.
- Krivulje rasti za vsako koncentracijo.
- Podvojitveni čas/hitrost rasti v kontroli na podlagi dolžine in sveže teže poganjka, vključno s koeficienti variacije za prirast sveže teže.
- Izračunane spremenljivke odziva za vsak tretirani ponovljeni vzorec s povprečji in koeficientom variacije za ponovljene vzorce.
- Grafična predstavitev razmerja med koncentracijo in učinkom.
- Ocene toksičnih končnih točk za spremenljivke odziva, npr. EC_{50} , in povezani intervali zaupanja. Vrednosti LOEC in/ali NOEC, če sta izračunani, in statistične metode za njuno določitev.

- Če je bila uporabljena analiza variance, velikost opaženega učinka (npr. najmanjša značilna razlika).
- Vsaka stimulacija rasti, opažena pri katerem koli tretiranju.
- Kakršni koli vidni znaki fitotoksičnosti ter opažanja testnih raztopin.
- Razprava o rezultatih, vključno z vsemi vplivi na rezultat preskusa, ki izhajajo iz odstopanj od te preskusne metode.

VIRI

- (1) Poglavje C.26 te priloge: Preskus zaviranja rasti Lemna sp.
- (2) Poglavje C.3 te priloge: Sladkovodne alge in cianobakterije, preskus zaviranja rasti.
- (3) Maltby, L. et al. (2010). Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14-16 January 2008.
- (4) Arts, G.H.P. et al. (2008). Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, Environmental Pollution, zv. 153, str. 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, zv. 62/8, str. 715–722.
- (7) Poglavje C.50 te priloge: Preskus toksičnosti za klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) brez usedline
- (8) Poglavje C.28 te priloge: Preskus strupenosti s trzačami v sistemu vode in usedline z uporabo vode s primešano preskusno snovjo
- (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“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, št. 206, OECD Publishing, Pariz.
- (10) Davies, J. et al. (2003). Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron – a case study, Pest Management Science, zv. 59/2, str. 231–237.
- (11) OECD (2000). „Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, št. 23, OECD Publishing, Pariz.
- (12) Smart, R. M., J. W. Barko (1985). Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, Aquatic Botany, zv. 21/3, str. 251–263.
- (13) Christensen, E. R., N. Nyholm (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, Environmental Science Technology, zv. 18/9, str. 713–718.
- (14) Nyholm, N. et al. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, Environmental Toxicology and Chemistry, zv. 11/2, str. 157–167.
- (15) Bruce, R. D., D. J. Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry, zv. 11/10, 1485–1494.
- (16) OECD (2006). „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, št. 54, OECD Publishing, Pariz.
- (17) Brain, P., R. Cousens (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, Weed Research, zv. 29/2, str. 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*, zv. 50/272, str. 1096–1121.
- (20) Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, zv. 20/3, str. 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*, zv. 27/1, str. 103–117.
- (22) Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, zv. 28/2, str. 519–531.
-

Dodatek 1

SESTAVA GOJIŠČA PO SMARTU IN BARKU

Sestavina	Količina reagenta, dodana v vodo (*) (v 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 (ravnovesje v zraku)	7,9

(*) Demineralizirana (tj. destilirana ali deionizirana) voda

Dodatek 2

OPREDELITEV POJMOV

Biomasa je sveža in/ali suha teža žive snovi, prisotne v populaciji. Pri tem preskusu je biomasa vsota glavnega poganjka, vseh stranskih vej in vseh korenin.

Kemikalija je snov ali zmes.

Kloroza je sprememba barve preskusnega organizma, zlasti spiralasto razvrščenih listov, z zelene na rumenkasto.

EC_x je koncentracija preskusne kemikalije, raztopljene v preskusnem gojišču, ki povzroči x-odstotno (npr. 50-odstotno) zmanjšanje rasti klasastega rmanca (*Myriophyllum spicatum*) v ustreznem obdobju izpostavljenosti (navesti v primeru odstopanja od polnega ali običajnega trajanja preskusa). Za nedvoumno označitev vrednosti EC, pridobljene iz hitrosti rasti ali prirasta, se simbol „E_rC“ uporablja za hitrost rasti in simbol „E_yC“ za prirast, sledi pa uporabljena merjena spremenljivka, npr. E_rC (dolžina glavnega poganjka).

Rast je povečanje merjene spremenljivke, npr. dolžine glavnega poganjka, skupne dolžine stranskih vej, skupne dolžine poganjka, skupne dolžine korenine, sveže teže, suhe teže ali števila spiralasto razvrščenih listov, med preskusnim obdobjem.

Hitrost rasti (povprečna specifična hitrost rasti) je logaritemsko povečanje merjene spremenljivke v obdobju izpostavljenosti. *Opomba*: spremenljivke odziva, povezane s hitrostjo rasti, niso odvisne od trajanja preskusa, če je vzorec rasti neizpostavljenih kontrolnih organizmov eksponenten.

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

Merjene spremenljivke so vse vrste spremenljivk, ki se merijo, da se izrazi končna točka preskusa z eno ali več različnimi spremenljivkami odziva. Pri tej preskusni metodi so merjene spremenljivke dolžina glavnega poganjka, skupna dolžina stranskih vej, skupna dolžina poganjka, skupna dolžina korenine, sveža teža, suha teža in število spiralasto razvrščenih listov.

Monokultura je kultura z eno rastlinsko vrsto.

Nekroza je mrtvo (tj. belo ali temno rjavo) tkivo preskusnega organizma.

Koncentracija brez opaznega učinka (NOEC) je preskusna koncentracija takoj pod vrednostjo LOEC.

Spremenljivka odziva je spremenljivka za oceno toksičnosti, izpeljana iz katerih koli izmerjenih parametrov, ki opisujejo biomaso, z drugačnim postopkom izračuna. Pri tej preskusni metodi sta hitrost rasti in prirast spremenljivki odziva, izpeljani iz merjenih spremenljivk, kot so dolžina glavnega poganjka, skupna dolžina poganjka, sveža teža, suha teža ali število spiralasto razvrščenih listov.

Polstatični preskus (zamenjava) je preskus, pri katerem se testna raztopina v določenih časovnih presledkih redno menja med preskusom.

Statični preskus je preskusna metoda, pri kateri se testna raztopina med preskusom ne zamenja.

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

Končna točka preskusa opisuje splošen dejavnik, ki ga preskusna kemikalija spremeni glede na kontrolni vzorec in je cilj preskusa. V tej preskusni metodi je končna točka zaviranje rasti, ki ga lahko izrazimo z različnimi spremenljivkami odziva, ki temeljijo na eni ali več merjenih spremenljivkah.

Preskusno gojišče je popolnoma sintetično gojišče, na katerem preskusne rastline rastejo ob izpostavljenosti preskusni kemikaliji. Običajno se preskusna kemikalija raztopi v preskusnem gojišču.

UVCB je snov z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkt ali biološki material.

Prirast je vrednost merjene spremenljivke za izražanje biomase na koncu obdobja izpostavljenosti, od česar se odšteje vrednost merjene spremenljivke na začetku obdobja izpostavljenosti. Opomba: Če je vzorec rasti neizpostavljenih organizmov eksponenten, se bodo spremenljivke odziva, ki temeljijo na prirastu zmanjševale, ko se bo čas trajanja preskusa povečeval.“
